

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

**Estudo de novas metodologias para realização de ensaios
com a catepsina D na busca de inibidores**

Vivian Estevam Cornélio*

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

*** Bolsista FAPESP**

São Carlos - SP

2015

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

C814en Cornélio, Vivian Estevam.
 Estudo de novas metodologias para realização de ensaios
 com a catepsina D na busca de inibidores / Vivian Estevam
 Cornélio. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
 180 f.

 Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
 2015.

 1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. 3. Catepsina D.
 4. Ensaios enzimáticos. 5. Inibidores. I. Título.

CDD: 547 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Vivian Estêvam Cornelio, realizada em 06/02/2015:

Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira
UFSCar

Prof. Dr. Rafael Victorio Carvalho Guido
IFSC/USP

Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso
FFCLRP/USP

Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro
UNESP

Prof. Dr. João Batista Fernandes
UFSCar

Dedico este trabalho...

Ao meu esposo Rogério (Uoly), o amor da minha vida, pelo companheirismo, amizade, amor, compreensão, paciência e serenidade que nunca se esgotaram durante esse período, e foram essenciais.

Aos meus pais Hilton e Célia, pela confiança, apoio e dedicação para que eu pudesse realizar esse sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pelo apoio, ensinamentos, paciência e ética transmitidos durante a realização deste trabalho.

Aos demais professores do Laboratório de Produtos Naturais, Dr. João Batista Fernandes, Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e Dr. Moacir Rossi Forim, pelos ensinamentos e colaboração desde a iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, pela parceria estabelecida durante esse projeto, por toda colaboração e ensinamentos.

À Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass e à Dra. Marcela Cristina de Moraes, pela parceria estabelecida, pelos ensinamentos e orientação.

Aos professores, alunos e técnicos dos laboratórios de CLAE e RMN.

Aos demais professores do DQ-UFSCar, pela contribuição na minha formação.

À Prof. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, do Depto. de Morfologia e Patologia da UFSCar, pela amizade, conselhos e pela parceria.

Ao Prof. Dr. Rafael V. C. Guido do IFSC-USP, pela colaboração nos ensaios enzimáticos.

Ao Prof. Dr. James McKerrow e ao Dr. Conor Caffrey, pela orientação e ensinamentos durante meu estágio na Universidade da Califórnia, São Francisco.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho... Muito obrigada!

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Produtos Naturais do DQ-UFSCar, pela amizade, companhia e por me proporcionarem momentos tão felizes.

À Dra. Mariele Mucio Pedroso, por ter se tornado minha grande amiga durante esse período. Por ter tido paciência, ou não, comigo, e termos realizado um trabalho tão lindo, juntas.

Aos meus amigos pessoais, principalmente Angélica, pela amizade e por ser esse exemplo de humildade.

Aos meus pais Hilton e Célia, e minhas irmãs, Marília e Paula, pela confiança, apoio e amizade.

Ao meu esposo, Rogério, pelo amor incondicional e paciência durante esse período. Sem sua presença tudo teria sido mais difícil.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

À Deus pela minha existência e por ter me dado forças nos momentos de fraqueza.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
APTS	aminopropiltrietoxisilano
Asp	Ácido aspártico
BSA	Albumina sérica bovina
C18	Octadecil-sílica
CatD	Catepsina D
CatD-IMER	Biorreator baseado na catepsina D
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
cDNA	DNA complementar
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CIAP	Fosfatase alcalina intestinal
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CV	Coeficiente de variação
d	dubleto
DCM	diclorometano
dd	duplo dubleto
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNP	dinitrofenila
DpnI	Enzima de restrição que reconhece o sítio Gm6A ^{TC}
DTT	Ditiotreitol
E-64	L-3-carboxi- <i>trans</i> -2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano
EDC	<i>N</i> -etil <i>N</i> -dimetilpropil carbodiimida
EPV	Extrato de proteínas do verme <i>Schistosoma mansoni</i>

ES	complexo enzima-substrato
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
Hb	Hemoglobina humana
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	Potência inibitória
IMER	<i>Immobilized enzyme reactor</i>
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>k_{cat}</i>	Constante catalítica
<i>K_d</i>	Constante de dissociação
kDa	Kilodalton (10^3 g mol ⁻¹)
<i>K_i</i>	Constante de afinidade
<i>K_M</i>	Constante de Michaelis-Menten
KpnI	Enzima de restrição que reconhece o sítio GGTA ^C
L	Litro
LB	Meio Luria-Bertani
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m	Multipeto
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MHO	2-mercaptoetanol
MHz	Mega Hertz
MOCAC	Ácido(7-metoxicumarina-4-il)acético
mRNA	RNA mensageiro
MUA	Ácido mercaptoundecanóico
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
PBS	Fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial hidrogeniônico

P-MOCAc	Produto da clivagem contendo a amida do ácido(7-metoxicumarina-4-il)acético
QCM	Quartz Crystal Microbalance
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
s	Singleto
SacI	Enzima de restrição que reconhece o sítio GAGCT^C
SDS-Tricina-PAGE	Gel de Tricina e dodecil-sulfato de de poliacrilamida
SmCB1	Catepsina B de <i>Schistosoma mansoni</i>
SmCD	Catepsina D de <i>Schistosoma mansoni</i>
S-MOCAc	Substrato contendo a amida do ácido(7-metoxicumarina-4-il)acético
SOC	Meio contendo glicose e MgCl ₂
t	Tripleto
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
V _{máx}	Velocidade máxima da reação
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galacto-piranosídeo
Z-AAN-AMC	Carbobenzoxi-Ala-Ala-Asn-7-amido-4-metil-cumarina
Z-FR-AMC	Carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amido-4-metil-cumarina
λ	Comprimento de onda
λ _{em}	Comprimento de onda de emissão
λ _{ex}	Comprimento de onda de excitação

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Molécula de pepstatina A, um inibidor potente de aspartil proteases. .	5
FIGURA 1.2 - Mecanismo de clivagem proteolítica da ligação amida por aspartil proteases (VEERAPANDIAN et al., 1992).....	6
FIGURA 1.3 - Estrutura da catepsina D. Obtida do Protein Data Bank código 1-LYB.	7
FIGURA 1.4 - Estrutura da Hb e unidades heme, com as subunidades α e β destacadas em vermelho e azul, respectivamente. Obtida do Protein Data Bank código 1-GZX.	12
FIGURA 1.5 - Medicamentos aprovados entre 1981 e 2010 (NEWMAN & CRAGG, 2012). S – sintéticos; SPN – sintéticos contendo farmacoforos de PN; PN – produtos naturais; PNB – produtos naturais botânicos; PNM - produtos naturais modificados.	18
FIGURA 4.1 - Esquema de representação dos ensaios em solução utilizando a enzima CatD e o substrato fluorogênico S-MOCAc.....	33
FIGURA 4.2 - Sistema multidimensional utilizado com o CatD-IMER na primeira dimensão (eluente A: tampão B, vazão: 0,05 mL min ⁻¹) e uma coluna C18 Luna-Phenomenex® (100 Å, 5 μ m, 10 x 0,46 cm) na segunda (eluente B: ACN:H ₂ O + 0,1% TFA – 39:61, vazão: 0,5 mL min ⁻¹).	38
FIGURA 5.1 - Esquema do sistema cromatográfico multidimensional utilizado com representação da válvula de transferência na “posição 1” (desacoplada → nessa posição tanto o CatD-IMER quanto a coluna analítica C18 estão sendo condicionados e os eluentes estão sendo descartados); e posição 2” (acoplada → nessa posição os analitos que passam pelo CatD-IMER ou são produzidos por ele são transferidos para a coluna analítica C18 para serem separados).....	56
FIGURA 5.2 - Cromatograma referente à injeção do MOCAc no sistema cromatográfico contendo apenas um capilar vazio ligado ao detector. Fase móvel: tampão B, vazão: 0,05 mL min ⁻¹ . Detecção por fluorímetro com λ_{ex} = 328 nm e λ_{em} = 393 nm.....	57
FIGURA 5.3 - Cromatogramas referentes à injeção de MOCAc (A) e substrato S-MOCAc (B) no sistema cromatográfico utilizando uma coluna C18 Luna-Phenomenex® (100 Å, 5 μ m, 10 x 0,46 cm), eluente: ACN:H ₂ O + 0,1% TFA – 39:61, vazão: 0,5 mL min ⁻¹).	57

FIGURA 5.4 - Cromatograma da separação obtida entre o substrato e produto da clivagem. Primeira dimensão: CatD-IMER (40 cm x 100 μ m d.i.), vazão 0,05 mL min ⁻¹ , eluente: tampão B. Segunda dimensão: coluna C18 Luna-Phenomenex [®] (100 Å , 5 μ m, 10 x 0,46 cm d.i.), vazão: 0,5 mL min ⁻¹ , eluente: ACN:H ₂ O + 0,1% TFA – 39:61, detecção por fluorímetro com λ_{ex} = 328 nm e λ_{em} = 393 nm.....	58
FIGURA 5.5 - Cromatograma da mistura de ácidos graxos de RRFH-DCM-Ace.....	65
FIGURA 5.6 - Cromatogramas referentes à injeção de amostras proveniente de SOF no CatD-IMER.	69
FIGURA 5.7 - Cromatogramas referentes à análise de inibição da pepstatina A e reativação do CatD-IMER.....	79
FIGURA 5.8 - Ligações de hidrogênio entre catepsina D e pepstatina. Figura adaptada de BALDWIN et al. (1993).	80
FIGURA 5.9 - Espectro de RMN de ¹ H do composto evolitrina (CDCl ₃ , 400 MHz). .	82
FIGURA 5.10 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H do composto evolitrina (CDCl ₃ , 400 MHz).....	82
FIGURA 5.11 - Espectro de COSY do composto evolitrina (CDCl ₃ , 400 MHz).	83
FIGURA 5.12 - Mapa de correlações HSQC do composto evolitrina (CDCl ₃ , 400 MHz).....	83
FIGURA 5.13 - Mapa de correlações HMBC do composto evolitrina (CDCl ₃ , 400 MHz).....	84
FIGURA 5.14 - Espectro de RMN de ¹ H do composto 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído (CDCl ₃ , 400 MHz).....	85
FIGURA 5.15 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H do composto 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído (CDCl ₃ , 400 MHz).....	86
FIGURA 5.16 - Espectro de COSY do composto 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído (CDCl ₃ , 400 MHz).....	86
FIGURA 5.17 - Mapa de correlações HSQC do composto 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído (CDCl ₃ , 400 MHz).....	87
FIGURA 5.18 - Espectro de RMN de ¹ H do composto orientina (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).	88
FIGURA 5.19 - Espectro de COSY do composto orientina (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)....	89
FIGURA 5.20 - Mapa de correlações HSQC do composto orientina (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	90

FIGURA 5.21 - Espectro de RMN de ^1H do composto isovitexina (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	93
FIGURA 5.22 - Espectro de COSY do composto isovitexina (DMSO- d_6 , 400 MHz). 93	
FIGURA 5.23 - Mapa de correlações HSQC do composto isovitexina (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	94
FIGURA 5.24 - Mapa de correlações HMBC do composto isovitexina (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	95
FIGURA 7.1 - Representação de um cristal de quartzo revestido com ouro nas faces superior e posterior.....	105
FIGURA 7.2 - Representação de um circuito oscilador (A) ligado a um contador de frequência (frequencímetro) e um computador (B) para obtenção e tratamento dos dados.....	105
FIGURA 7.3 - Representação da estrutura de uma monocamada formada.	106
FIGURA 9.1 - Célula de medida do cristal de quartzo.	113
FIGURA 10.1 - Gel de SDS-Tricina-PAGE para análise da hidrólise da Hb pela CatD. “P” representa os padrões do gel de tricina com suas respectivas massas em kDa. Hb representa a hemoglobina humana. Os números 1, 2, 3 e 20 representam uma, duas, três e vinte horas de reação, respectivamente. CatD representa a enzima catepsina D bovina. As setas vermelhas indicam as bandas dos dímeros e monômeros da Hb humana e a seta azul indica as bandas dos peptídeos formados na reação de hidrólise da Hb pela CatD.	127
FIGURA 14.1 - Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma</i> sp.....	151
FIGURA 15.1 - Gel de agarose de amostras provenientes da amplificação da das formas curta (A) e longa (B) de SmCD1.	155
FIGURA 15.2 - Possibilidades de posição do inserto e das enzimas de restrição na sequência do plasmídeo.....	156
FIGURA 15.3 - Gel de agarose do inserto+plasmídeo digerido com a enzima SacI.	156
FIGURA 15.4 - Gel de agarose do inserto+plasmídeo digerido com a enzima KpnI.	157
FIGURA 15.5 - Análise por SDS-PAGE das amostras dos extratos solúvel e total de cultura de células <i>E. coli ArcticExpress</i> (DE3) induzidas com $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de IPTG para expressão da forma longa de SmCD1.....	159

FIGURA 15.6 - Análise por SDS-PAGE-western blot das amostras dos extratos solúvel e total de cultura de células <i>E. coli ArcticExpress</i> (DE3) induzidas com 0,4 mmol L ⁻¹ de IPTG para expressão da forma longa de SmCD1.	160
FIGURA 15.7 - Estrutura dos compostos que apresentaram bons resultados nos ensaios <i>in vitro</i> com esquistossômulos de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações.	162
FIGURA 15.8 – Ensaios <i>in vitro</i> de esquistossômulos em placa de 96 poços. A) Controle negativo; B) Composto cedrelona (10 µmol L ⁻¹); C e D) Composto dictamina (50 µmol L ⁻¹).	163
FIGURA 15.9 – Ensaios <i>in vitro</i> de esquistossômulos em placa de 96 poços. A) Extrato A2CD; B) Extrato SOF-Hex. Ambos a 50 µg mL ⁻¹	163
FIGURA 15.10 - Estrutura dos compostos que apresentaram bons resultados nos ensaios <i>in vitro</i> com vermes adultos de <i>S. mansoni</i> a uma concentração final de 20 µmol L ⁻¹	164
FIGURA 15.11 – Ensaios <i>in vitro</i> com adultos de vermes de <i>S. mansoni</i> em placa de 24 poços. A e C) Composto cedrelona 20 µmol L ⁻¹ (24 horas e 48 horas, respectivamente); B) Composto dictamina 20 µmol L ⁻¹ (24 horas) e D) Extrato A2CD 50 µg mL ⁻¹ (72 horas).	165

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Exemplos de inibidores enzimáticos utilizados em usos clínicos (COPELAND, 2005).	3
TABELA 1.2 - Lista de doadores e receptores utilizados em substratos enzimáticos do tipo FRET.	10
TABELA 4.1 - Preparo dos tampões utilizados nos diferentes ensaios enzimáticos com o CatD-IMER, a catepsina D e EPV.....	31
TABELA 4.2 - Preparo das soluções dos ensaios de inibição enzimática utilizando a enzima CatD e substrato fluorogênico.....	32
TABELA 4.3 - Preparo das soluções dos ensaios de inibição enzimática utilizando EPV e substrato fluorogênico.	36
TABELA 4.4 - Condições cromatográficas do sistema multidimensional utilizando o CatD-IMER e coluna C18 Luna-Phenomenex® (100 Å, 5 µm, 10 x 0,46 cm), na primeira e segunda dimensão, respectivamente.	40
TABELA 4.5 - Relação de espécies de plantas selecionadas para estudo.	44
TABELA 5.1 - Valores de precisão e exatidão intra e inter-dias do método desenvolvido para quantificação de MOCAc produzido pelo CatD-IMER.	60
TABELA 5.2 - Identificação dos ácidos graxos identificados por CG-EM, presentes na fração RRFH-DCM-Ace.....	66
TABELA 5.3 - Porcentagem de inibição de alcaloides testados frente à CatD a 200 µmol L ⁻¹	72
TABELA 5.4 - Porcentagem de inibição de flavanonas testadas frente à CatD a 200 µmol L ⁻¹	73
TABELA 5.5 - Porcentagem de inibição de flavonas e isoflavonas testadas frente à CatD a 200 µmol L ⁻¹	74
TABELA 5.6 - Porcentagem de inibição de flavonóis testados frente à CatD a 200 µmol L ⁻¹	75
TABELA 5.7 - Porcentagem de inibição de cumarinas testadas frente à CatD a 200 µmol L ⁻¹	76
TABELA 5.8 - Porcentagem de inibição de limonoides testados frente à CatD a 200 µmol L ⁻¹	77

TABELA 5.9 - Porcentagem de inibição de diversas classes de compostos isolados de produtos naturais e compostos sintéticos testados frente à CatD a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$	78
TABELA 5.10 - Dados de RMN de ^1H do composto evolitrina.....	84
TABELA 5.11 - Dados de RMN de ^1H do composto 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído.	87
TABELA 5.12 - Dados de RMN de ^1H do composto orientina.	91
TABELA 5.13 - Dados de RMN de ^{13}C do composto orientina.....	92
TABELA 5.14 - Dados de RMN de ^1H do composto isovitexina.	96
TABELA 5.15 - Dados de RMN de ^{13}C do composto isovitexina.....	97
TABELA 9.1 - Condições utilizadas para realização de experimentos em QCM utilizando a CatD e a Hb imobilizada em cristal de quartzo.....	116
TABELA 10.1 - Parâmetros cinéticos de hidrólise da Hb humana pela CatD obtidos com a QCM.	125
TABELA 10.2 - Dados de D.O. ²⁸⁰ obtidos com ensaios enzimáticos em solução utilizando CatD e Hb e leitura de solução coletada da QCM com Hb imobilizada..	130

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 5.1 - Gráfico de K_M para a CatD em solução.....	53
GRÁFICO 5.2 - Curva analítica do MOCAc obtido com a injeção de diferentes concentrações de MOCAc no sistema multidimensional utilizando uma coluna analítica C18 Luna-Phenomenex® (100 Å, 5 µm, 10 x 0,46 cm) na segunda dimensão, eluente: ACN:H ₂ O + 0,1% TFA – 39:61, vazão: 0,5 mL min ⁻¹ , detecção por fluorímetro com λ_{ex} = 328 nm e λ_{em} = 393 nm.	59
GRÁFICO 5.3 - Hipérbole de Michaelis-Menten (B) construída a partir da variação da injeção de diferentes concentrações de S-MOCAc no sistema multidimensional (A).	61
GRÁFICO 5.4 - Gráfico com resultados dos ensaios dos extratos de plantas selecionadas (125 µg mL ⁻¹) frente à CatD, EV e CatD-IMER utilizando o substrato S-MOCAc.....	64
GRÁFICO 5.5 - Gráfico com resultados dos ensaios das frações obtidas de RRFH frente à CatD em solução e CatD-IMER utilizando o substrato S-MOCAc. Ambos os ensaios foram realizados utilizando-se as frações na concentração de 125 µg mL ⁻¹	65
GRÁFICO 5.6 - Gráfico com resultados dos ensaios em solução das frações obtidas de A2CD frente à enzima CatD utilizando o substrato S-MOCAc. Os ensaios foram realizados utilizando-se as frações na concentração de 125 µg mL ⁻¹	67
GRÁFICO 5.7 - Gráfico com resultados dos ensaios das partições líquido-líquido do extrato SOFE frente à CatD, EV e CatD-IMER utilizando o substrato S-MOCAc....	68
GRÁFICO 5.8 - Gráfico com resultados dos ensaios em solução das frações obtidas de SOF-AC frente à enzima CatD utilizando o substrato S-MOCAc.	68
GRÁFICO 10.1 - Curva típica que representa a variação da frequência em função do tempo respondendo à adição de 1,5 mg mL ⁻¹ de Hb humana (tampão PBS, pH 7,2) em monocamada de cristal de quartzo e analisada por QCM.....	122
GRÁFICO 10.2 - Gráfico da variação de frequência em resposta à adição de diferentes concentrações de CatD (0,76x10 ⁻⁸ , 2,17x10 ⁻⁸ , 4,57x10 ⁻⁸ , 7,61x10 ⁻⁸ , 10,7x10 ⁻⁸ mol L ⁻¹). A célula da QCM continha 924 µL de tampão formiato (0,05 mol L ⁻¹ , pH 3,8), 45 µl de DMSO e 6 µL de solução de BSA (2% m/v de H ₂ O) com a Hb imobilizada, 1,5 mg mL ⁻¹	123

GRÁFICO 10.3 - Curva analítica da variação de frequência em função da concentração de CatD ($0,76 \times 10^{-8}$, $2,17 \times 10^{-8}$, $4,57 \times 10^{-8}$, $7,61 \times 10^{-8}$, $10,7 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹) na célula da QCM contendo Hb humana imobilizada.....	124
GRÁFICO 10.4 - Gráfico da variação e frequência em resposta à adição de solução de CatD (rosa) e: pepstatina A (vermelho), A2CD (azul), A2CH (laranja) e Evolitrine (verde) (concentrações finais: 5 mmol L ⁻¹ , 125 mmol L ⁻¹ , 125 mmol L ⁻¹ e 546 mmol L ⁻¹ , respectivamente). A célula da QCM continha 924 µL de tampão formiato (0,05 mol L ⁻¹ , pH 3,8), 45 µL de DMSO e 6 µL de solução de BSA (2% m/v de H ₂ O) e a Hb imobilizada.....	128
GRÁFICO 10.5 - Curva analítica da absorvância obtida em função da variação da concentração de Hb (0.6, 0.9, 1.5, 2.1, 2.7, 3.0, 3.5, 4.0 e 4.5 mg mL ⁻¹) utilizando UV/Vis.....	129

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1 - Fluxograma ilustrativo do fracionamento realizado com RRFH.....	45
ESQUEMA 4.2 - Fluxograma ilustrativo do fracionamento realizado com A2CD.	47
ESQUEMA 4.3 - Extração líquido-líquido realizada com o extrato SOFE.	48
ESQUEMA 4.4 - Fluxograma ilustrativo do fracionamento realizado com SOF-AC.	49

RESUMO

ESTUDO DE NOVAS METODOLOGIAS PARA REALIZAÇÃO DE ENSAIOS COM A CATEPSINA D NA BUSCA DE INIBIDORES. A catepsina D é uma aspartil endopeptidase envolvida em muitos processos patológicos quando expressa de forma desregulada. Além disso, é responsável pela degradação da hemoglobina ingerida por parasitos causadores da esquistossomose. Por esses motivos a catepsina D é considerada um alvo importante na busca de inibidores. Os ensaios comumente realizados para avaliação da inibição dessa enzima monitoram produtos reacionais gerados a partir da clivagem de substratos peptídicos fluorogênicos ou a hemoglobina humana, na presença de inibidores, que podem apresentar autofluorescência/absorbância nos mesmos comprimentos de onda utilizados. Considerando esta problemática, este trabalho apresenta o desenvolvimento e aplicação de quatro metodologias para a realização de ensaios com a catepsina D. Em duas metodologias os ensaios são realizados em solução, sendo que, em uma delas utiliza-se a catepsina D bovina isolada, e na outra se emprega um extrato de proteínas retirado de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Um terceiro ensaio foi desenvolvido para estudo de inibidores por meio do biorreator CatD-IMER acoplado a um sistema multidimensional no qual é possível monitorar a atividade da enzima imobilizada diretamente por meio da quantificação do produto formado. Por fim, a última metodologia foi desenvolvida imobilizando-se o substrato hemoglobina humana em cristal de quartzo. Sua hidrólise pela catepsina D foi avaliada por meio do uso da técnica de Microbalança de Cristal de Quartzo, uma metodologia que monitora a atividade enzimática através de variações de massa. Nos ensaios enzimáticos foram avaliados 20 extratos de plantas, que levaram ao isolamento e identificação do alcaloide evolitrina, do composto 4-hidroxi-3-metoxicinamaldeído e dos flavonoides orientina e isovitexina. 31 compostos puros também foram ensaiados e, dentre estes, a substância (Z)-2-(pentadec-5-enil)benzeno-1,4-diol se destacou apresentando uma atividade expressiva tanto frente à enzima isolada quanto em relação ao extrato de proteínas de *S. mansoni*. Para finalizar, a catepsina D recombinante de *S. mansoni* foi clonada e expressa em sistema *E. coli*, e ensaios *in vitro* com compostos isolados de produtos naturais mostraram excelentes resultados em relação ao limonoide cedrelona frente à esquistossômulos e vermes adultos de *S. mansoni*.

ABSTRACT

STUDY OF NEW METHODOLOGIES FOR CATHEPSIN D ASSAYS IN THE SEARCH FOR INHIBITORS. Cathepsin D is an aspartyl endopeptidase involved in many pathological processes when overexpressed. In addition, it is responsible for degradation of hemoglobin ingested by parasites of schistosomiasis. For these reasons cathepsin D is considered an important target for chemotherapeutic intervention. The assays commonly performed to evaluate the inhibition of this enzyme monitor reaction products generated from the cleavage of fluorogenic peptide substrates or human hemoglobin in the presence of inhibitors that may exhibit autofluorescence/absorbance at the same wavelength used. Considering this problem, this paper presents the development and application of four methodologies for cathepsin D assays. In two methodologies the assays were performed in solution, and in one of them was used isolated bovine cathepsin D, and the other employed an extract of proteins taken from *Schistosoma mansoni* adult worms. A third assay was developed to evaluate inhibitors by means of a CatD-IMER bioreactor coupled to a multidimensional system in which it is possible to monitor the immobilized enzyme activity directly by quantifying the product formed. Finally, the last methodology was carried out by immobilizing the substrate human hemoglobin in the quartz crystal. The hydrolysis of hemoglobin by cathepsin D was evaluated by using a Quartz Crystal Microbalance technique, a method that monitor the enzyme activity by mass variations. For the enzymatic assays, twenty plant extracts were evaluated, which led to the isolation and identification of the alkaloid evolitrine, the compound 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde and the flavonoids orientin and isovitexina. It were also tested 31 pure compounds, among them, the substance (*Z*)-2-(pentadec-5-enyl)benzene-1,4-diol, which showed significant activity both against the isolated enzyme as the protein extract of *S. mansoni*. Finally, recombinant cathepsin D from *S. mansoni* was cloned and expressed using *E. coli* system, and *in vitro* studies of isolated natural product compounds showed excellent results regarding the limonoid cedrelona against somules and adult worms of *S. mansoni*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1	Enzimas como alvos terapêuticos.....	3
1.2	Proteases.....	4
1.3	Aspartil Proteases.....	5
1.4	Catepsina D	7
1.4.1	Catepsina D e a esquistossomose.....	8
1.5	Ensaio de atividade e inibição com proteases – Métodos de detecção	9
1.5.1	Ensaio para avaliação de inibidores da catepsina D.....	10
1.5.1.1	Substratos utilizados em ensaios com a catepsina D	11
1.6	Cinética enzimática	13
1.7	Inibidores enzimáticos	16
1.8	Produtos naturais.....	17
	Parte I. Desenvolvimento e aplicação de biorreatores para a triagem de inibidores de Catepsina D por CLAE	21
2	INTRODUÇÃO.....	21
2.1	A imobilização.....	22
2.2	Ensaio cromatográfico.....	23
3	OBJETIVOS	26
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.1	Materiais e Métodos.....	28
4.2	Instrumentação	29
4.3	Ensaio bioquímico com a enzima catepsina D e o substrato S-MOCAC	31
4.3.1	Preparo de tampões utilizados nos ensaios enzimáticos.....	31
4.3.2	Ensaio em solução com a catepsina D	31
4.3.2.1	Determinação experimental de K_M	33

4.3.2.2	Ensaio de inibição frente à CatD em solução.....	33
4.3.2.3	Determinação da potência dos inibidores (IC ₅₀)	34
4.3.3	Ensaio em solução com extrato de vermes de <i>S. mansoni</i>	34
4.3.3.1	Preparo da solução de extrato de vermes de <i>S. mansoni</i>	34
4.3.3.2	Ensaio de inibição com o extrato de vermes de <i>S. mansoni</i>	35
4.3.4	Desenvolvimento e aplicação do CatD-IMER	36
4.3.4.1	Pré-tratamento do capilar de sílica fundida.....	36
4.3.4.2	Imobilização da CatD em capilar de sílica fundida.....	37
4.3.4.3	Preparo das fases móveis utilizadas no sistema de CLAE	37
4.3.4.4	Preparo das soluções de substrato e produto utilizados no desenvolvimento do método analítico	38
4.3.4.5	Preparo das soluções de MOCAc utilizados na curva de calibração e validação do método	39
4.3.4.6	Construção da curva analítica para quantificação de MOCAc produzido pelo CatD-IMER	39
4.3.4.7	Obtenção dos parâmetros cinéticos enzimáticos com uso do CatD-IMER	41
4.3.4.8	Estudos de inibição do CatD-IMER.....	42
4.4	Extratos e compostos isolados utilizados nos ensaios enzimáticos.....	43
4.4.1	Material botânico.....	43
4.4.2	Obtenção dos extratos de plantas	43
4.4.3	Estudo do extrato hexânico das folhas de <i>Rauia resinosa</i> (RRFH)	45
4.4.3.1	Derivatização da fração RRFH-DCM-Ace e análise por CG-EM	46
4.4.4	Estudo do extrato diclorometano do caule de <i>Almeidea</i> sp. (A2CD)	46
4.4.5	Estudo do extrato etanólico das folhas de <i>Spiranthera odoratissima</i> (SOFE)	47
4.4.5.1	Estudo da fração acetato de etila das folhas de <i>Spiranthera odoratissima</i> (SOF-AC)	48
4.4.6	Outras espécies de plantas e enzimas estudadas.....	49

4.4.7	Triagem de compostos puros.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1	Ensaio em solução com a catepsina D bovina e o substrato S-MOCAC	53
5.1.1	Determinação da constante de Michaelis-Menten, K_M	53
5.2	Imobilização da enzima CatD em capilar de sílica fundida e análise por CLAE	54
5.2.1	Imobilização da enzima em capilares de sílica fundida	54
5.2.2	Desenvolvimento do método analítico para monitoramento da atividade do CatD-IMER	55
5.2.3	Validação do método analítico para a quantificação de MOCAC obtido pelo CatD-IMER	59
5.2.4	Estudo cinético do CatD-IMER	60
5.2.5	Estabilidade e reprodutibilidade do CatD-IMER.....	62
5.2.6	Triagem de inibidores utilizando o CatD-IMER	62
5.3	Resultados dos ensaios de inibição em solução e com o CatD-IMER..	63
5.3.1	Extratos de plantas	63
5.3.1.1	Extrato de <i>Rauia resinosa</i> (RRFH)	64
5.3.1.2	Extrato de <i>Almeidea</i> (A2CD).....	66
5.3.1.3	Extrato de <i>Spiranthera odoratissima</i> (SOFE).....	67
5.3.2	Inibidores inespecíficos.....	70
5.3.3	Triagem de substâncias puras utilizando a catepsina D em solução e o CatD-IMER	71
5.3.3.1	Alcaloides	71
5.3.3.2	Flavonoides e derivados	72
5.3.3.3	Cumarinas	75
5.3.3.4	Limonoides.....	76
5.3.3.5	Outras classes de compostos de produtos naturais e compostos sintéticos	77

5.3.4	Análise da inibição do composto pepstatina A utilizando o CatD-IMER 79	
5.4	Elucidação estrutural das substâncias isoladas.....	81
A.	Substância 4 - evolitrina.....	81
B.	Substância 27 – 4-hidroxi-3-metoxicinamaldeído	85
C.	Substância 12 – orientina	88
D.	Substância 13 - isovitexina	92
6	CONCLUSÕES.....	99
Parte II. Estudo da hidrólise da hemoglobina humana pela Catepsina D por meio da técnica de Microbalança em Cristal de Quartzo.....		
7	INTRODUÇÃO.....	103
7.1	Microbalança de Cristal de Quartzo.....	103
7.2	Utilização da QCM na obtenção de parâmetros cinéticos de biossensores enzimáticos.....	107
8	OBJETIVOS	110
9	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	112
9.1	Materiais e Métodos.....	112
9.2	Instrumentação	112
9.3	Tampões utilizados na QCM.....	113
9.4	Imobilização do substrato hemoglobina humana em cristal de quartzo....	113
9.4.1	O sistema de QCM e cristais piezelétricos	113
9.4.2	Limpeza do cristal	114
9.4.3	Formação da monocamada auto-organizada e imobilização da Hb humana	114
9.4.4	Realização de ensaios enzimáticos na QCM.....	115
9.4.4.1	Construção da curva na QCM.....	115
9.4.4.2	Ensaio de inibição na QCM.....	116
9.4.4.3	Cálculo dos parâmetros cinéticos (K_d e k_{cat}) utilizando a QCM.....	117

9.4.5	Hidrólise da Hb pela CatD em solução monitorada por SDS-Tricina-PAGE	118
9.4.6	Ensaio em solução utilizando espectrofotômetro de UV/Vis	118
10	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	121
10.1	Imobilização do substrato Hb e análise por QCM	121
10.2	Clivagem da Hb imobilizada pela catepsina D monitorada por QCM..	123
10.3	Hidrólise da Hb pela CatD em solução monitorada por SDS-Tricina-PAGE	126
10.4	Ensaio de inibição da CatD realizadas em QCM	128
10.5	Ensaio enzimático monitorado por espectrofotômetro de UV/Vis..	129
11	CONCLUSÕES.....	132
Parte III. Estudos bioquímicos das enzimas catepsina D e B de <i>S. mansoni</i> e realização de ensaios <i>in vitro</i>.....		
12	INTRODUÇÃO.....	135
13	OBJETIVOS	138
14	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	140
14.1	Bioinformática	140
14.2	SDS-PAGE	140
14.3	Imunoblots	140
14.4	Estimativa do conteúdo protéico	141
14.5	Eletroforese em gel de agarose	141
14.6	Sequenciamento de DNA	141
14.7	Clonagem e expressão da SmCD.....	142
14.7.1	Desenho dos oligonucleotídeos (primers).....	142
14.7.2	Otimização das condições de PCR.....	142
14.7.3	Eletroforese em gel de agarose	143
14.7.4	Clonagem em vetores de passagem (pGem®-T Easy)	143
14.7.4.1	Ligação do produto de PCR em vetor pGem®-T Easy	143

14.7.4.2	Transformação e seleção dos clones positivos.....	144
14.7.5	Clonagem em vetores de expressão pET-45b(+)	144
14.7.5.1	Digestão do inserto e do plasmídeo e purificação dos fragmentos.....	144
14.7.5.2	Ligação, Transformação em <i>E. coli</i> DH5 α , seleção dos clones positivos e preparação dos plasmídeos	145
14.7.6	Correção do clone pET-45b(+)/proSmCD1 por Mutagênese sítio-dirigida	146
14.7.7	Expressão em <i>E. coli</i> “ArcticExpress Competent Cells” (DE3)	147
14.7.7.1	Transformação do clone pET-45b(+)/proSmCD1 corrigido em células competentes ArcticExpress (DE3).....	147
14.7.7.2	Teste de indução do clone pET-45b(+)/proSmCD1 corrigido em células competentes ArcticExpress (DE3).....	148
14.8	Trans-ativação da enzima recombinante SmCB1 de <i>S. mansoni</i>	148
14.9	Ensaio <i>in vitro</i> com vermes adultos e esquistossômulos de <i>S. mansoni</i>	150
14.9.1	Esquistossômulos	151
14.9.2	Vermes adultos	152
15	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	155
15.1	Clonagem das formas longa e curta do zimogênio de SmCD1	155
15.1.1	Clonagem em vetor pGem [®] -T Easy e sequenciamento.....	155
15.1.2	Estudo da expressão forma longa de SmCD1 em <i>E. coli</i> “ArcticExpress Competent Cells” (DE3)	159
15.2	Trans-ativação da enzima recombinante CB1 de <i>S. mansoni</i>	161
15.3	Ensaio <i>in vitro</i> com vermes adultos e esquistossômulos de <i>S. mansoni</i>	162
15.3.1	Esquistossômulos	162
15.3.2	Vermes adultos	164
16	CONCLUSÕES.....	167
17	CONCLUSÕES GERAIS	169

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Enzimas como alvos terapêuticos

Enzimas são essenciais para os seres vivos, porém, sua atividade desregulada, mutações em sua estrutura ou o envolvimento no metabolismo de parasitos, cuja função é vital para sua sobrevivência, as tornam alvos estratégicos extremamente atrativos na busca por intervenções terapêuticas.

Esse fato é demonstrado pelo grande número de inibidores enzimáticos utilizados atualmente, conforme alguns exemplos selecionados na TABELA 1.1.

TABELA 1.1 - Exemplos de inibidores enzimáticos utilizados em usos clínicos (COPELAND, 2005).

Composto	Enzima-alvo	Uso clínico
Aciclovir	DNA viral polimerase	Herpes
Amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir	HIV protease	AIDS
Alopurinol	Xantina oxidase	Gota
Aspirina®	Ciclooxigenase	Dor, febre
Fluorouracil	Timidilato sintase	Câncer
Lovastatina	HMG-CoA redutase	Regulador do colesterol
Norfloxacina	DNA girase	Infecções urinárias
Omeprazol	H ⁺ , K ⁺ ATPase	Úlceras gástricas

A atratividade das enzimas como alvos terapêuticos resulta não só da essencialidade da sua atividade catalítica, mas também do fato de que as enzimas podem ser utilizadas em ensaios biológicos e inibidas por moléculas de baixa massa molecular, o que facilita, principalmente, a penetração em membranas celulares (COPELAND, 2005).

1.2 Proteases

Uma classe de enzimas bastante significativa no estudo de alvos terapêuticos são as proteases. Essa denominação - protease - refere-se a um grupo de enzimas cuja função catalítica é hidrolisar ligações peptídicas, muito estáveis sob determinadas condições, porém, quando uma enzima catalisa esta reação, há uma eficiência energética muito grande (BABINE & BENDER, 1997).

As proteases podem ser do tipo endo, quando clivam ligações no meio de cadeias peptídicas, como as catepsinas B, D e L, ou exo, quando clivam ligações nas extremidades da cadeia, como a catepsina C.

O estudo das proteases se iniciou com o interesse na digestão proteica dos seres humanos, como as enzimas presentes no pâncreas e no estômago. Porém, descobriu-se que estas enzimas estavam envolvidas em muitos outros processos fisiológicos, gerando implicações biológicas diversas. Por esse motivo, as proteases possuem alta especificidade com seus substratos, mas sua atividade precisa ser cuidadosamente controlada pela célula por diversos fatores que envolvem a regulação de sua expressão, atuação e ações que garantam a especificidade e disponibilidade do seu substrato nas células (BENES et al., 2008, DAVIES, 1990).

A especificidade dessas proteases por seus substratos foi descrita pela primeira vez por SCHECHTER & BERGER (1967). Utilizando a papaína como modelo, eles concluíram que essa endopeptidase possui um sítio ativo extenso com aproximadamente 25 Å que pode ser dividido em 7 subsítios, localizados em ambos os lados do sítio catalítico, cada um acomodando 1 resíduo de aminoácido do substrato peptídico. Os resíduos C-terminais e N-terminais do substrato que interagem com o sítio catalítico da enzima são classificados como P1', P2', P3' e P1, P2, P3, respectivamente. Da mesma forma, cada subsítio de reconhecimento da proteína pelo substrato é denominado como S1', S2', S3' e S1, S2, S3 (SCHECHTER & BERGER, 1967).

A similaridade na sequência catalítica, incluindo seus sítios e subsítios, é que estabelece a classificação dessas enzimas, alocadas em famílias evolutivas, agrupadas em clãs que mostram algum sinal de relação distante, e determinadas principalmente pelo mecanismo catalítico (RAWLINGS & BARRETT, 1993). E,

portanto, foram divididas em 4 grupos catalíticos: metalo, aspartil, serinil e cisteinil proteases.

1.3 Aspartil Proteases

As aspartil proteases pertencem ao clã AA das peptidases, e a maior parte são monoméricas, consistindo em uma cadeia simples de 330 aminoácidos formando dois domínios com o sítio ativo localizado entre eles (DAVIES, 1990). As aspartil proteases são sintetizadas como zimogênios inativos, com um segmento N-terminal (de aproximadamente 45-55 resíduos de aminoácidos) que é clivado durante sua ativação (DUNN, 2002).

Todas as aspartil proteases da família A1 do clã AA, homólogas à pepsina, apresentam ótima atividade catalítica em pH ácido (3-5) e são inibidas por pepstatinas, peptídeos isolados pela primeira vez de *Streptomyces* sp. (AOYAGI et al., 1971, KNIGHT & BARRETT, 1976, MARCINISZYN et al., 1976, UMEZAWA et al., 1970). A análise de inibidores deste tipo forneceu a base para a proposta de possíveis mecanismos catalíticos, porém, não são utilizadas em processos terapêuticos, pois não há seletividade no seu processo de inibição. Um exemplo de pepstatina é a do tipo A, apresentando um $K_i = 56$ pM em relação à pepsina (FIGURA 1.1).

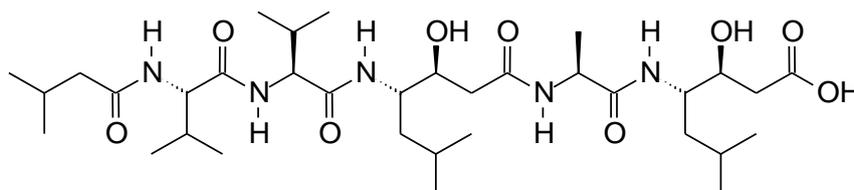


FIGURA 1.1 - Molécula de pepstatina A, um inibidor potente de aspartil proteases.

Essas peptidases possuem dois resíduos de ácido aspártico (Asp 32 e 215) em seu sítio catalítico e necessitam de uma molécula de água, ligada às carboxilas ativas, para a realização do mecanismo, que por muito tempo foi controverso, e atualmente é elucidado por meio de estruturas de raio-X de alta resolução e RMN (COATES et al., 2006, DAVIES, 1990, DUNN, 2002, FOUNDLING et al., 1987, PEARL, 1987).

A proposição do seu mecanismo catalítico se consolidou em 1992, com VEERAPANDIAN e colaboradores (1992). Além deste grupo de pesquisa, em todas

as propostas, o resíduo Asp²¹⁵ atua como uma base para remover um próton de uma molécula de água, enquanto Asp³² doa um próton ao oxigênio carbonílico da ligação peptídica, conforme mecanismo demonstrado na FIGURA 1.2.

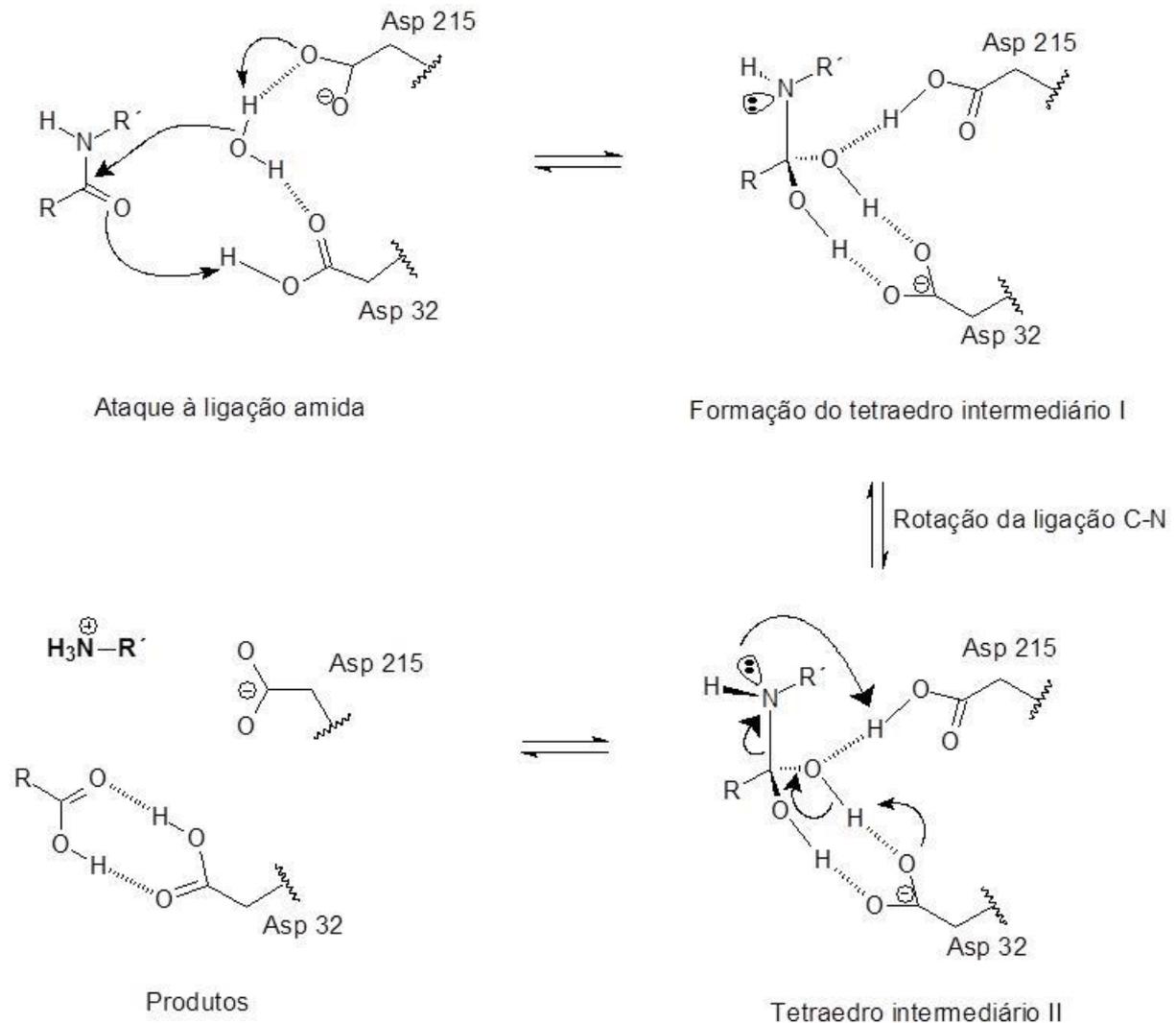


FIGURA 1.2 - Mecanismo de clivagem proteolítica da ligação amida por aspartil proteases (VEERAPANDIAN et al., 1992).

A primeira etapa do mecanismo proposto inicia-se com o ataque nucleofílico da água à carbonila da ligação peptídica do substrato. Este ataque é acompanhado por um rearranjo do próton carboxílico do Asp³² com o oxigênio da carbonila do substrato e do ataque ao próton da água pelo oxigênio da carboxila do resíduo Asp²¹⁵, formando um intermediário tetraédrico. Na segunda etapa, o intermediário chamado *gem*-diolamina (intermediário II) é formado pela inversão do

nitrogênio e rotação de 60° da ligação C–N, para que o mesmo fique exposto para a subsequente protonação pelo Asp²¹⁵, agora protonado.

1.4 Catepsina D

A catepsina D (EC 3.4.23.5), apresentada na FIGURA 1.3, é uma endopeptidase lisossomal cuja atividade é controlada por meio de alguns processos intracelulares que envolvem a sua formação, como a regulação da sua biossíntese, controle de modificações pós-translacionais, ativação da proenzima e regulação do pH lisossomal (BENES et al., 2008, GACKO et al., 2007). Quando esses fatores não são controlados, processos patológicos podem ocorrer devido à sua superexpressão ou desregulação, conforme demonstrados em estudos que associam a catepsina D a processos tumorais, como o de mama, e por isso compõe a classe de alvos na terapia deste câncer (BENES et al., 2008, GARCIA et al., 1996, LIAUDET-COOPMAN et al., 2006, MAYNADIER et al., 2013, ROCHEFORT et al., 2000).

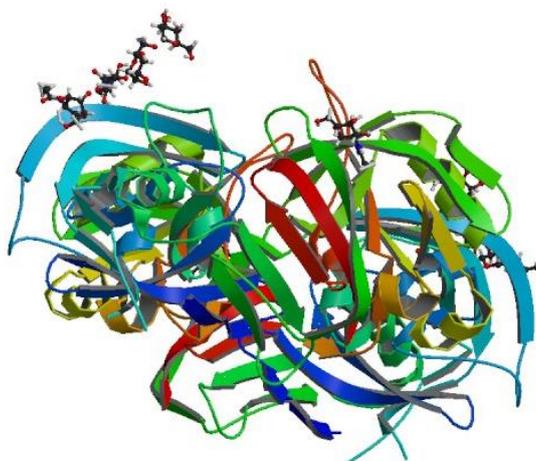


FIGURA 1.3 - Estrutura da catepsina D. Obtida do Protein Data Bank código 1-LYB.

Há relatos do seu envolvimento em processos degenerativos como a doença de Alzheimer (HAMAZAKI, 1996, HAQUE et al., 2008), de degradação de proteínas celulares, e está relacionada à ativação de outras proteínas (VANDERSTAPPEN et al., 1996). Faz parte da formação e desenvolvimento de alterações patológicas tais como estados inflamatórios, aterosclerose, trombooses intravasculares, apoptose, mutagêneses e proliferação neoplásica (BERCHEM et al., 2002, CHWIERALSKI et al., 2006, SIMON et al., 1994). Além disso, assume função

essencial em processos vitais de parasitos causadores de doenças, como o processo de digestão da hemoglobina ingerida por vermes de *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose (BRINDLEY et al., 2001, CAFFREY et al., 2004, CAFFREY et al., 2005).

1.4.1 Catepsina D e a esquistossomose

A esquistossomose, uma doença causada pelo parasita do gênero *Schistosoma*, é considerada uma das doenças endêmicas mais importantes e mais difundidas do mundo, estimando-se que infecte cerca de 200 milhões de indivíduos (OMS). Quatro espécies principais estão envolvidas na patogênese da esquistossomose, três das quais, *S. japonicum*, *S. interculatum* e *S. mansoni*, causam a esquistossomose intestinal, enquanto o quarto, *S. haematobium*, causa a esquistossomose urinária.

Apesar do teste de substâncias de diferentes classes nas últimas décadas, o medicamento Praziquantel continua a fazer parte do único tratamento para a doença em todo o mundo. Porém, relatos sobre o desenvolvimento de resistência a este medicamento implicam na necessidade do desenvolvimento de novos fármacos eficazes para o tratamento dessa doença (OMS)(ANDREWS, 1985).

Todos os tipos de esquistossomoses são causados por vermes veiculados por caramujos. O adulto de *S. mansoni*, tipo encontrado no Brasil, vive nas veias intestinais (sistema porta) e bexiga dos seres humanos, e os ovos que não chegam ao intestino podem refluir para o fígado, onde provocam focos de inflamação (PEARCE & MACDONALD, 2002).

O *Schistosoma* se alimenta do sangue do hospedeiro, e nele estão presentes as hemácias, que se constituem principalmente de hemoglobina (Hb), essencial para o desenvolvimento, crescimento e reprodução do parasito (BRINDLEY et al., 2001, CAFFREY et al., 2004). Após ingestão, as hemácias são lisadas pela ação da hemolisina dentro do esôfago dos parasitos e a Hb, uma proteína de ~ 64 kDa, deságua no intestino do *Schistosoma*, onde necessita de diversas proteases, sendo uma delas a catepsina D, para digeri-la em peptídeos menores ou aminoácidos livres (KASSCHAU et al., 1986). Estes peptídeos incorporam-se ao *Schistosoma* e, a hematina, produto final da digestão da Hb, é regurgitada pelo parasito e se acumula nos fígados dos hospedeiros infectados

(BRINDLEY et al., 1997). Portanto, considerando que essas proteases exercem funções essenciais para a sobrevivência do parasito, são consideradas potenciais alvos para intervenção quimioterápica. No caso da catepsina D, seu papel é integral na proteólise da Hb, que ocorre em todas as fases da esquistossomose humana.

1.5 Ensaios de atividade e inibição com proteases – Métodos de detecção

Em ensaios do tipo “*high-throughput screening*” (HTS), muito utilizados na busca e descoberta de novos fármacos, existem muitos fatores a serem considerados na escolha do método de detecção da reação enzimática, como velocidade, sensibilidade, custo e robustez, bem como o tipo de reação sob investigação e quais os produtos e/ou substratos que serão avaliados (ACKER & AULD, 2014).

No contexto das proteases, os ensaios são tipicamente realizados utilizando-se peptídeos marcados em técnicas do tipo “FRET” (do inglês, “*fluorescence resonance energy transfer*”) (FORSTER, 1959). Essa técnica baseia-se na transferência não radioativa de energia de um fluoróforo (ou doador) no seu estado excitado para um grupo “apagado” (ou receptor). O receptor absorve a energia emitida pelo fluoróforo apenas quando estão próximos, ligados pela cadeia peptídica. A separação entre o doador e o receptor por meio da proteólise da ligação peptídica resulta em um aumento na fluorescência (HAAS et al., 1975). Exemplos de doadores (fluoróforos) e receptores (grupos “apagados”) podem ser visualizados na TABELA 1.2.

TABELA 1.2 - Lista de doadores e receptores utilizados em substratos enzimáticos do tipo FRET.

Fluoróforo (doador)	Grupo “apagado” (receptor)	Referência
Abz (2-Aminobenzoíla)	Dnp (2,4-Dinitrofenila)	(CEZARI et al., 2002)
Abz (2-Aminobenzoíla)	EDDnp (N-(2,4-INITROFENIL)ETILENODIAMINA)	(ANDRAU et al., 2003)
Abz (2-Aminobenzoíla)	4-Nitro-Phe (4-Nitro-fenilalanina)	(TOTH & MARSHALL, 1990)
Abz (2-Aminobenzoíla)	3-Nitro-Tyr (3-Nitro-tirosina)	(BREDDAM & MELDAL, 1992)
N-Me-Abz (N-Metil-antraniloíla)	Dnp (2,4-Dinitrofenila)	(BICKETT et al., 1993)
Dansyl (5-Dimetilamino)naftaleno-1-sulfonila)	4-Nitro-Phe (4-Nitro-fenilalanina)	(FLORENTIN et al., 1984)
EDANS (5-[(2-Aminoetil)amino]-naftaleno-1-ácido sulfônico)	DABCYL (4-(4-Dimetilaminofenilazo)benzoíla)	(MATAYOSHI et al., 1990)
Lucifer Yellow (6-Amino-2,3-diidro-1,3-dioxo-2-hidrazinocarbonilamino-1Hbenz[d,e]isoquinolina-5,8-ácido dissulfônico)	Dabsyl (4-(4-Dimetilaminofenilazo)-benzenosulfonila)	(GRUNINGER-LEITCH et al., 2002)
MOCAC, MCA, AMC (ácido(7-metoxicumarina-4-il)acético, 7-amino-4-metilcumarina)	Dnp (2,4-Dinitrofenila)	(BASU et al., 2009, SEMASHKO et al., 2014, YASUDA et al., 1999)
Trp (Triptofano)	Dnp (2,4-Dinitrofenila)	(CEZARI et al., 2002)

1.5.1 Ensaios para avaliação de inibidores da catepsina D

A identificação de potenciais inibidores de aspartil proteases, como a catepsina D humana ou de parasitos, tem sido o objetivo de muitos grupos de pesquisas que procuram o tratamento para diversas doenças (BENES et al., 2008,

CAFFREY et al., 1998, CAFFREY et al., 2005, GACKO et al., 2007, KICK et al., 1997, MCCONNELL et al., 2003).

Nos ensaios de inibição, a atividade catalítica da enzima-alvo é avaliada por meio do monitoramento do produto reacional, na presença do inibidor. No caso da catepsina D, são comumente utilizados a Hb ou peptídeos específicos como substratos, ou seja, em um mesmo meio reacional contendo o tampão adequado são adicionados a enzima, o inibidor e o substrato. Técnicas de detecção baseadas no monitoramento de fluorescência e absorvância são comuns e extensamente utilizadas nesses ensaios e monitoram a formação do produto reacional, que pode existir em maior ou menor concentração, dependendo da potência do inibidor presente no meio reacional.

Devido à difícil obtenção da catepsina D de *Schistosoma mansoni* muitos ensaios são realizados utilizando a enzima bovina por apresentarem grande similaridade em relação à sequência de aminoácidos do sítio ativo (BRINKWORTH et al., 2001, CAFFREY et al., 2005, SILVA JR et al., 2002).

1.5.1.1 Substratos utilizados em ensaios com a catepsina D

A Hb é um polipeptídeo tetramérico com dois tipos de cadeias, sendo uma delas com 141 aminoácidos e a outra com 146 aminoácidos, chamadas de cadeias α e β , respectivamente, conforme apresentado na FIGURA 1.4. Possui aproximadamente 64 kDa e diversos sítios sujeitos à clivagem pela catepsina D esquistossomótica, e por isso, é um dos substratos utilizados para avaliar sua atividade na triagem de inibidores. Estudos provam que a catepsina D humana possui sítios de clivagem na Hb que diferem dos sítios de clivagem da catepsina D do *Schistosoma*, e tal diferença pode ser explorada na obtenção de inibidores seletivos (BRINKWORTH et al., 2001).

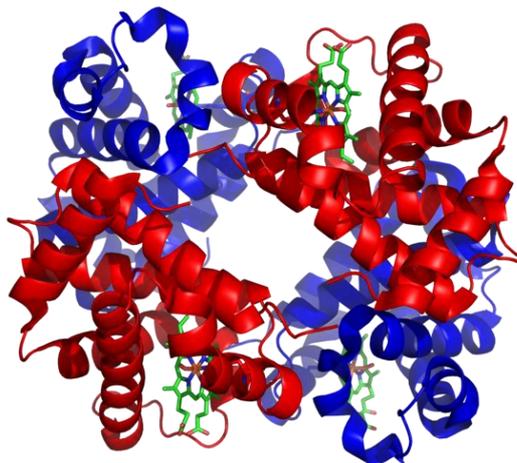


FIGURA 1.4 - Estrutura da Hb e unidades heme, com as subunidades α e β destacadas em vermelho e azul, respectivamente. Obtida do Protein Data Bank código 1-GZX.

Utilizando a Hb como substrato, a maioria dos ensaios é realizada utilizando técnicas espectrofotométricas de UV/Vis, acompanhando-se a formação de peptídeos menores e até resíduos de aminoácidos a 280 nm, resultantes da hidrólise da Hb pela catepsina D, obtidos após vários processos de limpeza de interferentes do meio reacional.

Outro tipo de substrato muito utilizado são os compostos fluorogênicos. São substratos sintéticos que possuem cadeias peptídicas extensas desenhadas para serem clivadas por endopeptidases. Contém grupos fluoróforos e grupos chamados “apagados” dentro da mesma estrutura molecular. Quando não são clivados, o sinal fluorescente da molécula é anulado por meio de transferência de energia de ressonância entre o fluoróforo e o grupo “apagado”. Após a clivagem da cadeia peptídica, o grupo chamado “apagado” fica separado do fluoróforo, diminuindo o efeito do primeiro sobre o último, resultando num aumento da fluorescência por parte do fluoróforo, monitorado por meio de técnicas fluorimétricas.

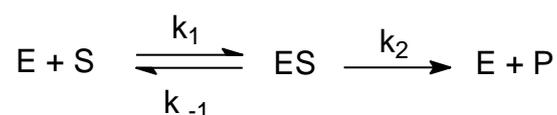
O uso de substratos sintéticos tem vantagens sobre os ensaios que utilizam proteínas como substratos, pois possuem métodos mais simples e rápidos para a medição da atividade enzimática.

O substrato MOCAC-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-NH₂ (S-MOCAC) é um dos peptídeos fluorogênicos mais utilizados em ensaios com a catepsina D, sendo MOCAC = ácido(7-metoxicumarina-4-il)acético e DNP = dinitrofenila. A atividade da catepsina D é monitorada, em comprimentos de onda

selecionados, pelo aumento da fluorescência causada pela obtenção do fluoróforo chamado de P-MOCAC (MOCAC-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe).

1.6 Cinética enzimática

As reações bioquímicas das quais as enzimas fazem parte como catalisadores, incluindo a catepsina D, são compreendidas por meio de um processo no qual há a associação de uma enzima (E) ao seu substrato (S) formando um complexo chamado de enzima-substrato (ES), podendo ocorrer de forma reversível, envolvendo interações intermoleculares não covalentes. Este complexo passa por um estado de transição resultando na formação do produto (P) e restaura a enzima novamente (E). Essas relações foram pensadas e construídas pelos bioquímicos alemão e canadense, Leonor Michaelis (1875-1949) e Maud L. Menten (1879-1960), respectivamente, e estabelecidas pela relação abaixo:



Neste modelo, se a concentração do substrato é alta suficientemente para converter completamente a enzima em seu complexo ES, a segunda etapa da reação torna-se a etapa limitante da velocidade, ou seja, é independente da concentração do substrato. Portanto, a velocidade inicial de formação do produto, v_0 , é dada pela Equação 1.1:

$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_0 = k_2 [ES] \quad (1.1)$$

A partir disso, assume-se que k_2 é muito pequeno quando comparado a k_{-1} ($k_{-1} \gg k_2$) e assim, a formação do complexo ES é tratada como um processo de equilíbrio muito rápido. Portanto, a constante de dissociação, K_d , é dada por:

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (1.2)$$

A concentração total de enzima no momento em que a reação se inicia é dada por:

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (1.3)$$

Portanto,

$$K_d = \frac{([E]_0 - [ES]) [S]}{[ES]} \quad (1.4)$$

Resolvendo [ES], temos:

$$[ES] = \frac{[E]_0 [S]}{K_d + [S]} \quad (1.5)$$

Substituindo a Eq.1.5 na Eq. 1.1, obtemos a Eq. 1.6, dada por:

$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_d + [S]} \quad (1.6)$$

Em altas concentrações de substrato, tem-se que $[S] \gg K_d$, e, portanto, a Eq. 1.6 pode ser reescrita como:

$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_0 = k_2 [E]_0 \quad (1.7)$$

Dessa forma, a lei de velocidade apresentada na Eq. 1.7 corresponde à parte horizontal do gráfico plotado por meio da utilização da hipérbole de [S] versus v_0 . Portanto, quando todas as moléculas de enzima estão complexadas com o substrato formando ES, a velocidade inicial medida deverá ser seu valor máximo ($V_{m\acute{a}x}$), sendo:

$$V_{m\acute{a}x} = k_2 [E]_0 \quad (1.8)$$

Em 1925, os biólogos George Briggs (1893-1978) e John Haldane (1892-1964) criaram o postulado do estado-estacionário no qual diz que não é necessário assumir que a enzima e o substrato estão em equilíbrio com o complexo ES, mas que assim que, se a enzima e o substrato são colocados para reagir juntos, a concentração do complexo ES atingirá valores constantes e a aproximação do estado-estacionário pode ser aplicada conforme a seguir:

$$\begin{aligned}\frac{d[ES]}{dt} = 0 &= k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \\ &= k_1([E]_0 - [ES])[S] - (k_{-1} + k_2)[ES]\end{aligned}\quad (1.9)$$

Resolvendo [ES], temos:

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}\quad (1.10)$$

Substituindo a Eq. 1.10 na Eq. 1.1, temos:

$$\begin{aligned}v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt}\right)_0 &= k_2[ES] = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]}{k_1 [S] + k_{-1} + k_2} \\ &= \frac{k_2 [E]_0 [S]}{[(k_{-1} + k_2) / k_1] + [S]} \\ &= \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_M + [S]}\end{aligned}\quad (1.11)$$

E, assim, a constante de Michaelis-Menten, K_M , é definida como:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}\quad (1.12)$$

As Eqs. 1.11 e 1.6 possuem similar dependência da concentração do substrato, porém $K_M \neq K_d$. O tratamento de Briggs-Haldane define, então, que a velocidade máxima exatamente como a Eq. 1.8 o faz, e assim a Eq. 1.11 pode ser definida como:

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]}\quad (1.13)$$

Quando $v_0 = \frac{1}{2} V_{m\acute{a}x}$, $K_M = [S]$.

Tanto $V_{m\acute{a}x}$ quanto K_M podem ser determinados plotando-se [S] versus v_0 , pela hipérbole de Michaelis-Menten. Porém, em concentrações altas há certa dificuldade de se obter valores exatos de $V_{m\acute{a}x}$. Por esse motivo, os químicos americanos H. Lineweaver (1907-2009) e Dean Burk (1904-1988) sugeriram uma

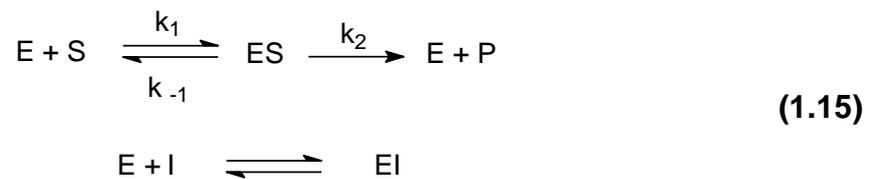
aproximação melhor na qual se emprega uma curva de duplo recíproco de $1/v_0$ versus $1/[S]$, por meio da Eq. 1.14.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (1.14)$$

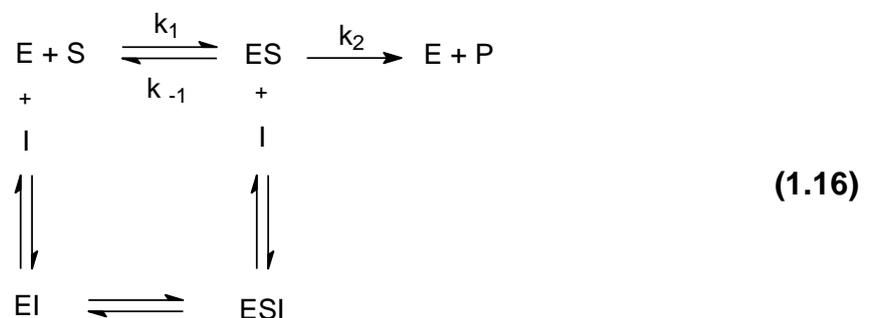
1.7 Inibidores enzimáticos

A atividade catalítica de uma enzima pode ser alterada quando estão presentes compostos que interagem com uma dessas formas associadas à enzima por meio de ligações reversíveis ou irreversíveis. Esses chamados inibidores, portanto, podem controlar a quantidade de produto formado. As inibições reversíveis podem ser competitivas, não-competitivas e incompetitivas.

Inibidores competitivos competem com o substrato por um sítio de ligação comum da enzima, por exemplo, o sítio ativo ou sítios alostéricos. A equação 1.15 descreve o processo competitivo.



Um inibidor não-competitivo mostra afinidade de ligação tanto pela enzima livre quanto pelo complexo enzima-substrato (ES), conforme apresentado na equação 1.16.



Um inibidor incompetitivo se liga somente ao complexo enzima-substrato (ES) formado. A ligação entre o inibidor e o complexo é efetuada por um

Medicamentos aprovados entre 1981 e 2010

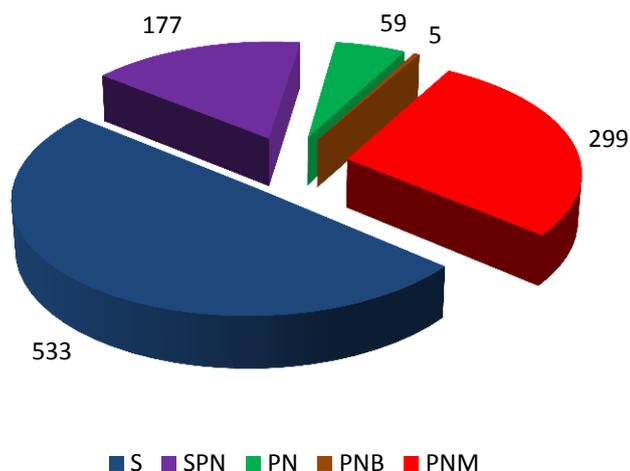


FIGURA 1.5 - Medicamentos aprovados entre 1981 e 2010 (NEWMAN & CRAGG, 2012). S – sintéticos; SPN – sintéticos contendo farmacoforos de PN; PN – produtos naturais; PNB – produtos naturais botânicos; PNM - produtos naturais modificados.

Entre 2008 e 2013, um total de 25 medicamentos considerados produtos naturais ou derivados foram aprovados para comercialização (BUTLER et al., 2014).

Portanto, os produtos naturais oferecem uma diversidade incontável de metabólitos secundários, com estruturas químicas inigualáveis e muitas vezes complexas produzidas por funções específicas da natureza. Suas estruturas servem também como moléculas de ligação, cuja atividade pode ser melhorada por meio da manipulação da química sintética combinatória, auxiliando na descoberta de novos medicamentos (KNIGHT et al., 2003, MERCADO-MARIN et al., 2014, STROBEL & DAISY, 2003, STROBEL, 2003).

PARTE I

Desenvolvimento e aplicação de biorreatores para a triagem de inibidores de Catepsina D por CLAE

Nesta parte do trabalho são descritos os processo de imobilização da enzima catepsina D (bovina) em suporte de sílica fundida para a construção do biorreator CatD-IMER, e o desenvolvimento de um sistema cromatográfico multidimensional com o uso de eluição zonal. A avaliação da atividade enzimática se deu por meio da validação de um método com a utilização de um substrato fluorogênico. A separação obtida entre o substrato, o produto da clivagem e os compostos analisados, por meio do uso uma coluna analítica na segunda dimensão desse sistema, são destacados como o fator diferencial na utilização do método. Posteriormente são descritas as metodologias para o estudo dos extratos de plantas, isolamento e identificação dos compostos e a realização dos ensaios enzimáticos de inibição utilizando o CatD-IMER e os métodos tradicionais em solução, com a enzima isolada e o extrato de proteínas de vermes de *S. mansoni*.

Esta parte do trabalho foi desenvolvida em parceria com a Prof. Dra. Quezia B. Cass Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE do Departamento de Química da UFSCar e a Dra. Marcela C. de Moraes, agora professora na Universidade Federal Fluminense.

PARTE I
Introdução

Parte I. Desenvolvimento e aplicação de biorreatores para a triagem de inibidores de Catepsina D por CLAE

2 INTRODUÇÃO

A cromatografia vem auxiliando a farmacologia, dentre muitas outras áreas, na descoberta de potenciais medicamentos. A busca por compostos que exibam atividade frente a macromoléculas como enzimas, receptores, proteínas dentre outros, exigiu da cromatografia a inovação na criação de métodos eficazes na triagem de compostos em misturas complexas, ou seja, para separação, detecção e identificação de substâncias, uma vez que as técnicas atualmente utilizadas para tal fim apresentam algumas dificuldades. Um dos recursos adotados na avaliação de possíveis medicamentos é o uso da tecnologia chamada *High-throughput screening* (HTS). Essa técnica é extensamente usada na descoberta de novos fármacos, porém vem mostrando alguns problemas, como o uso de fluorescência como detecção, que pode gerar falsos resultados, e a limitação em avaliar compostos individualmente, e não em misturas (GRIBBON & SEWING, 2003, KESERU & MAKARA, 2006, NG et al., 2007).

Na cromatografia, estudos de afinidade entre biomoléculas e ligantes podem ser realizados com base nos diferentes tipos de interações com os alvos biológicos, como interações intermoleculares, hidrofóbicas, eletrostáticas e as ligações de hidrogênio. A avaliação dessas interações é determinante tanto nos processos biológicos quanto cromatográficos (KESERU & MAKARA, 2006, NG et al., 2007).

A classificação da cromatografia de afinidade é dada quanto ao modo de separação em três formas: *análise frontal*, *por eluição (zonal)* e *por deslocamento* (CHAIKEN, 1987). No caso da *análise frontal*, a solução a ser investigada é introduzida na coluna ininterruptamente, e as curvas obtidas demonstram degraus de adsorção, no qual cada um representa um componente. O modo de separação por *eluição* (ou zonal) requer uma pequena quantidade de material, que é adsorvido na coluna por meio da eluição de um solvente e os componentes se deslocam separadamente, resultando em bandas cromatográficas, comumente observadas em cromatografia líquida de alta eficiência. E na análise por *deslocamento*, uma pequena quantidade de material é introduzida na coluna, e depois disso esse

material é arrastado pela fase móvel contendo uma substância que apresente grande afinidade para a fase estacionária, chamado de agente de deslocamento. Esta substância deve ser mais fortemente adsorvida que qualquer um dos constituintes da amostra, que vão sendo sucessivamente deslocados formando zonas de concentração constante.

Dentre os passos essenciais da cromatografia de afinidade estão: a imobilização de um alvo, a avaliação das modificações sofridas pela biomolécula após a imobilização, e a determinação dos parâmetros de ligação do ligante, após imobilização da proteína (HAGE & RUHN, 2005). Quando esse procedimento é realizado em sistemas de cromatografia de alta eficiência (CLAE) é chamada de cromatografia de afinidade de alta eficiência, e é caracterizada pela utilização de suportes com partículas rígidas, pequenas e capazes de resistir a altas pressões e/ou vazões (WALTERS, 1985). Porém, é preciso citar que existem cinco principais técnicas cromatográficas atualmente disponíveis para analisar as interações proteína-ligante: *o método Hummel-Dreyer, o método “vacancy peak”, eluição zonal, análise frontal e análise de retenção*. Os métodos mais comumente citados e utilizados são a *eluição zonal*, descrita pela primeira vez por Dunn e Chaiken em 1974, e a *análise frontal* (CARDOSO et al., 2009, DUNN & CHAIKEN, 1974).

Quando as análises frontal ou zonal são realizadas em sistema de CLAE, ou seja, em pequena escala, a cromatografia de afinidade não é mais somente um meio de isolamento e purificação de biomoléculas, mas monitora possíveis interações específicas por meio da injeção, contínua (frontal) ou não (zonal), dos analitos nas chamadas colunas de bioafinidade, utilizando detectores apropriados (CALLERI, 2009).

2.1 A imobilização

Existem excelentes artigos e revisões que discutem os vários métodos de imobilização empregados (CARDOSO et al., 2009, RAO et al., 1998). Brevemente, os métodos de imobilização baseiam-se em ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte, e os mais utilizados são: adsorção física (interações hidrofóbicas e de van de Waals) e química (ligação covalente e iônica), imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula e ligação cruzada (CARDOSO et al., 2009).

A escolha do método de imobilização deve ser a principal preocupação no procedimento geral, a fim de preservar a atividade da proteína (enzima, receptor, etc.), que deve ser medida posteriormente à imobilização e o resultado deve ser comparado com ensaios realizados em outras técnicas (MOADDEL & WAINER, 2007, TWEED et al., 1997). Esta preocupação se deve à vários fatores envolvidos no processo de imobilização que podem resultar, dentre outros, na falta de acessibilidade do sítio ativo da enzima e na sua mudança conformacional. Normalmente, na cromatografia de afinidade a biomolécula é imobilizada covalentemente em um suporte (sílica, sefarose, etc.) (MONZO et al., 2009), porém o uso de membranas artificiais imobilizadas (IAM) e imobilizações não-covalentes (MOADDEL & WAINER, 2007) vêm sendo mencionadas.

Em imobilizações do tipo covalentes formam-se ligações entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da proteína/enzima [(NH₂) de lisina e arginina, (CO₂H) de ácido aspártico ou glutâmico, (OH) de serina ou tionina e (SH) de cisteína]. As vantagens desse tipo de imobilização englobam, principalmente, o aumento da estabilidade e a diminuição da velocidade de inativação da enzima, pois a forte interação com o suporte confere mais rigidez à sua estrutura e, em casos de enzimas sujeitas à autoproteólise, sua atividade é prolongada.

2.2 Ensaios cromatográficos

Os biorreatores contendo o suporte cromatográfico e a enzima imobilizada, também chamados de IMERs (do inglês, *Immobilized Enzyme Reactor*), podem ser utilizados em CLAE para avaliação de inibidores em ensaios de triagem *on line*. Empregando-se a cromatografia zonal, o excesso de substrato e o produto formado pela reação catalítica são separados em uma segunda dimensão acoplando-se o biorreator a uma coluna analítica por meio de uma válvula direcionadora de seis caminhos. Porém, os biorreatores também podem ser utilizados *in line*, com a quantificação direta dos produtos da reação por meio do uso de detectores seletivos, como os espectrômetros de massas. Em ambos os casos, monitora-se a atividade da biomolécula por meio da capacidade do analito em se ligar e modular a função de uma proteína alvo.

Empregando-se, portanto, a cromatografia zonal, a separação cromatográfica do substrato e produto da reação é utilizada na determinação da atividade da biomolécula alvo, pois a área da banda cromatográfica é relacionada à concentração do produto formado, permitindo: o monitoramento da atividade do IMER, obtenção de constantes cinéticas (K_M e $V_{m\acute{a}x}$), triagem de inibidores, determinação de IC_{50} , K_i e mecanismos de inibição.

O acoplamento de um IMER, que conta com a especificidade e a sensibilidade de uma enzima, a um sistema de CLAE, fornece, portanto, seletividade, rapidez e possibilidade de reutilização (SLON-USAKIEWICZ et al., 2004). Dessa forma, ensaios rápidos com enzimas imobilizadas podem ser realizados para o isolamento e identificação de compostos biologicamente ativos em misturas complexas e torna-se uma alternativa confiável e atrativa de ser explorada (CINGÖZ et al., 2008, MARKOGLU & WAINER, 2003). Estes fatores são especialmente observados quando proteases, como a catepsina D, sujeitas à auto-proteólise, são utilizadas como alvos em ensaios nos quais se buscam inibidores em matrizes complexas como os produtos naturais.

PARTE I

Objetivos

3 OBJETIVOS

Os objetivos desta parte do trabalho foram:

- ❖ Estudar e desenvolver um biorreator capilar baseado na enzima catepsina D para ser utilizado em ensaios na busca de inibidores utilizando um peptídeo fluorogênico como substrato;
- ❖ Realizar ensaios em solução utilizando a catepsina D como alvo e seu substrato fluorogênico na busca de inibidores;
- ❖ Realizar ensaios em solução com o substrato fluorogênico empregando proteínas extraídas de vermes de *S. mansoni*, especificamente as aspartil proteases, para serem utilizadas como alvo na busca de inibidores de produtos naturais.

PARTE I

Procedimento Experimental

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e Métodos

Solventes:

- ❖ Solventes comerciais BRENTAGLA, SINTH, VETEC, LANSHYNT e solventes destilados e recuperados no Departamento de Química da UFSCar para o preparo de extratos e respectivos fracionamentos em coluna;
- ❖ Solventes grau HPLC da J.T.BAKER, TEDIA e PANREAC utilizados no preparo de soluções, amostras para ensaios e em CLAE;
- ❖ Solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS, CIL- CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, Inc. para realização de experimentos em RMN;
- ❖ Água utilizada em ensaios, composição das fases móveis, preparação de tampões e soluções foi ultra-purificada obtida em um sistema MILLI-Q (MILLIPORE).

Fases estacionárias utilizadas para a cromatografia em coluna (CC):

- ❖ Sílica gel 60 (70-230 Mesh) da ACROS ORGANICS;
- ❖ Sílica gel 60 (230-400 Mesh), chamada de sílica flash, da ACROS ORGANICS;
- ❖ Sephadex® LH 20 da AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB;
- ❖ Florisil® (200 Mesh) da ALDRICH.

Cromatografia em Camada Delgada Analítica:

- ❖ Cromatoplaça de sílica gel 60 HF₂₅₄ em alumínio da MERCK utilizada para análise de fracionamentos realizados.

Colunas cromatográficas de HPLC:

- ❖ Coluna C18 Luna-Phenomenex® (100 Å, 5 µm, 10 x 0,46 cm).

Reveladores:

- ❖ Radiação na região do UV (254 e 360 nm);
- ❖ Reagente de Dragendorff;
- ❖ Vanilina em ácido sulfúrico.

Reagentes:

- ❖ Enzima catepsina D de baço bovino (CatD) da SIGMA-ALDRICH;
- ❖ Substrato MOCAC-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-NH₂ (S-MOCAC) da ENZO LIFE SCIENCE;
- ❖ MOCAC = ácido(7-metoxicumarina-4-il)acético, da SIGMA-ALDRICH;
- ❖ Inibidor Pepstatina A da SIGMA-ALDRICH;
- ❖ Reagentes utilizados no preparo de tampões da SIGMA-ALDRICH.

4.2 Instrumentação

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:

- ❖ Os experimentos de RMN de ¹H, ¹³C, COSY, HMBC e HSQC foram realizados em um equipamento BRUKER DRX 400 (9,4 Tesla).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

- ❖ Imobilização da enzima em capilar (IMER): foi utilizada uma Syringe Pump 11 plus Harvard Apparatus para limpeza e ativação do capilar e imobilização da CatD. Para análise foi utilizado um cromatógrafo líquido com duas bombas SHIMADZU LC 10 AD VP, uma delas é acoplada a uma válvula seletora de solvente SHIMADZU FCV-10AL para gradiente de baixa pressão; um detector de fluorescência com comprimento de onda variável SHIMADZU SPD-10AV; um auto-injetor SHIMADZU SIL 10 AD VP. O equipamento está acoplado a uma interface SHIMADZU SCL 10 AVP e os cromatogramas são registrados por meio de um software LC Solutions;
- ❖ Cromatógrafo (preparativo): Shimadzu SCL-10Avp, equipado com: válvula de reciclo, válvula de injeção Rheodyne 7725i, alça de amostragem (loop) de 200, 500 e 1000 µL, bombas Shimadzu LC-6AD e detector UV-VIS Shimadzu SPD-10vvp.

Balança Analítica:

- ❖ Shimadzu AUW-D UniBloc.

Evaporadores Rotativos:

- ❖ BUCHI, rotavapor R-114, equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C;
- ❖ BUCHI, rotavapor R-200, equipado com banho BUCHI 490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

SpeedVac:

- ❖ Savant SpeedVac Plus SC10 A acoplado a um refrigerador Vapor Trap RVT-400 Savant, bom a vácuo Savant VLP-200 e registrador Digital Vacuum Gauge DVG 50 Savant.

Vórtex:

- ❖ Boeco Germany Combi-Spin FVL-2400 plus.

pH-metro:

- ❖ Qualxtron 8010.

Sonicador e Centrífuga utilizados para o preparo do E.V. de *S. mansoni*:

- ❖ Sonicador Fisher Scientific modelo 505 Sonic Dismembrator;
- ❖ Centrífuga Sorvall Legend Mach 1,6R.

Espectrofluorímetro:

- ❖ Leitor de Placa com 96 poços da MOLECULAR DEVICES SPECTRA MAX M3.

CG-EM:

- ❖ GC – 17A Shimadzu, CG-EM – QP 5000 Shimadzu, Coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm) filme = 0,25 μm ; Ionização por impacto eletrônico (IE = 70 eV); Temperatura do injetor: 250°C; Temperatura do detector: 280°C; Modo: Split; Volume de injeção: 1 μL .

4.3 Ensaios bioquímicos com a enzima catepsina D e o substrato S-MOCAC**4.3.1 Preparo de tampões utilizados nos ensaios enzimáticos**

Foram utilizados dois tipos de tampões na realização dos diferentes ensaios enzimáticos, que serão detalhados posteriormente, conforme apresentado na TABELA 4.1. Os termos CatD-IMER, catepsina D e EPV referem-se, respectivamente, ao biorreator com a enzima imobilizada, à enzima em solução e ao extrato de proteínas de vermes obtido de *S. mansoni*.

TABELA 4.1 - Preparo dos tampões utilizados nos diferentes ensaios enzimáticos com o CatD-IMER, a catepsina D e EPV.

Tampão	Constituintes	Concentração	pH	Ensaio
A	1,28% de ácido cítrico monoidratado; 1,11% de Na_2HPO_4 ; 97,6% de H_2O	50 mmol L^{-1}	4,0	CatD e EPV com substrato fluorogênico em solução
B	Na_2HPO_4	50 mmol L^{-1}	4,0	CatD-IMER

A utilização de diferentes tampões se deve, principalmente, a restrições na utilização de alguns deles em determinados equipamentos, como os de CLAE.

4.3.2 Ensaios em solução com a catepsina D

Os ensaios bioquímicos em solução foram realizados utilizando-se a enzima catepsina D isolada de baço bovino (CatD), devido sua disponibilidade comercial. O protocolo de ensaio foi baseado no procedimento recebido pela empresa SIGMA-ALDRICH juntamente com a enzima comprada, e está disponível para consulta em seu site de vendas. A atividade da enzima em solução foi

monitorada por meio da hidrólise do substrato fluorogênico MOCAC-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-NH₂, chamado de S-MOCAC (sendo, MOCAC = ácido(7-metoxicumarina-4-il)acético e DNP = dinitrofenila), realizado com o auxílio de um fluorímetro e o uso dos comprimentos de onda $\lambda_{ex} = 328$ nm e $\lambda_{em} = 393$ nm. Placas de ELISA de 96 poços foram mantidas em compartimento termostaticado a 37°C durante os experimentos utilizando-se uma solução de CatD (2,34 µg de proteína/mL de H₂O ultra-pura), solução de BSA 2% (m/v H₂O) e tampão A, conforme apresentado na TABELA 4.2 (YASUDA et al., 1999).

TABELA 4.2 - Preparo das soluções dos ensaios de inibição enzimática utilizando a enzima CatD e substrato fluorogênico.

Ensaio	Enzima ¹ (µL)	Tampão A (µL)	Água (µL)	Solução de pepstatina A ² (µL)	Amostra a ser testada ³ (em DMSO) (µL)	DMSO (µL)
Branco	0	20	75	0	0	5
Controle Negativo	5	20	70	0	0	5
Controle Positivo	5	20	70	5	0	0
Triagem	5	20	70	0	5	0
Controle da amostra	0	20	75	0	5	0

¹ Concentração final de enzima = 120 ng mL⁻¹;

² Concentração final de pepstatina A = 50 µmol L⁻¹ (em DMSO);

³ Concentração final = extratos e frações (125 µg mL⁻¹); substâncias puras (200 µmol L⁻¹).

Para os ensaios foram adicionados 5 µL das amostras a serem testadas, conforme esquema apresentado na FIGURA 4.1. A concentração final de DMSO nos ensaios foi de 5% e o volume final do poço foi de 100 µL. Realizou-se também uma varredura em poços separados para verificar se as substâncias não possuíam fluorescência nos mesmos comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados, pois tal interferência acarretava no descarte desses compostos. O substrato fluorogênico foi, então, adicionado a uma concentração final de 5 µmol L⁻¹, concentração previamente determinada por meio da obtenção do K_M , e não pelo protocolo fornecido pela SIGMA-ALDRICH, que era de 20 µmol L⁻¹.

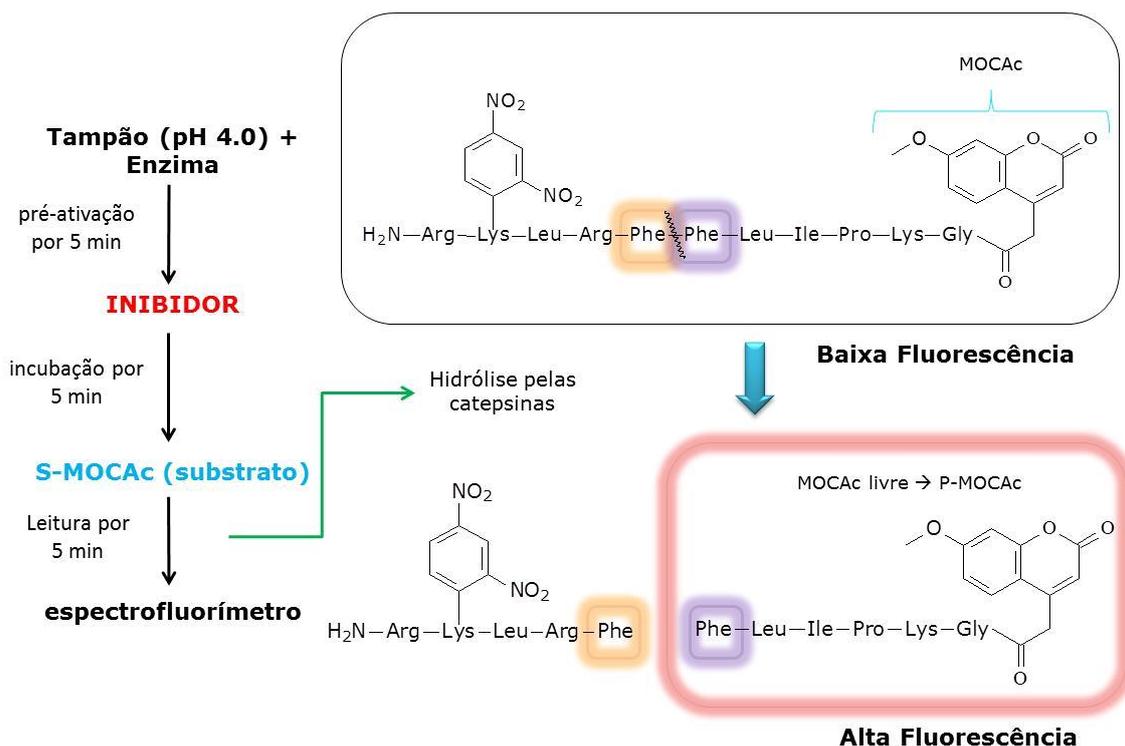


FIGURA 4.1 - Esquema de representação dos ensaios em solução utilizando a enzima CatD e o substrato fluorogênico S-MOCAC.

4.3.2.1 Determinação experimental de K_M

A concentração do substrato a ser utilizada nos ensaios em solução foi determinada após obtenção do K_M para o substrato S-MOCAC frente à CatD. Para isto, realizaram-se medidas de velocidade da reação utilizando diferentes concentrações de substrato (0,1, 2,5, 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$) até que se atingisse a saturação da enzima, ou seja, no qual o aumento da concentração de substrato não produzisse mais mudanças significativas na velocidade da reação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A determinação do valor de K_M foi feita plotando-se os valores obtidos utilizando-se o método de regressão linear de melhor ajuste com auxílio do programa SigmaPlot 12.0.

4.3.2.2 Ensaios de inibição frente à CatD em solução

Extratos brutos e frações obtidas foram avaliados frente à CatD na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e compostos puros foram utilizados na concentração 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo todos os ensaios realizados em triplicata. O percentual de

inibição foi obtido por meio da comparação da atividade enzimática na ausência (controle negativo) e presença do inibidor utilizando-se a Equação 4.1.

$$\% \text{ inibição} = 100 \times (1 - V_i/V_0) \quad (4.1)$$

Sendo, V_i a velocidade de reação observada na presença do inibidor e V_0 a velocidade de reação observada na ausência do inibidor (controle negativo).

Os compostos que apresentaram inibição significativa (superior a 80%) foram selecionados para a determinação do IC_{50} .

4.3.2.3 Determinação da potência dos inibidores (IC_{50})

O valor de IC_{50} é definido como a concentração do inibidor responsável por provocar uma queda de 50% na atividade da enzima. Para determinação do IC_{50} utilizou-se diferentes concentrações do inibidor, explorando-se inibições entre 20 e 90%. Os valores de IC_{50} foram determinados por meio do método de regressão linear de melhor ajuste com auxílio do programa SigmaPlot 12.0.

4.3.3 Ensaios em solução com extrato de vermes de *S. mansoni*

Os ensaios em solução utilizando a catepsina D como alvo foram realizados com a enzima bovina, devido à indisponibilidade comercial da catepsina D de *S. mansoni*. Por esse motivo, como o foco inicial do estudo era a busca de inibidores da catepsina D de parasitos causadores de doenças negligenciadas, realizou-se também o estudo de uma metodologia de ensaio que tivesse como alvo as aspartil proteases do *S. mansoni* e que complementasse os resultados obtidos com a enzima bovina.

Os vermes adultos utilizados nestes ensaios foram gentilmente cedidos pelo grupo da Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar.

4.3.3.1 Preparo da solução de extrato de vermes de *S. mansoni*

CAFFREY e colaboradores (2005) descrevem uma metodologia na qual as proteínas de vermes de *S. mansoni* são extraídas e utilizadas em ensaios de

atividade e de inibição enzimática. Utilizando a mesma metodologia, porém com o substrato fluorogênico diferente, foram realizados ensaios tendo como alvo as aspartil proteases presentes no extrato de proteínas isoladas.

Aproximadamente 40 casais de vermes de *S. mansoni* foram inseridos em 3 mL de tampão A. Essa solução foi sonicada com um pulso inicial de 30 segundos seguidos de 15 pulsos de 10 segundos e um pulso final de 30 segundos com auxílio de um sonificador. O material foi centrifugado por 20 min a 15000 rpm a 4°C, e o sobrenadante, chamado de extrato de proteínas de vermes (EPV), foi removido e congelado a -80°C para futuros ensaios. A concentração de proteínas no EPV foi determinada pelo método de Bradford usando albumina sérica bovina como padrão (BRADFORD, 1976).

4.3.3.2 Ensaios de inibição com o extrato de vermes de *S. mansoni*

Para realização dos ensaios de inibição enzimática adicionou-se à solução de EPV (50 µL; 0,2 - 1,0 mg mL⁻¹) o inibidor E-64 a uma concentração final de 10 µmol L⁻¹. A utilização do E-64 é necessária para inibir qualquer atividade de cisteíno proteases presentes na solução de EPV. Essa solução foi distribuída em uma placa de ELISA de 96 poços e incubada por 10 min a 37°C e os respectivos volumes de tampão A e reagentes foram ajustados conforme dados apresentados na TABELA 4.3.

Para a triagem de compostos puros, extratos de plantas e pepstatina A (controle positivo) também houve necessidade de incubação com o EPV por 10 min antes da adição do substrato.

Da mesma forma que os ensaios em solução com a enzima isolada, a atividade da catepsina D, presente no EPV, foi monitorada por meio da hidrólise do substrato S-MOCAC, específico para catepsinas D e E, adicionado a uma concentração final de 5 µmol L⁻¹. Utilizaram-se os comprimentos de onda $\lambda_{ex} = 328$ nm e $\lambda_{em} = 393$ nm e o volume total de cada poço foi mantido em 100 µL. O perfil do gráfico obtido por meio desse ensaio é o mesmo obtido com a enzima isolada, ou seja, são realizadas leituras de $V_{máx}$ versus tempo baseadas na resposta de fluorescência obtida com a clivagem do substrato fluorogênico pelas aspartil proteases presentes no EPV (CAFFREY et al., 2005).

TABELA 4.3 - Preparo das soluções dos ensaios de inibição enzimática utilizando EPV e substrato fluorogênico.

Ensaio	EPV + E-64 (µL)	Tampão A (µL)	Solução de pepstatina A (µL)	Amostra a ser testada (em DMSO) (µL)	DMSO (µL)
Branco	0	95	0	0	5
Controle Negativo	12,5	80,5	0	0	5
Controle Positivo	12,5	80,5	5	0	0
Triagem	12,5	80,5	0	5	0

¹ Concentração final de enzima = 120 ng mL⁻¹;

² Concentração final de pepstatina A = 50 µmol L⁻¹ (em DMSO);

³ Concentração final = extratos (125 µg mL⁻¹); substâncias puras (200 µmol L⁻¹).

Os ensaios com EPV foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar utilizando-se os mesmos equipamentos e reagentes utilizados nos ensaios com a enzima isolada. O EPV foi ensaiado somente frente aos extratos vegetais brutos e alguns compostos puros isolados, que se mostravam promissores nos ensaios em solução com a CatD isolada, pois não havia parasitas suficientes para o preparo de EPV para o ensaio de todas as frações obtidas dos procedimentos cromatográficos bioquímicos realizados com os extratos brutos.

4.3.4 Desenvolvimento e aplicação do CatD-IMER

4.3.4.1 Pré-tratamento do capilar de sílica fundida

Antes da imobilização da enzima no capilar é necessário que se faça um pré-tratamento deste. O procedimento utilizado baseou-se em trabalhos já descritos na literatura (CARDOSO et al., 2009, DE MORAES et al., 2012). Brevemente, utilizando-se uma bomba seringa com uma vazão de 130 µL.min⁻¹, eluiu-se o 10 mL de HCl (1,0 mol L⁻¹) no capilar de sílica fundida (100 µm d.i. x 0,375 mm x 50 cm) para a limpeza, e logo depois eluiu-se água ultra pura. O capilar foi colocado em estufa a 95°C por 1 hora. Preparou-se uma solução de APTS diluindo-se 500 µL de solução APTS 99% em 5,0 mL de água. Foi eluído 1 mL dessa solução

no capilar e este foi colocado em estufa por 30 min a 95°C. A solução de APTS foi eluída novamente nas mesmas condições e a coluna foi então colocada na estufa por 30min e posteriormente deixada à temperatura ambiente por 12 horas.

4.3.4.2 Imobilização da CatD em capilar de sílica fundida

A enzima CatD bovina estava armazenada a -20°C em água ultra-pura e a concentração era de 0,7 mg de proteína por mL de água. No capilar pré-tratado, utilizando-se uma bomba seringa, passou-se 2,0 mL de solução de glutaraldeído 25% em 5 mL de solução tampão de fosfato (50 mmol L⁻¹, pH 7,0); em seguida eluiu-se 1,0 mL de tampão fosfato (50 mmol L⁻¹ pH 7,0) a temperatura ambiente. Colocando-se a solução enzimática no gelo a aproximadamente 4°C passou-se 50 µL desta (~ 35 µg de proteína) no capilar, recolhendo-se na outra extremidade, que se encontrava no gelo, e passou-se mais duas vezes a mesma solução. Em seguida passou-se 250 µL de água ultra-pura. Eluiu-se boroidreto de sódio (50 mg mL⁻¹ de água) por 30 min a um fluxo de 10 µL min⁻¹, para que se reduzissem as bases de Schiff, e, para finalizar eluiu-se água no mesmo fluxo por 5 min. O capilar foi mantido em tampão B e armazenado em refrigeração a 5°C quando não utilizado imediatamente após imobilização da enzima.

4.3.4.3 Preparo das fases móveis utilizadas no sistema de CLAE

No sistema multidimensional são utilizadas duas fases móveis. Na primeira dimensão, na qual se encontra o biorreator com a enzima imobilizada, foi utilizado tampão B como eluente A. Na segunda dimensão, na qual se encontra uma coluna C18 Luna-Phenomenex[®] utilizada para a separação do substrato e seu produto fluorescente proveniente da clivagem, utilizou-se ACN:H₂O + 0,1% TFA – 39:61 (eluente B). Um esquema do sistema multidimensional é apresentado na FIGURA 4.2.

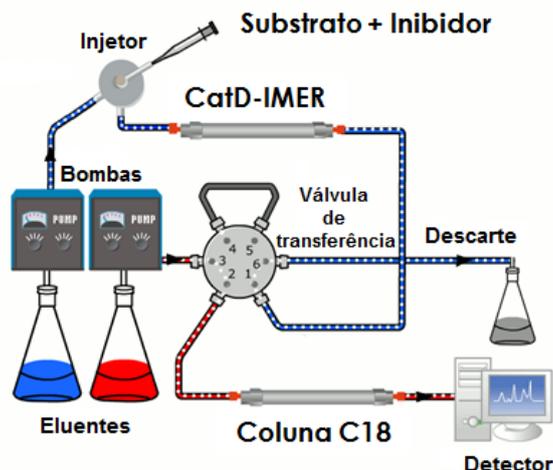


FIGURA 4.2 - Sistema multidimensional utilizado com o CatD-IMER na primeira dimensão (eluyente A: tampão B, vazão: $0,05 \text{ mL min}^{-1}$) e uma coluna C18 Luna-Phenomenex® (100 Å, $5 \mu\text{m}$, $10 \times 0,46 \text{ cm}$) na segunda (eluyente B: $\text{ACN:H}_2\text{O} + 0,1\% \text{ TFA} - 39:61$, vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$).

4.3.4.4 Preparo das soluções de substrato e produto utilizados no desenvolvimento do método analítico

A detecção da atividade catalítica da CatD se dá por meio do monitoramento da fluorescência causada pela presença da estrutura MOCAC, que corresponde ao ácido(7-metoxicumarina-4-il)acético. Tanto no substrato S-MOCAC (MOCAC-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-NH₂) como no produto P-MOCAC (MOCAC-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe) esse ácido está presente na forma de amida, pois está ligado a uma sequência de aminoácidos. Porém, na validação e desenvolvimento do método analítico foi utilizado o reagente MOCAC (ácido(7-metoxicumarina-4-il)acético) sem os aminoácidos ligados, pois, além da indisponibilidade comercial do produto P-MOCAC, a intensidade da banda monitorada corresponde à fluorescência da unidade MOCAC. Esse fenômeno refere-se à cumarina presente na estrutura, que é independente dos aminoácidos ligados, e neste caso são Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe, que ainda permanecem ligados após a clivagem do substrato.

Foram avaliadas as condições cromatográficas para a separação do substrato S-MOCAC, que ao ser clivado gera o produto fluorescente P-MOCAC. Tanto a coluna analítica quanto o sistema de solventes utilizados como fases estacionária e móvel, respectivamente na segunda dimensão foram resultados de

muitos testes, principalmente de proporções e constituição, no caso do eluente B. As fases estacionárias C-8 e fenil-hexil, e fases móveis contendo MeOH:H₂O também foram testadas antes de se obter o melhor resultado com a coluna C-18 Luna-Phenomenex[®] (100 Å, 5 µm, 10 x 0,46 cm) e a fase móvel ACN:H₂O + 0,1% TFA.

A solução de MOCAC foi preparada utilizando-se uma solução estoque a 1 mmol L⁻¹ (em DMSO). Todas as amostras foram preparadas respeitando-se a proporção (v/v) de 40% de H₂O ultra-pura, 40% do tampão B e 20% de DMSO. As amostras contendo o substrato partiram de uma solução estoque a 2 mmol L⁻¹ (em DMSO) e foram preparadas a uma concentração final de 120 µmol L⁻¹, respeitando-se o percentual máximo final de 20% de DMSO.

4.3.4.5 Preparo das soluções de MOCAC utilizados na curva de calibração e validação do método

A partir de uma solução estoque 1 mmol L⁻¹ (em DMSO) de MOCAC foram preparadas, em triplicata, as soluções com concentrações de 0,3; 5,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 100,0 e 128,0 µmol L⁻¹, utilizadas para obtenção da curva de calibração, respeitando-se a proporção (v/v) de 40% de H₂O ultra-pura, 40% de tampão B e 20% de DMSO total. As amostras foram preparadas em eppendorfs e homogeneizadas em vórtex por 5 segundos. Um volume de 60 µL da amostra foi transferido para o vial do auto-injetor e, a partir disso, 10 µL de cada amostra foram injetados no cromatógrafo.

4.3.4.6 Construção da curva analítica para quantificação de MOCAC produzido pelo CatD-IMER

A curva de calibração foi obtida por meio de regressão linear, a partir da razão entre a área da banda cromatográfica e uma dada concentração de MOCAC. Para a quantificação de MOCAC e validação do método foram utilizados biorreatores inativos na primeira dimensão para evitar o estresse do biorreator e o desperdício de enzima ao imobilizá-la. Foram utilizadas as condições cromatográficas otimizadas, apresentadas na TABELA 4.4.

TABELA 4.4 - Condições cromatográficas do sistema multidimensional utilizando o CatD-IMER e coluna C18 Luna-Phenomenex® (100 Å, 5 µm, 10 x 0,46 cm), na primeira e segunda dimensão, respectivamente.

Tempo (minutos) / posição da válvula (FIGURAS 5.1 e 5.2)	Bomba 1 (tampão B, vazão 0,05 mL min⁻¹)	Bomba 2 (ACN:H₂O + 0,1% TFA – 39:61, vazão 0,5 mL min⁻¹)
0,00 - 0,30 desacoplado	reação enzimática ocorre no IMER	condicionamento da coluna analítica C18
0,30 – 3,30 desacoplado	bomba parada para interação dos analitos com a enzima	condicionamento da coluna analítica C18
3,31 - 9,31 acoplado	transferência dos analitos para a coluna analítica	descarte
9,32 - 30,0 desacoplado	condicionamento do IMER	separação e análise dos compostos na coluna analítica

Para a validação da do método analítico, foram analisados os seguintes parâmetros (CASSIANO et al., 2009, RIBANI et al., 2004):

(1) Precisão e exatidão intradia e inter-dias: prepararam-se amostras, em quintuplicata, com as soluções de controle de qualidade (CQ) nas concentrações 0,7, 60 e 110 µmol L⁻¹ de MOCAC seguindo a mesma proporção indicada para o preparo das amostras para a construção da curva de calibração. A precisão do método foi expressa como o coeficiente de variação (CV%) e foram aceitos valores de CV menores ou iguais a 15%. A exatidão foi determinada pelo cálculo de volta e expressa, em porcentagem, como a razão entre o valor médio encontrado pelo método e o valor de referência das concentrações adicionadas. Para a exatidão, foram aceitos desvios menores ou iguais a 15% do valor nominal da concentração, conforme recomendado pela ANVISA e EMA (*European Medicines Agency*) para a validação de métodos bioanalíticos;

(2) Seletividade: cada sequência de análises apresentava cinco amostras, denominadas brancos, para assegurar a seletividade do método. Estas amostras foram preparadas compondo-se de 40% de H₂O ultra-pura, 40% de 50 mmol L⁻¹ solução fosfato pH 4,0 e 20% de DMSO total;

(3) *Limite de Quantificação (LQ)*: O limite de quantificação é a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser quantificada de forma confiável, com precisão e exatidão aceitáveis. Foi estabelecido como a menor concentração, cuja precisão, expressa pelo coeficiente de variação (CV%), não excedeu o valor de 20% (n=3) e no qual a exatidão (%) tenha apresentado desvios não superiores a 20% do valor nominal da concentração. Para isso foram injetadas as concentrações 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A partir disso também foi determinado o *Limite de Detecção (LD)*, que foi calculado levando-se em consideração que a banda de interesse deveria ser maior ou igual a 3 vezes o sinal-ruído.

Os dados experimentais coletados foram analisados e os parâmetros para obtenção da curva e validação do método foram calculados utilizando o programa OriginPro versão 8.0.

4.3.4.7 Obtenção dos parâmetros cinéticos enzimáticos com uso do CatD-IMER

A determinação do valor de K_M para o substrato S-MOCAC com enzimas imobilizadas é realizada por meio da medida de velocidade da reação frente a diferentes concentrações do substrato, até que se atinja a saturação da enzima, que está imobilizada no capilar, no qual um aumento da concentração do substrato não afeta notavelmente a velocidade da reação. Ou seja, a enzima imobilizada irá clivar o substrato S-MOCAC liberando o produto fluorescente P-MOCAC até o momento no qual o aumento da concentração do substrato irá produzir a mesma quantidade de produto, que será detectada pelo fluorímetro acoplado. Para isso, foram preparadas e injetadas diferentes concentrações do substrato (1 - 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a partir da adição de uma solução estoque de substrato (2 mmol L^{-1} em DMSO) à uma solução composta de 40% de H_2O ultra-pura, 40% de tampão B e 20% de DMSO total.

Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 5 segundos, em seguida, alíquotas de 60 μL de cada amostra foram transferidas para vials do auto-injetor. Foram injetados 10 μL das amostras em duplicata no cromatógrafo multidimensional, representado na FIGURA 4.2.

Os dados experimentais coletados foram analisados utilizando o programa SigmaPlot versão 12.0 e os parâmetros cinéticos calculados por meio da análise de regressão não-linear.

4.3.4.8 Estudos de inibição do CatD-IMER

Os ensaios para determinação de inibição da enzima CatD foram realizados com extratos brutos das plantas selecionadas (TABELA 4.5), com frações obtidas dos extratos que apresentaram melhor atividade, compostos isolados de produtos naturais (de diversas plantas trabalhadas no laboratório de produtos naturais), compostos sintéticos e com o inibidor comercial de aspartil proteases, pepstatina A. Para isso foram preparadas as seguintes soluções para serem injetadas no biorreator:

A) Antes de cada triagem, a atividade do biorreator foi avaliada injetando-se uma amostra de substrato fluorogênico a $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ (em DMSO), na ausência de inibidor (controle negativo). Para isso foram preparadas soluções com proporções (v/v) de 40% de H₂O ultra-pura, 40% de tampão B e 20% de DMSO total;

B) Em seguida foram realizadas injeções de branco compostas de 40% de H₂O ultra-pura, 40% de tampão B e 20% de DMSO total;

C) As amostras a serem triadas também foram injetadas isoladamente para análise de qualquer possível coeluição e fluorescência dos compostos. Essas soluções foram preparadas separadamente a partir de: extratos ou frações ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$ em DMSO), e compostos puros ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$ em DMSO), obedecendo-se as proporções dos constituintes apresentadas no item A;

D) Finalmente, foram injetadas as amostras a serem testadas. Para se avaliar a inibição as amostras foram preparadas adicionando-se o substrato ($120 \mu\text{mol L}^{-1}$ em DMSO), a amostra a ser triada (extrato ou fração = $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ em DMSO, e composto puro = $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ em DMSO) e os demais constituintes e proporções apresentados no item A;

E) Ao final das injeções também se avaliou a inibição da enzima com seu inibidor comercial pepstatina A a uma concentração final de 1 nmol L^{-1} .

Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 5 segundos, em seguida, alíquotas de 60 µL de cada amostra foram transferidas para vials do auto-injetor. Foram injetados 10 µL das amostras em duplicata no cromatógrafo multidimensional contendo o biorreator.

Nos ensaios em solução utiliza-se um período de cinco minutos de incubação para que os analitos interajam com a enzima, e posteriormente o substrato é adicionado para o monitoramento do produto fluorescente. No processo de triagem com o CatD-IMER esse processo foi avaliado por meio da incubação do biorreator com um composto, com inibição conhecida em solução, por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. Constatou-se que o período de três minutos, no qual a bomba permanece parada, foi o ideal para análise da inibição dos compostos frente ao CatD-IMER, conforme método apresentado na TABELA 4.4.

O percentual de inibição foi obtido comparando-se a área da banda referente à concentração do produto obtido com a injeção do substrato na ausência do inibidor (controle negativo), com a área da banda referente à concentração do produto obtido com a injeção do substrato na presença do inibidor, de acordo com a Equação 4.1 (pág. 34).

4.4 Extratos e compostos isolados utilizados nos ensaios enzimáticos

4.4.1 Material botânico

As espécies vegetais estudadas pertencem, em sua maioria, à família Rutaceae, sendo elas: *Almeidea* sp., *Dictyoloma vandellianum*, *Hortia longifolia*, *Metrodorea nigra*, *Pilocarpus riedelianus*, *Neoraputia magnifica*, *Rauia* sp., *Rauia resinosa* e *Spiranthera odoratissima*. A espécie *Lithraea molleoides* também foi estudada, e pertence à família Anacardiaceae. Todas as espécies já se encontravam coletadas no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos e alguns extratos foram preparados pela técnica Dorái Periotto Zandonai, do laboratório de Produtos Naturais.

4.4.2 Obtenção dos extratos de plantas

As partes vegetais, caule e folhas, das diversas espécies foram secas em estufa de ar circulante a 40°C durante sete dias e posteriormente trituradas em

moinho, resultando no material seco. Este foi submetido exaustivamente à técnica de extração por maceração em solvente orgânico para obtenção do extrato bruto (TABELA 4.5). Alguns extratos foram preparados por meio da utilização de solventes com diferentes polaridades e outros resultaram do preparo de somente um extrato etanólico bruto, o qual agrupa a maior parte das classes de metabólitos secundários.

TABELA 4.5 - Relação de espécies de plantas selecionadas para estudo.

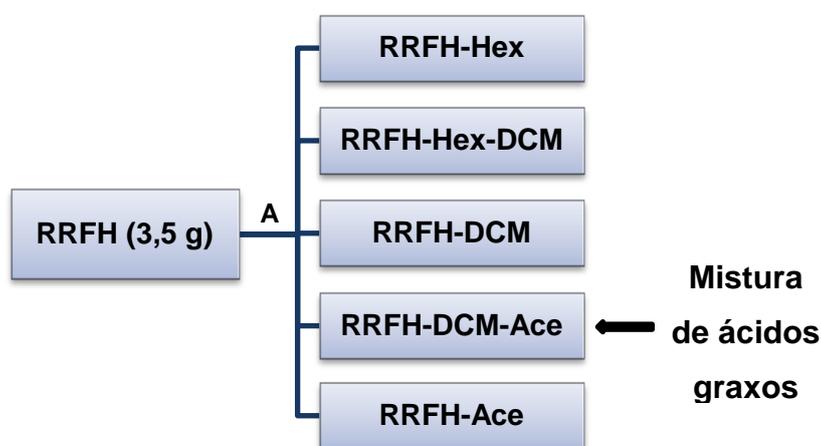
Espécie	Código da planta	Parte da planta	Solvente utilizado
<i>Almeidea II</i>	A2CD	Galhos	Diclorometano
<i>Almeidea II</i>	A2CH	Galhos	Hexano
<i>Almeidea II</i>	A2CM	Galhos	Metanol
<i>Almeidea III</i>	A3GE	Galhos	Etanol
<i>Almeidea sp.</i>	ASD	Folhas	Diclorometano
<i>Almeidea sp.</i>	ASFH	Folhas	Hexano
<i>Almeidea sp.</i>	ASM	Folhas	Metanol
<i>Dictyoloma vandellianum</i>	DV FH	Folhas	Hexano
<i>Dictyoloma vandellianum</i>	DV FM	Folhas	Metanol
<i>Hortia longifolia</i>	HLGE	Galhos	Etanol
<i>Metrodorea nigra</i>	MNGE	Galhos	Etanol
<i>Neoraputia magnífica</i>	NMFE	Folhas	Etanol
<i>Neoraputia magnífica</i>	NMGE	Galhos	Etanol
<i>Pilocarpus riedelianus</i>	PRGE	Galhos	Etanol
<i>Rauia resinosa</i>	RRFD	Folhas	Diclorometano
<i>Rauia resinosa</i>	RRFH	Folhas	Hexano
<i>Rauia resinosa</i>	RRFM	Folhas	Metanol
<i>Spiranthera odoratíssima</i>	SOFE	Folhas	Etanol
<i>Spiranthera odoratíssima</i>	SOGE	Galhos	Etanol
<i>Lithraea molleoides</i>	LMFE	Folhas	Etanol

Os extratos mencionados na TABELA 4.5 foram ensaiados frente à enzima catepsina D pelas diferentes técnicas apresentadas neste trabalho: CatD-IMER, CatD em solução e EPV em solução. Por se tratar de um estudo bioguiado, foram fracionados somente os extratos que apresentaram inibição superior a 60% em mais de uma metodologia utilizada. Serão apresentados, portanto, somente os procedimentos cromatográficos adotados para o fracionamento dos extratos e frações promissoras e isolamento de compostos responsáveis pela inibição.

4.4.3 Estudo do extrato hexânico das folhas de *Rauia resinosa* (RRFH)

O extrato hexânico das folhas RRFH (3,5 g) foi submetido à cromatografia a vácuo em funil de placa sinterizada, conforme representado no ESQUEMA 4.1. Foram obtidas 6 frações a partir da eluição de solventes de ordem de polaridade diferentes.

Essas frações foram ensaiadas frente ao CatD-IMER e à CatD em solução para identificação das frações promissoras para o isolamento/identificação dos compostos responsáveis pela inibição.



A) Cromatografia a vácuo em funil de placa sinterizada: coluna de vidro ($h \times \phi = 20 \times 6,0$ cm); fase estacionária: sílica gel 70-230 Mesh + Florisil®; fase móvel: eluição normal gradiente: 100% Hexano, aumentando-se a polaridade com Diclorometano (1:1), 100% Diclorometano, Diclorometano:Acetona (1:1), 100% Acetona, 100% Metanol. Coleta realizada a cada 1 L de solvente.

ESQUEMA 4.1 - Fluxograma ilustrativo do fracionamento realizado com RRFH.

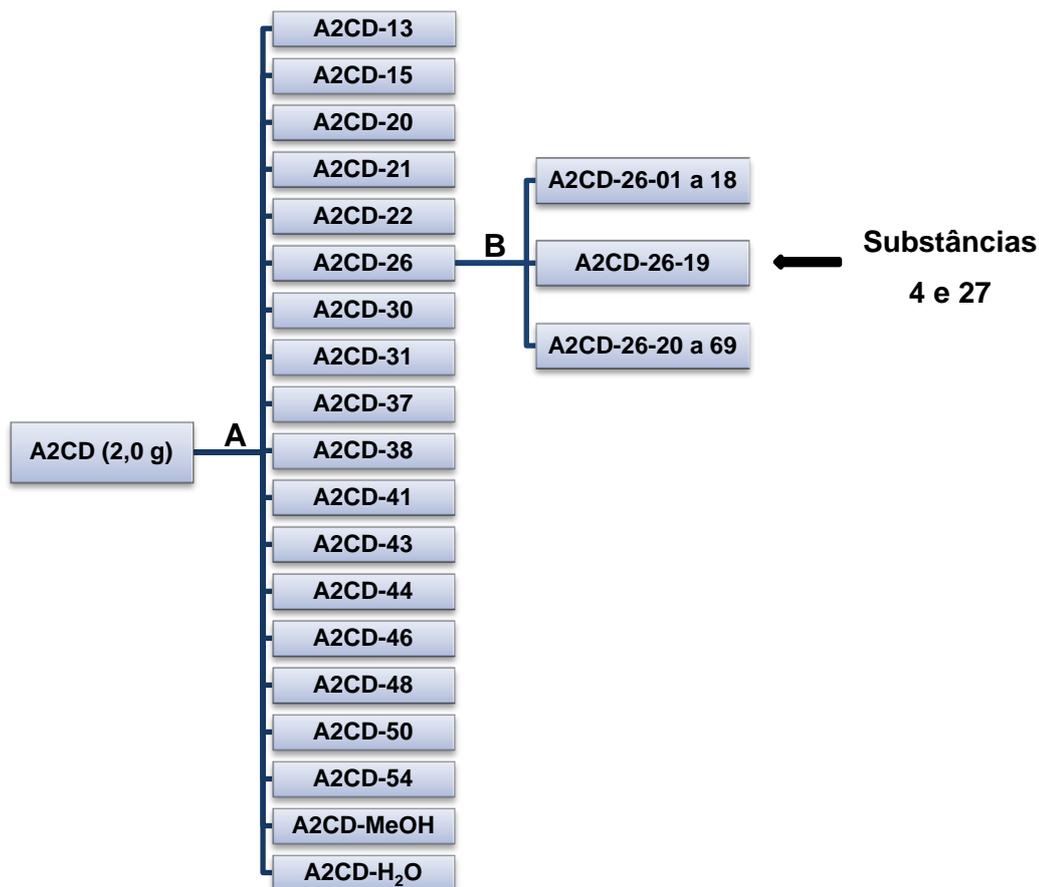
A partir da constatação da alta atividade da fração DCM-Ace, realizou-se um processo de derivatização para posterior análise por CG-EM para identificação dos ácidos graxos presentes em mistura (SIMIONATO et al., 2007).

4.4.3.1 Derivatização da fração RRFH-DCM-Ace e análise por CG-EM

A uma alíquota da fração contendo os ácidos graxos (RRFH-DCM-Ace) foi adicionado 500 µL do reagente BF₃:CH₃OH. A reação foi realizada a uma temperatura de 45°C por 15 minutos, e posteriormente interrompida pela adição de 500 µL de água e 500 µL de Hexano. Os solventes orgânicos foram removidos e a operação foi repetida por três vezes. A água residual foi removida com sulfato de sódio anidro e os ésteres metílicos correspondentes aos ácidos iniciais presentes na amostra foram analisados por CG-EM. Desta forma foi identificada uma mistura de ácidos graxos.

4.4.4 Estudo do extrato diclorometano do caule de *Almeidea* sp. (A2CD)

O extrato diclorometano do caule A2CD (2,0 g) foi submetido a um fracionamento por cromatografia por adsorção com eluição gradiente. Foram obtidas 54 frações, que depois de devidamente agrupadas por meio da análise por CCDA, foram ensaiadas somente frente à CatD em solução. A fração denominada A2CD-26 foi submetida a um novo fracionamento por apresentar boa atividade nos ensaios enzimáticos, conforme detalhado no ESQUEMA 4.2. A partir dela, constatando a presença de compostos semi-puros, a fração denominada A2CD-26-19 foi purificada para isolamento das substâncias I e II, caracterizadas por RMN de ¹H e ¹³C.



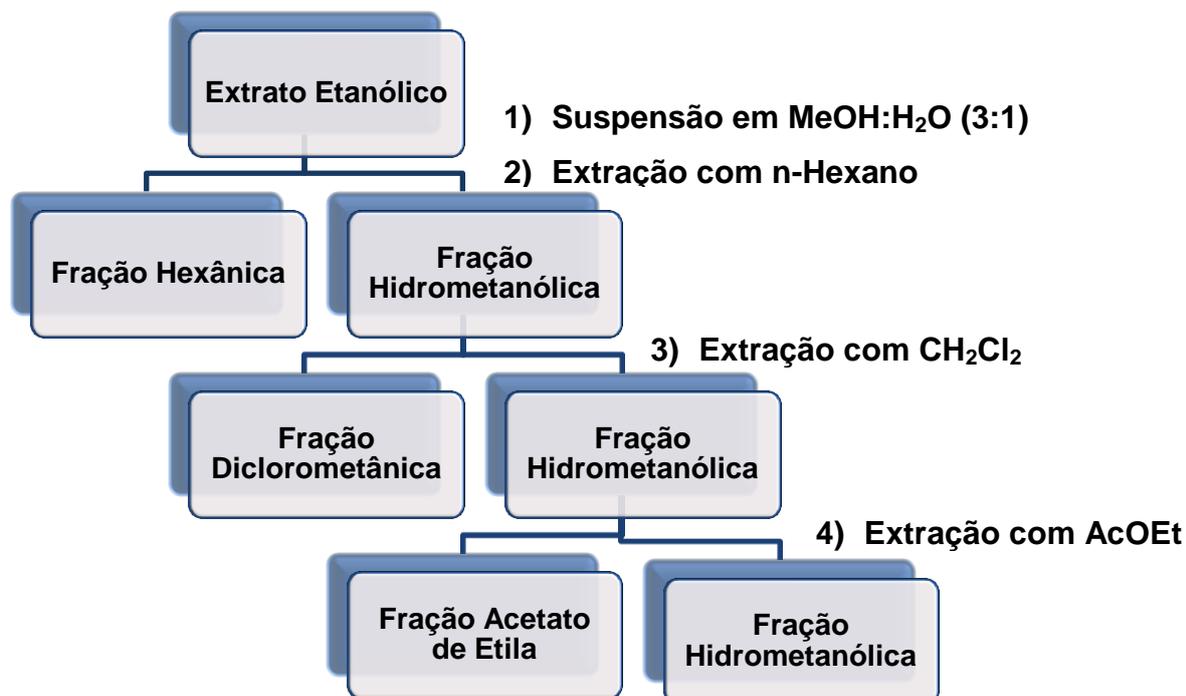
A) Cromatografia por adsorção com coluna de vidro (h x ϕ = 30 x 4,0 cm); fase estacionária: sílica gel 70-230 Mesh + Florisil®; fase móvel: eluição normal gradiente: 100% diclorometano e aumentando-se a polaridade com acetona (coleta realizada em recipientes de 20 mL).

B) Cromatografia por adsorção com coluna de vidro (h x ϕ = 20 x 2,0 cm); fase estacionária: sílica gel 230-400 Mesh; fase móvel: eluição normal isocrática: 3:1 hexano:acetona (coleta realizada em recipientes de 20 mL).

ESQUEMA 4.2 - Fluxograma ilustrativo do fracionamento realizado com A2CD.

4.4.5 Estudo do extrato etanólico das folhas de *Spiranthera odoratissima* (SOFE)

O extrato etanólico bruto SOFE (55,0 g) foi submetido a uma extração líquido-líquido conforme demonstrado no ESQUEMA 4.3. Foram obtidas as partições hexano (SOF-Hex - 6,8 g), diclorometano (SOF-DCM - 3,6 g), acetato de etila (SOF-ACOEt - 5,1 g) e hidroalcoólica (SOF-HA - 30,0 g).

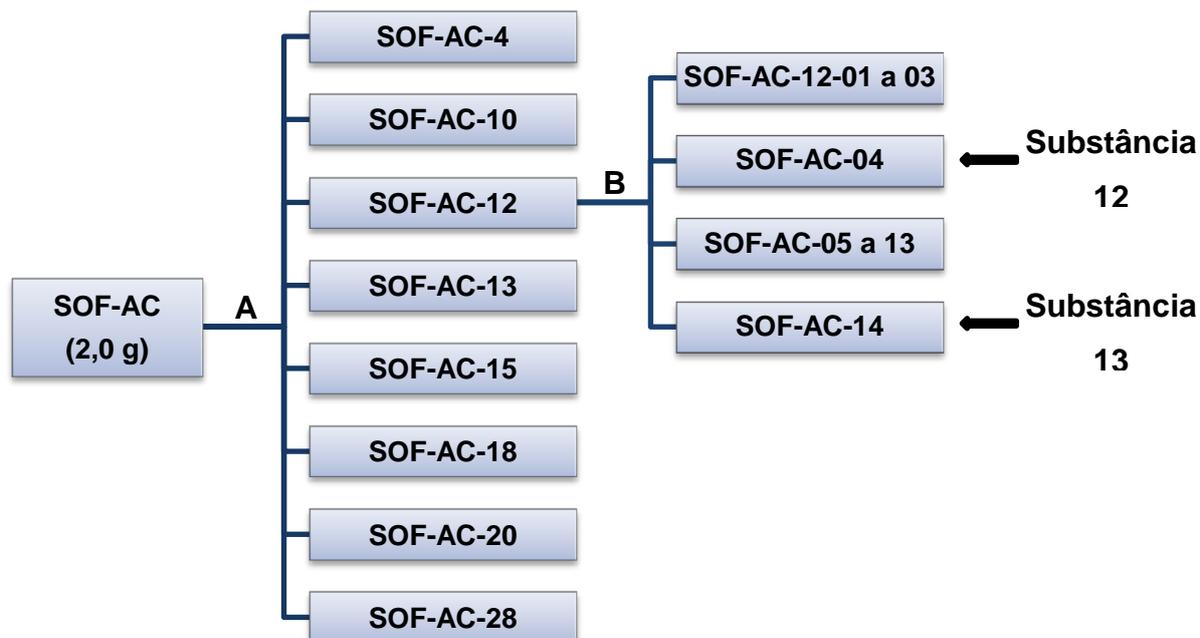


ESQUEMA 4.3 - Extração líquido-líquido realizada com o extrato SOFE.

As partições obtidas do extrato foram ensaiadas frente à enzima CatD em solução e utilizando-se o CatD-IMER. Os resultados dos ensaios bioguiados levaram ao fracionamento somente das amostras que apresentaram maiores atividades, com o propósito de isolamento e/ou identificação das substâncias responsáveis pela inibição enzimática.

4.4.5.1 Estudo da fração acetato de etila das folhas de *Spiranthera odoratissima* (SOF-AC)

A partição SOF-AC (2,0 g) foi fracionada utilizando-se cromatografia por exclusão em Sephadex[®] LH-20 como fase estacionária, e metanol 100% como fase móvel. Foram obtidas 28 frações e todas foram analisadas por CCDA para possível agrupamento de acordo com as semelhanças, conforme demonstrado no ESQUEMA 4.4.



A) Cromatografia por exclusão com coluna de vidro ($h \times \phi = 30 \times 4,0$ cm); fase estacionária: Sephadex® LH 20; fase móvel: eluição isocrática: 100% MeOH (coleta realizada em recipientes de 20 mL).

B) CLAE preparativa - fase estacionária: coluna octadecil-sílica C18 (Luna-Phenomenex®, 10 μm , 100 Å, $h \times \phi = 25 \times 1,0$ cm); fase móvel: eluição isocrática: H₂O:MeOH (75:25 v/v).

ESQUEMA 4.4 - Fluxograma ilustrativo do fracionamento realizado com SOF-AC.

A fração SOF-AC-12 foi submetida a um novo fracionamento por CLAE por apresentar boa atividade em ensaios enzimáticos levando ao isolamento das substâncias III e IV, caracterizadas por RMN de ¹H e ¹³C e experimentos de 2D.

4.4.6 Outras espécies de plantas e enzimas estudadas

Além das espécies vegetais RRFH, A2CD e SOFE, também foram estudados os extratos DVFM, DVFH, RSFE, PRGE e SOGE.

As enzimas cruzaina e *TcGAPDH* de *Trypanosoma cruzi* também foram utilizadas em ensaios em solução.

4.4.7 Triagem de compostos puros

Além dos extratos brutos de plantas, foram ensaiados 29 compostos puros isolados de produtos naturais, sendo 7 alcaloides, 11 flavonoides, 5 cumarinas, 2 limonoides, 5 compostos de diferentes classes, e 2 sintéticos. Os ensaios foram realizados por meio do uso da CatD em solução e do CatD-IMER, na concentração de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

PARTE I
Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A importância desta parte do trabalho está em demonstrar a realização de ensaios enzimáticos em solução e com a enzima catepsina D imobilizada, utilizando o mesmo substrato fluorogênico.

Foram selecionados 20 extratos de plantas e 31 compostos de diferentes classes, sendo 2 sintéticos, para ensaios utilizando as metodologias citadas: CatD e EPV em solução, e CatD-IMER. Dessa grande diversidade de classes de compostos presentes em produtos naturais surgiu a motivação do estudo de novas metodologias para a realização de ensaios enzimáticos.

Os ensaios para avaliação de inibidores de catepsinas, incluindo a D, são comumente realizados utilizando-se de técnicas fluorimétricas ou espectrofotométricas. Essas técnicas monitoram a absorção ou fluorescência de substratos específicos com tal propriedade. Porém, quando se analisam compostos inibidores que possuam fluorescência ou absorvância nos mesmos comprimentos de onda utilizados para monitoramento do produto da reação, os resultados podem não ser confiáveis. O resultado disso é o descarte destes tipos de compostos devido à impossibilidade na realização dos ensaios.

O estudo de inibidores por meio de um biorreator acoplado a um sistema multidimensional permite a separação do produto da clivagem e os compostos avaliados por meio do uso de coluna analítica acoplada na segunda dimensão. Com essa metodologia é possível monitorar a atividade da enzima imobilizada diretamente por meio da quantificação do produto P-MOCAC formado, separado do seu substrato S-MOCAC. Além disso, a análise de diferentes classes de substâncias, mesmo que possuam fluorescência no mesmo comprimento de onda utilizado para a detecção do produto da reação catalítica, também pode ser realizada com mais segurança, pois estes podem ser separados na segunda dimensão.

Faz-se necessário ressaltar que o uso da cromatografia multidimensional foi empregado no desenvolvimento desta metodologia, pois não se obteve a resolução cromatográfica necessária para o desenvolvimento e validação do método analítico com uma única dimensão. Neste caso, o substrato apresentou uma pequena fluorescência durante os ensaios, interferindo na obtenção de constantes cinéticas e percentuais de inibição reais, resolvido com a separação do

substrato do seu produto de clivagem. A cromatografia zonal foi a estratégia selecionada para monitorar a atividade da catepsina D imobilizada.

Portanto, serão primeiramente apresentados, aspectos envolvidos na determinação dos parâmetros cinéticos dos ensaios em solução e, posteriormente processo de desenvolvimento do CatD-IMER e a validação da metodologia de ensaio. Para finalizar serão destacados os resultados dos ensaios de inibição dos compostos realizados em solução e com o biorreator para demonstrar a reprodutibilidade da técnica.

5.1 Ensaios em solução com a catepsina D bovina e o substrato S-MOCAC

5.1.1 Determinação da constante de Michaelis-Menten, K_M

Para realização dos ensaios em solução foi necessário estabelecer a concentração de substrato a ser utilizada pela determinação da constante de Michaelis-Menten, K_M . Esse procedimento é adotado, pois conforme demonstrado na Equação 1.13, quando temos v_0 sendo igual à $\frac{1}{2} V_{máx}$, o K_M passa a ser igual à [S].

A partir do GRÁFICO 5.1 foi possível obter um K_M de $2,7 \pm 0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$. Esse valor está bem abaixo da concentração utilizada no protocolo da enzima (SIGMA-ALDRICH) que era de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.

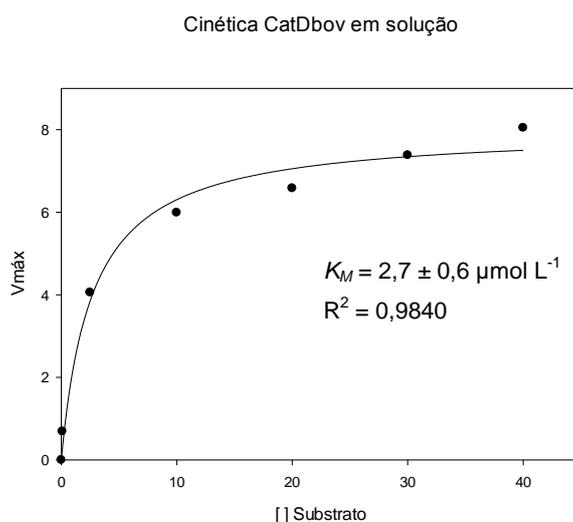


GRÁFICO 5.1 - Gráfico de K_M para a CatD em solução.

Dessa forma, a concentração de $1,5 \times K_M$ para esse substrato ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi escolhida para realização dos ensaios enzimáticos em solução, garantindo a disponibilidade de substrato à enzima presente no meio reacional.

5.2 Imobilização da enzima CatD em capilar de sílica fundida e análise por CLAE

Antes do procedimento de imobilização, a atividade e estabilidade da enzima foram avaliadas em ensaios em solução com diferentes tampões que pudessem ser utilizados nos sistemas de CLAE. Em solução utiliza-se o tampão A. Baseando-se nisso e também a fim de se verificar a atividade da enzima em diferentes sais, foram testados os tampões acetato de sódio (50 mmol L^{-1} , pH 4,0), formiato de amônio (50 mmol L^{-1} , pH 4,0), fosfato de sódio sem BSA (50 mmol L^{-1} , pH 4,0) e o tampão fosfato-citrato com BSA (tampão A).

Verificou-se que o tampão com melhor atividade foi o tampão A, utilizado no protocolo dos ensaios em solução; e posteriormente o tampão fosfato sem ácido cítrico e sem BSA (tampão B) foi o que trouxe melhores resultados, sendo escolhido para realização dos ensaios em CLAE, pela limitação do uso de ácido cítrico no equipamento.

5.2.1 Imobilização da enzima em capilares de sílica fundida

A enzima foi imobilizada em capilar de sílica fundida vazio com dimensões de $40 \text{ cm} \times 0,1 \text{ mm d.i.}$. O emprego desses capilares vem sendo frequente no Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE orientado pela professora Dra. Quezia Bezerra Cass. Foram demonstradas, em trabalhos publicados pelo grupo, vantagens frente a outros tipos de suportes, como minimização de interações secundárias entre os compostos analisados e o suporte, e uma grande área de superfície por volume, permitindo interações adequadas entre o substrato e a enzima imobilizada. Por esse motivo foi empregado neste estudo somente esse tipo de suporte (CARDOSO et al., 2009, DE MORAES et al., 2014).

O processo de imobilização empregado, incluindo a limpeza, ativação e silanização do capilar, teve como base os trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo mesmo grupo com as enzimas GAPDH de *Trypanosoma cruzi* e PNP de *S. mansoni* (CARDOSO et al., 2006, DE MORAES et al., 2012).

Assim, o processo de limpeza e ativação envolve a liberação dos grupos silanóis e a remoção da parede interna do suporte, que é realizada a fim de se aumentar a área superficial e garantir a reprodutibilidade do processo.

A silanização consiste na reação de substituição nucleofílica entre os grupos silanóis livres presentes na parede do capilar e o 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS). O grupo amina presente no APTS se liga ao agente bifuncional glutaraldeído, pela formação de uma base de Schiff. Então, a enzima irá se ligar ao capilar por meio da reação entre os grupos amina presentes nos resíduos de lisina da enzima e o espaçador glutaraldeído fixado a parede do suporte, também pela formação de uma base de Schiff.

A imobilização ocorre quando há formação das bases de Schiff entre os grupos amina dos resíduos de lisina da enzima e o glutaraldeído ancorado no capilar. As bases de Schiff são reduzidas com borohidreto de sódio, pois podem ser facilmente hidrolisadas em meio ácido e causar a liberação da enzima, uma vez que se usa o tampão B com pH 4,0 no processo de triagem com a CatD.

5.2.2 Desenvolvimento do método analítico para monitoramento da atividade do CatD-IMER

O sistema cromatográfico multidimensional utilizado (FIGURA 4.2) apresenta o CatD-IMER e uma coluna C18 Luna-Phenomenex[®] nas primeira e segunda dimensões, respectivamente, e uma válvula de desvio de seis caminhos, que muda da posição desacoplada para a posição acoplada (FIGURA 5.1).

Os analitos (substrato na presença ou ausência do inibidor), quando injetados neste sistema, são encaminhados para o CatD-IMER onde a enzima imobilizada cliva e converte o substrato peptídico S-MOCAC no produto P-MOCAC. A válvula, que fica entre as duas dimensões citadas, ou seja, entre o CatD-IMER e a coluna analítica, é responsável por transferir, por meio da posição acoplada, os produtos formados no biorreator para a segunda dimensão, onde serão separados.

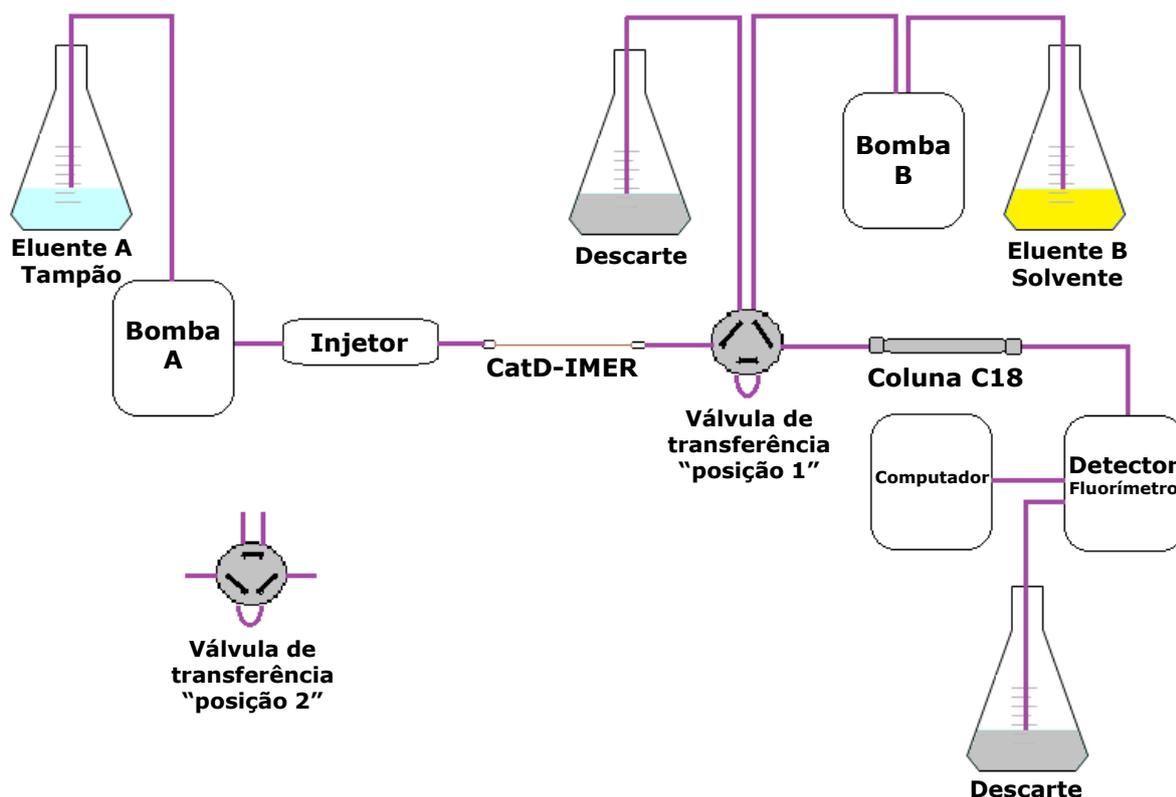


FIGURA 5.1 - Esquema do sistema cromatográfico multidimensional utilizado com representação da válvula de transferência na “posição 1” (desacoplada → nessa posição tanto o CatD-IMER quanto a coluna analítica C18 estão sendo condicionados e os eluentes estão sendo descartados); e posição 2” (acoplada → nessa posição os analitos que passam pelo CatD-IMER ou são produzidos por ele são transferidos para a coluna analítica C18 para serem separados).

O tempo de transferência, no qual o substrato e o produto da clivagem chegam à coluna analítica na segunda dimensão, e quando a válvula muda da posição desacoplada para a posição acoplada, foi estabelecido injetando-se o MOCAc da reação catalítica em um capilar vazio conectado diretamente ao detector, obtendo-se a banda ilustrada na FIGURA 5.2.

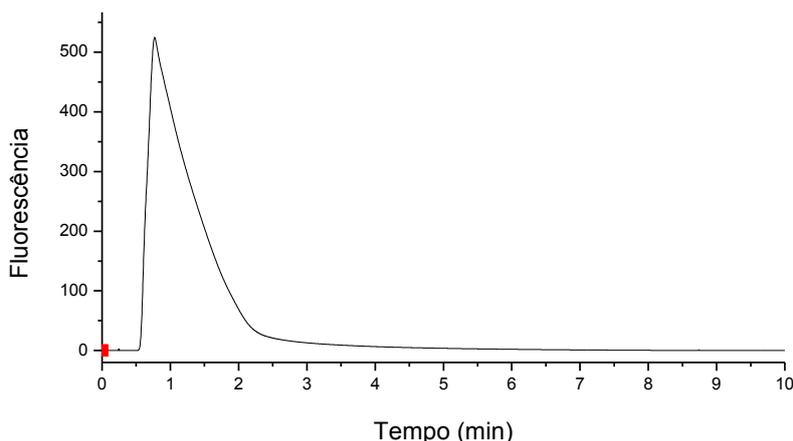


FIGURA 5.2 - Cromatograma referente à injeção do MOCAC no sistema cromatográfico contendo apenas um capilar vazio ligado ao detector. Fase móvel: tampão B, vazão: $0,05 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção por fluorímetro com $\lambda_{\text{ex}} = 328 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 393 \text{ nm}$.

No caso da CatD e seu substrato fluorogênico esse tempo de transferência foi de 6 minutos devido à baixa vazão utilizada no biorreator.

Na dimensão onde se encontra a coluna analítica foram testados parâmetros como tipo de coluna e fases móveis, antes do acoplamento com a primeira dimensão. Para isso foram injetados $10 \mu\text{L}$ do substrato S-MOCAC e do padrão MOCAC diretamente em uma coluna C18 Luna-Phenomenex[®] utilizando-se diversas composições da fase móvel. Os cromatogramas apresentados na FIGURA 5.3 mostram a separação obtida na condição de análise testada.

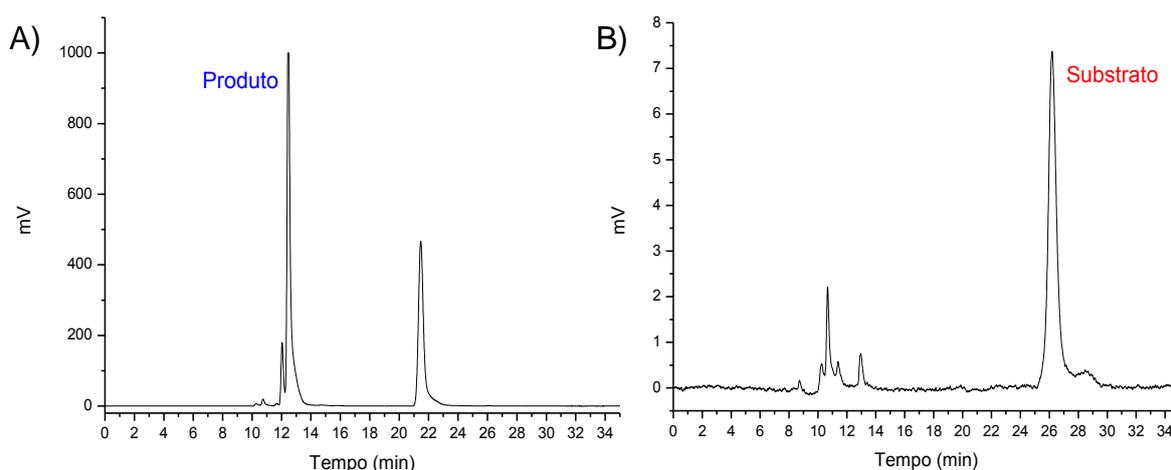


FIGURA 5.3 - Cromatogramas referentes à injeção de MOCAC (A) e substrato S-MOCAC (B) no sistema cromatográfico utilizando uma coluna C18 Luna-Phenomenex[®] (100 \AA , $5 \mu\text{m}$, $10 \times 0,46 \text{ cm}$), eluente: $\text{ACN:H}_2\text{O} + 0,1\% \text{ TFA} - 39:61$, vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Os tempos de retenção do produto e substrato (aproximadamente 13 e 26 minutos, respectivamente) mostram uma excelente separação no sistema cromatográfico escolhido. Há grande diferença na intensidade das bandas do produto e do substrato (aproximadamente 1000 e 7,5 mV, respectivamente), porém, o fato do substrato possuir uma pequena fluorescência mostra a necessidade do acoplamento da coluna analítica na segunda dimensão para a separação destes, pois essa fluorescência impossibilita a obtenção de parâmetros cinéticos e resultados de inibição confiáveis caso não sejam separados.

Analisando-se, portanto, as condições da primeira e da segunda dimensão acoplou-se o CatD-IMER e a coluna C18 Luna-Phenomenex[®] e as análises foram realizadas com as condições apresentadas na TABELA 4.4.

O cromatograma apresentado na FIGURA 5.4 ilustra a separação cromatográfica obtida injetando-se o substrato no CatD-IMER.

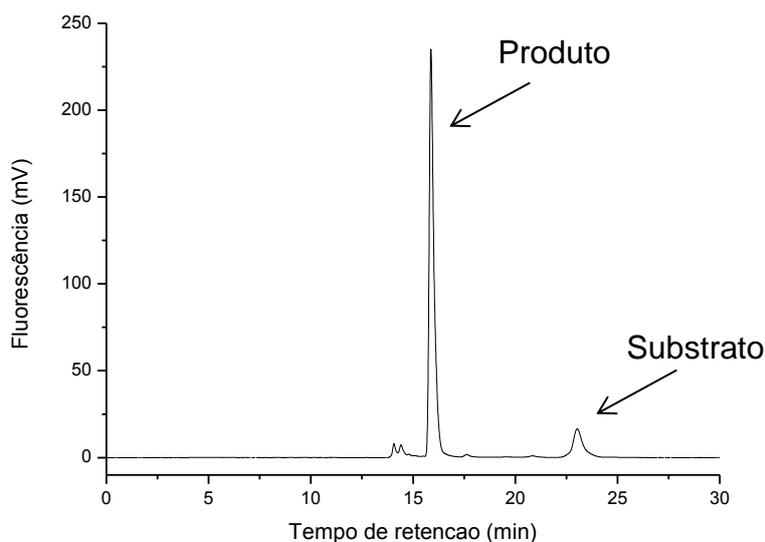


FIGURA 5.4 - Cromatograma da separação obtida entre o substrato e produto da clivagem. Primeira dimensão: CatD-IMER (40 cm x 100 μ m d.i.), vazão 0,05 mL min⁻¹, eluente: tampão B. Segunda dimensão: coluna C18 Luna-Phenomenex[®] (100 Å, 5 μ m, 10 x 0,46 cm d.i.), vazão: 0,5 mL min⁻¹, eluente: ACN:H₂O + 0,1% TFA – 39:61, detecção por fluorímetro com $\lambda_{\text{ex}} = 328$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 393$ nm.

Observa-se uma boa separação entre o substrato que não foi clivado e o produto da clivagem, e dessa forma, essa condição foi selecionada para validação do método analítico.

5.2.3 Validação do método analítico para a quantificação de MOCAC obtido pelo CatD-IMER

O método foi validado por meio da construção de uma curva de calibração, apresentada no GRÁFICO 5.2, avaliando-se a linearidade e a precisão intermediária. Utilizando biorreatores inativos oito concentrações diferentes foram injetadas: 0,3; 5,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 100,0 e 128,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

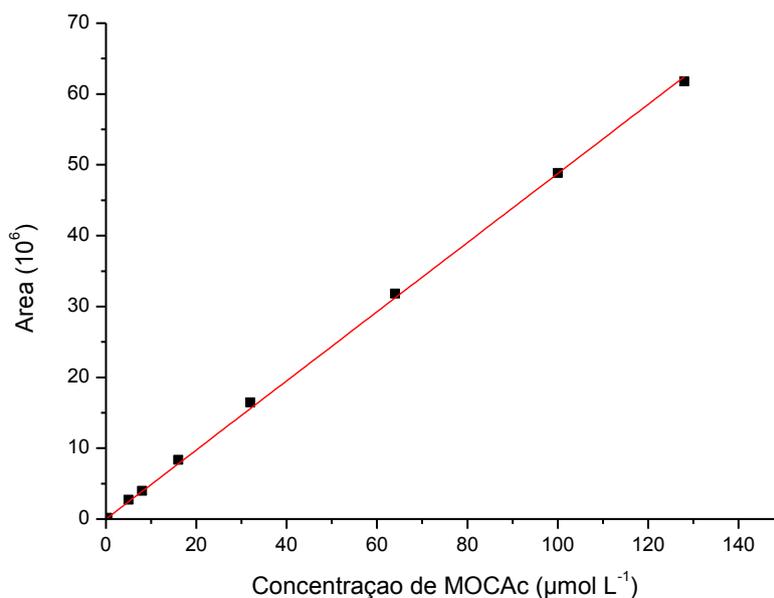


GRÁFICO 5.2 - Curva analítica do MOCAC obtido com a injeção de diferentes concentrações de MOCAC no sistema multidimensional utilizando uma coluna analítica C18 Luna-Phenomenex® (100 Å, 5 μm , 10 x 0,46 cm) na segunda dimensão, eluente: ACN:H₂O + 0,1% TFA – 39:61, vazão: 0,5 mL min⁻¹, detecção por fluorímetro com $\lambda_{\text{ex}} = 328$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 393$ nm.

Obeve-se assim um coeficiente de correlação (r) de 0,999, com coeficiente de variação entre 1,87 e 8,07% e exatidão entre 95 e 110%.

As concentrações de 0,7; 60 e 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram selecionadas como controles de qualidade do método, e injetadas para avaliar sua precisão e exatidão intra e inter-dia. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação e a exatidão, obtida pela interpolação dos resultados na equação da reta da curva de calibração construída, é expressa como porcentagem de desvio entre as amostras injetadas e quantificadas, com as três concentrações analisadas. Os valores são apresentados na TABELA 5.1.

TABELA 5.1 - Valores de precisão e exatidão intra e inter-dias do método desenvolvido para quantificação de MOCAC produzido pelo CatD-IMER.

Concentração de MOCAC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1º dia (n = 5)		2º dia (n = 5)		3º dia (n = 5)		Média dos três dias (n = 15)	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
teórica	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0,7	109	6,40	111	4,89	105	6,78	108	2,85
60	101	3,59	100	2,34	107	8,07	102	3,54
110	95,0	3,02	98,6	2,27	97,2	5,96	96,9	1,87

O limite de quantificação (LQ) obtido foi de $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$; e o limite de detecção (LD) foi de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Todos os valores de precisão e exatidão obtidos com o método estão dentro dos critérios de aceitação de validação de métodos bioanalíticos (CASSIANO et al., 2009, RIBANI et al., 2004). E como se pode perceber pelos resultados obtidos, o método desenvolvido apresentou linearidade, seletividade, precisão e exatidão, e, desta maneira pode ser empregado como técnica de avaliação de inibidores da enzima CatD.

5.2.4 Estudo cinético do CatD-IMER

A partir da avaliação positiva da atividade da enzima imobilizada é necessário verificar afinidade desta por seu substrato e a eficiência catalítica do biorreator. Uma das formas de se avaliar esses parâmetros é por meio de estudos cinéticos com a determinação da constante de Michaelis-Menten, K_M . Essa constante é definida como a concentração do substrato na qual se obtém uma velocidade igual à metade da velocidade máxima de catálise (Eq. 1.13).

No estudo cinético foram empregadas concentrações crescentes de substrato ($1 - 500 \mu\text{mol L}^{-1}$) até que fosse observada a saturação da enzima, ou seja, no qual o aumento da concentração de substrato não produzisse mais mudanças significativas na intensidade da banda cromatográfica relacionada ao produto da clivagem. As áreas das bandas do produto P-MOCAC foram correlacionadas às concentrações por meio da curva de calibração do método validado e estas foram utilizadas, juntamente com as concentrações de substrato, para a construção da hipérbole de Michaelis-Menten e obtenção do K_M , que nesse caso foi de

$81,9 \pm 7,49 \mu\text{mol L}^{-1}$. A curva foi construída utilizando-se o método de regressão não-linear, conforme ilustrado no GRÁFICO 5.3.

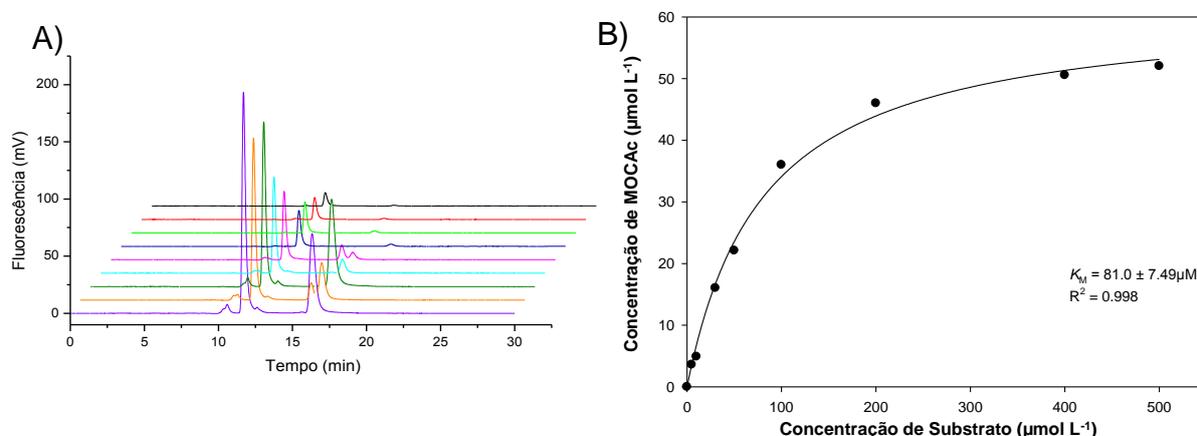


GRÁFICO 5.3 - Hipérbole de Michaelis-Menten (B) construída a partir da variação da injeção de diferentes concentrações de S-MOCAC no sistema multidimensional (A).

A equação de Michaelis-Menten (Eq. 1.13) mostra, em concordância com o gráfico da GRÁFICO 5.3, que em baixas concentrações do substrato ($[S] \ll K_M$), a velocidade da reação V_0 é diretamente proporcional à concentração do substrato. Em concentrações elevadas do substrato ($[S] \gg K_M$), V_0 está próximo do máximo e a velocidade da reação torna-se independente da concentração do substrato.

O valor de K_M obtido para a enzima imobilizada ($81,9 \pm 7,49 \mu\text{mol L}^{-1}$) é cerca de 30 vezes maior do que o obtido para a mesma enzima em solução ($2,7 \pm 0,64 \mu\text{mol L}^{-1}$), ou seja, há menor afinidade da enzima pelo substrato quando está imobilizada. Esta diferença pode estar relacionada com a estrutura terciária da enzima que pode ter sido levemente modificada durante o processo de imobilização. Qualquer mudança na sua conformação pode resultar em impedimentos estéricos e, assim, na mudança de afinidade da enzima pelo seu substrato. Porém, mesmo assim os resultados satisfatórios obtidos com os ensaios de atividade preliminares para o CatD-IMER confirmam a possibilidade de sua utilização em ensaios enzimáticos de inibição. Portanto, a concentração de $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($1,5 \times K_M$) foi utilizada nos ensaios enzimáticos com o CatD-IMER.

5.2.5 Estabilidade e reprodutibilidade do CatD-IMER

A estabilidade do CatD-IMER foi investigada pela análise da sua atividade em função do tempo. Para isso, injetou-se soluções de substrato a $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ em duplicata durante 8 semanas. O biorreator permaneceu ativo por aproximadamente 5 semanas com perda de 80% da sua atividade inicial. Esse resultado evidencia que o método de ensaio com a enzima imobilizada proporciona maior estabilidade à atividade enzimática e possibilita a reutilização da proteína por um período de tempo muito maior do que em solução, que é de apenas 3 horas.

A reprodutibilidade do processo de imobilização do CatD-IMER também foi avaliada injetando-se, em duplicata, $10 \mu\text{L}$ da solução de substrato a $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando-se três CatD-IMERS preparados individualmente. O coeficiente de variação de 9,57% para a atividade inicial média dos três CatD-IMERS ($88,08 \mu\text{mol L}^{-1}$) demonstra que o método de imobilização foi reprodutivo e que o CatD-IMER pode ser empregado nos estudos de triagem de inibidores.

5.2.6 Triagem de inibidores utilizando o CatD-IMER

Os estudos de inibição do CatD-IMER foram realizados utilizando-se extratos de plantas e compostos puros. O objetivo desta investigação foi, principalmente, a demonstração da reprodutibilidade do CatD-IMER e o diferencial do método quando comparado com os ensaios de inibição em solução.

A triagem dos extratos de plantas, frações e compostos isolados contou com a injeção das seguintes amostras:

- A) Substrato ($120 \mu\text{mol L}^{-1}$);
- B) Branco (tampão B, H_2O e DMSO);
- C) Extrato vegetal ou frações/composto puro ($125 \mu\text{g mL}^{-1}/200 \mu\text{mol L}^{-1}$);
- D) Substrato ($120 \mu\text{mol L}^{-1}$) + extrato de planta/composto puro ($125 \mu\text{g mL}^{-1}/200 \mu\text{mol L}^{-1}$) em duplicata.

Na seção 5.3 são apresentados os resultados dos ensaios de inibição de CatD-IMER com as amostras testadas. Os resultados destes ensaios serão mostrados juntamente com os resultados obtidos em solução com a catepsina D bovina e com o extrato de proteínas de vermes (EPV).

5.3 Resultados dos ensaios de inibição em solução e com o CatD-IMER

A maior parte dos inibidores da CatD são compostos sintéticos, peptídeos e polipeptídeos produzidos por microorganismos, plantas e animais, sendo os microorganismos os responsáveis pela produção da pepstatina A, o inibidor mais potente de aspartil proteases (BURSAVICH & RICH, 2002, GACKO et al., 2007). Há poucos relatos da busca de inibidores de baixa massa molecular, como os metabólitos secundários de plantas, em relação à CatD (SRIVASTAVA et al., 2006, WHITESITT et al., 1996). A vantagem desse tipo de compostos está na alta estabilidade, alta taxa de permeabilidade de membranas e boa biodisponibilidade (SRIVASTAVA et al., 2006).

Levando-se em consideração esses aspectos, os estudos de inibição da CatD foram realizados utilizando-se as diferentes metodologias apresentadas para avaliar extratos de plantas selecionadas e compostos puros.

5.3.1 Extratos de plantas

O GRÁFICO 5.4 apresenta a comparação dos resultados dos percentuais de inibição utilizando as três técnicas que utilizam o substrato fluorogênico, CatD, EPV e CatD-IMER. A concentração dos extratos utilizada em todas as metodologias foi de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Comparação dos ensaios em solução com CatDbov, EPV e CatD-IMER

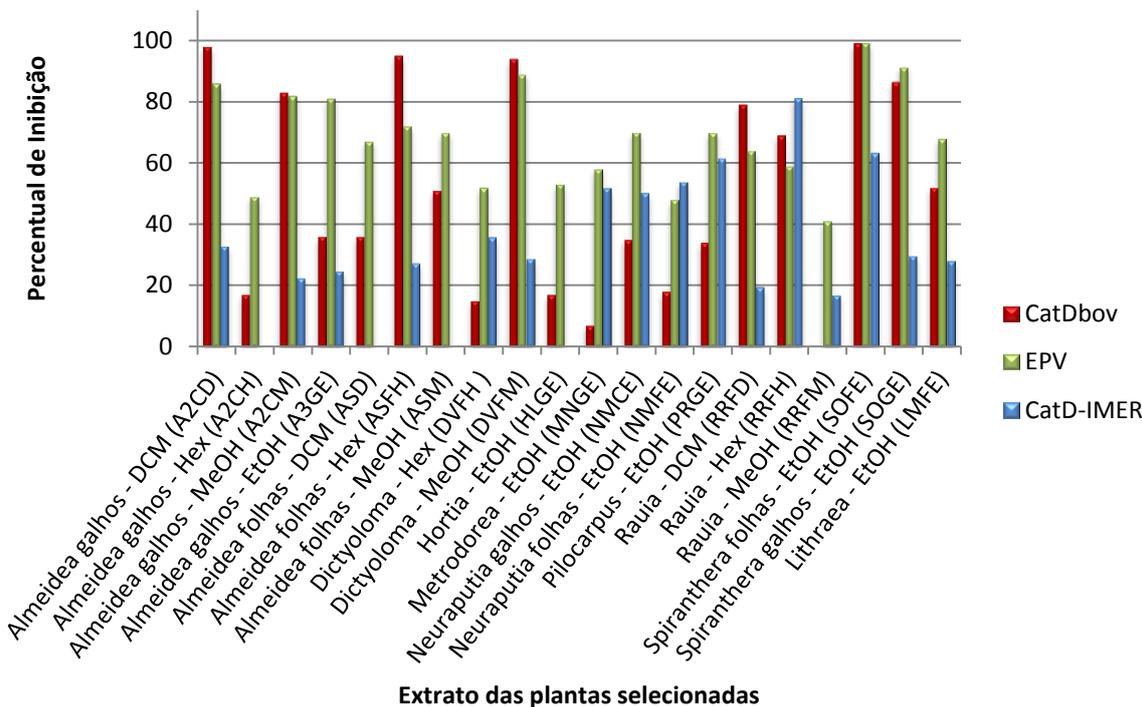


GRÁFICO 5.4 - Gráfico com resultados dos ensaios dos extratos de plantas selecionadas ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$) frente à CatD, EV e CatD-IMER utilizando o substrato S-MOCAc.

Os resultados mostram os extratos SOFE e RRFH como os mais promissores quando são analisadas as três metodologias, e os extratos A2CD, DVFM e SOGE quando são consideradas as metodologias de ensaios em solução.

5.3.1.1 Extrato de *Rauia resinosa* (RRFH)

O extrato RRFH apresentou alto percentual de inibição principalmente em relação ao CatD-IMER (81%), o que levou ao seu fracionamento. No GRÁFICO 5.5 são apresentados os resultados do ensaio de inibição das frações obtidas do extrato RRFH nos ensaios em solução com a CatD e com o CatD-IMER.

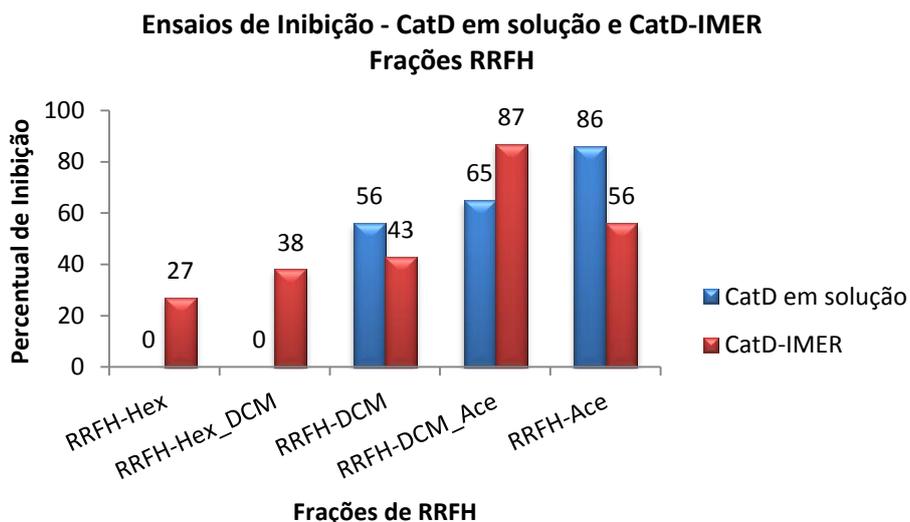


GRÁFICO 5.5 - Gráfico com resultados dos ensaios das frações obtidas de RRFH frente à CatD em solução e CatD-IMER utilizando o substrato S-MOCAC. Ambos os ensaios foram realizados utilizando-se as frações na concentração de 125 µg mL⁻¹.

Verificam-se altos percentuais de inibição das frações mais polares provenientes do extrato hexânico RRFH. RRFH-DCM-Ace e RRFH-Ace apresentaram 65% e 86% de inibição, respectivamente, frente à CatD em solução, e 87% e 56% de inibição, respectivamente, frente ao CatD-IMER.

Esses resultados levaram à identificação, por meio de um processo de derivatização e posterior análise por CG-EM, de uma mistura de ácidos graxos presentes na fração RRFH-DCM-Ace, conforme cromatograma apresentado na FIGURA 5.5 e TABELA 5.2.

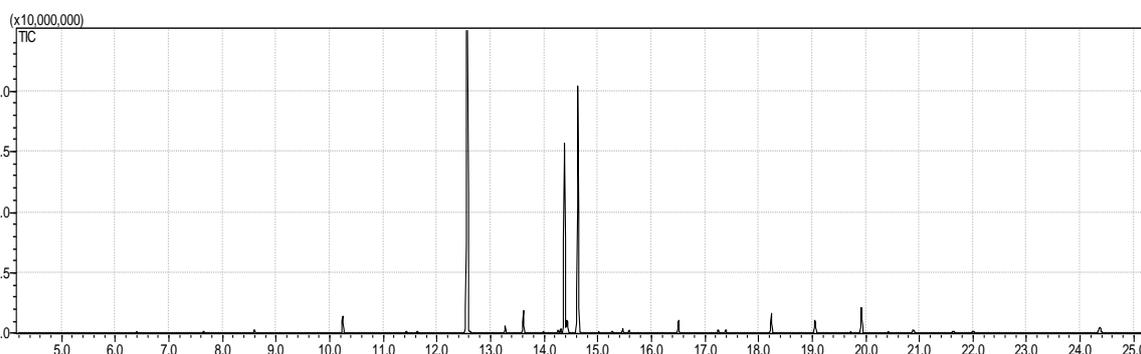
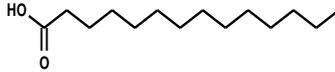
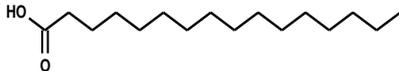
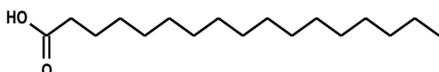
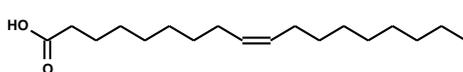
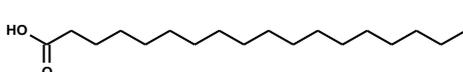
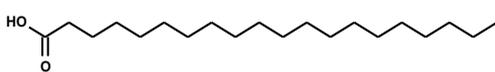
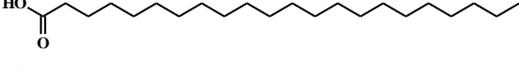
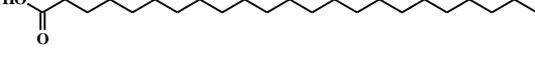
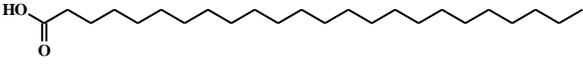


FIGURA 5.5 - Cromatograma da mistura de ácidos graxos de RRFH-DCM-Ace.

TABELA 5.2 - Identificação dos ácidos graxos identificados por CG-EM, presentes na fração RRFH-DCM-Ace.

Tempo retenção	Composto	MM	Fórmula	Estrutura
10,242	Ácido tetradecanóico, (ácido mirístico)	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	
*12,567	Ácido hexadecanóico, (ácido palmítico)	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	
13,608	Ácido heptadecanóico, (ácido margárico)	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	
*14,383	Ácido 11-octadecenóico, (ácido cis-vacênico)	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	
*14,633	Ácido octadecanóico, (ácido esteárico)	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	
16,508	Ácido eicosanóico, (ácido araquídico)	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	
18,223	Ácido docosanóico, (ácido beênico)	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	
19,050	Ácido tricosanóico	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	
19,925	Ácido tetracosanóico, (ácido lignocérico)	368	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	

Essa mistura de ácidos graxos pode ter interagido de forma inespecífica com a enzima durante os ensaios, causando sua inativação temporária. Porém, devido à falta de realização de ensaios com os compostos separadamente, não se pode concluir qualquer aspecto sobre sua inibição ou interação com a CatD. Esse extrato ainda necessita de mais estudos para se verificar se os compostos isolados mantêm o alto percentual de inibição frente à CatD, bem como, em caso positivo, determinar seu mecanismo de inibição. Outras frações do mesmo extrato que apresentaram atividade, como a RRFH-Ace, ainda precisam ser estudadas para que se confirme os responsáveis pela inibição frente à CatD.

5.3.1.2 Extrato de *Almeidea* (A2CD)

No GRÁFICO 5.6 são apresentados os resultados do ensaio de inibição das frações obtidas do extrato A2CD frente à CatD em solução.

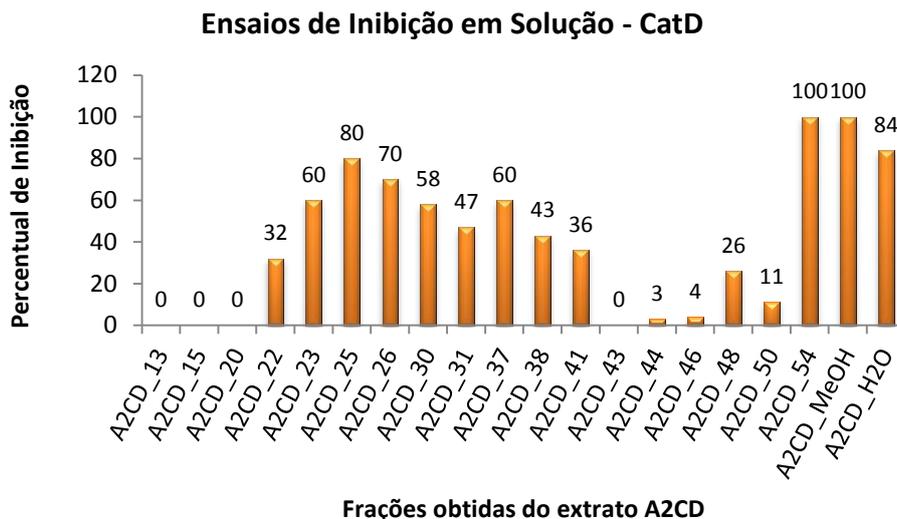


GRÁFICO 5.6 - Gráfico com resultados dos ensaios em solução das frações obtidas de A2CD frente à enzima CatD utilizando o substrato S-MOCAC. Os ensaios foram realizados utilizando-se as frações na concentração de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Como se pode perceber, as frações 23, 25, 26, 37, 54, MeOH e H₂O apresentaram os melhores resultados de inibição frente à CatD em solução. Agrupando-se as frações 23, 25 e 26 e realizando-se o devido fracionamento, foi possível isolar e identificar as substâncias **4** e **27**, sendo o alcaloide evolitrina e o composto 4-hidroxi-3-metoxicinamaldeído, respectivamente, devidamente caracterizados na seção 5.6. As frações mais polares não foram estudadas devido à presença de taninos.

Os ensaios do alcaloide **4** e do composto **27**, realizados separadamente, não mostraram altas inibições frente à CatD em solução e ao CatD-IMER, como será apresentado na seção 5.4.

5.3.1.3 Extrato de *Spiranthera odoratissima* (SOFE)

O extrato SOFE apresentou mais de 60% de inibição frente à CatD utilizando as três diferentes metodologias de ensaio. Por esse motivo, foi realizada uma partição líquido-líquido deste extrato com solventes de diferentes polaridades, resultando nas partições SOF_HEX, SOF_DCM, SOF_ACOET e SOF_HA. Essas frações também foram testadas e os resultados desses ensaios são apresentados no GRÁFICO 5.7.

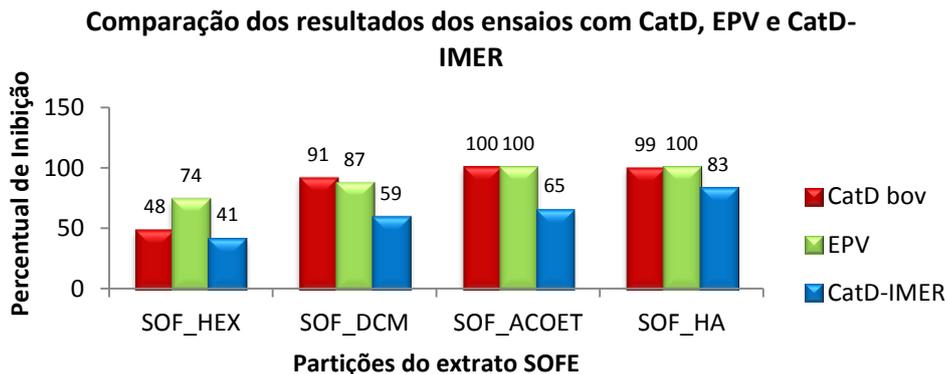


GRÁFICO 5.7 - Gráfico com resultados dos ensaios das partições líquido-líquido do extrato SOFE frente à CatD, EV e CatD-IMER utilizando o substrato S-MOCAC.

As partições SOF_HA e SOF_ACOET apresentaram os melhores resultados de inibição utilizando todas as técnicas. Decidiu-se prosseguir com o fracionamento bioguiado da fração SOF_ACOET e realizar os ensaios de inibição das frações obtidas somente com a enzima em solução. Os resultados desses ensaios são apresentados no GRÁFICO 5.8.

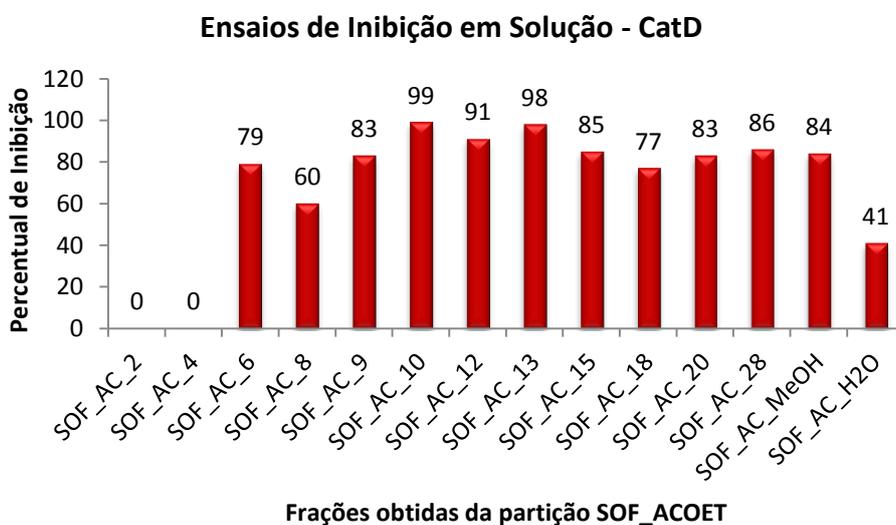


GRÁFICO 5.8 - Gráfico com resultados dos ensaios em solução das frações obtidas de SOF-AC frente à enzima CatD utilizando o substrato S-MOCAC.

Muitas frações provenientes de SOF_AcOEt apresentaram bons resultados de inibição frente à CatD em solução. Iniciando-se o estudo pela fração SOF_AC_12, foi possível verificar a presença de flavonas por meio de análises por RMN de ¹H. Investindo-se no fracionamento dessa fração foi possível isolar as

substâncias **12** e **13**, orientina e isovitexina, respectivamente, com suas respectivas caracterizações apresentadas na seção 5.6.

Ao contrário do que era esperado, os ensaios dessas duas flavonas apresentaram inibições muito baixas frente à CatD em solução e no CatD-IMER, conforme será apresentado na seção 5.4. Suspeitando-se da presença de taninos, as frações que restaram do processo cromatográfico das quais se originaram essas duas substâncias, e que não apresentavam sinais de flavonoides em espectros de RMN, também foram ensaiadas apresentando aproximadamente 100% de inibição nos ensaios em solução. No CatD-IMER esse resultado foi corroborado, porém, após a injeção dessas frações, que apresentavam cor avermelhada e não possuíam outros compostos além de taninos, a atividade do capilar foi reduzida permanentemente em aproximadamente 60%, conforme representado nos cromatogramas da FIGURA 5.6.

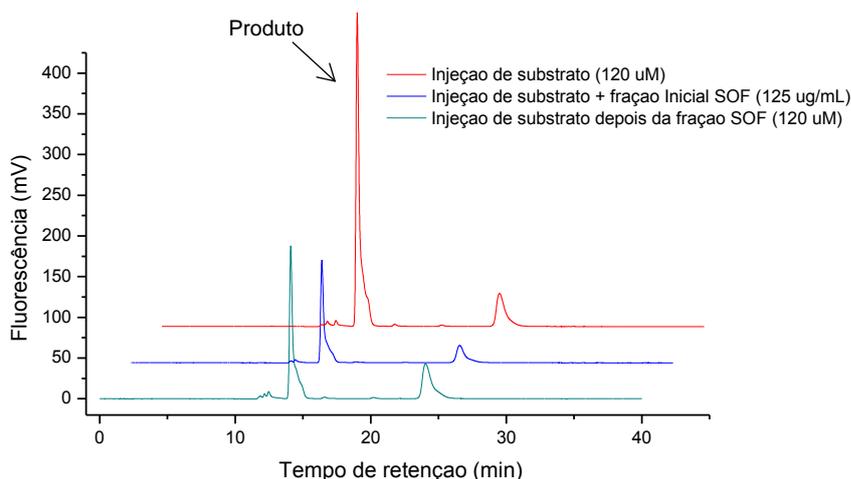


FIGURA 5.6 - Cromatogramas referentes à injeção de amostras proveniente de SOF no CatD-IMER.

Esse resultado mostra que os compostos presentes nas frações SOF possuem interações do tipo irreversíveis com a enzima, fazendo com que o CatD-IMER perdesse parcialmente sua atividade de forma permanente. Isso mostra que o IMER é capaz de identificar esse tipo de interação irreversível rapidamente nos ensaios de inibição, ao contrário dos ensaios em solução. Esses dados também demonstram que a técnica apresentou de forma eficiente os mesmos resultados observados nos ensaios em solução.

Portanto, a presença dos taninos justifica a atividade tão expressiva apresentada por esse extrato, tanto nos ensaios em solução como com a enzima

imobilizada, que teve sua atividade reduzida permanentemente. Essa classe de compostos não é interessante em ensaios enzimáticos, pois se ligam de forma inespecífica às enzimas, não resultando de um processo de inibição, mas sim inativação. Por esse motivo, não se trabalhou mais com esse extrato.

5.3.2 Inibidores inespecíficos

O fracionamento dos extratos DVFM e DVFH, pertencentes à mesma espécie vegetal, foi interrompido devido à verificação da presença de taninos nas frações iniciais. Tais compostos não são interessantes em ensaios enzimáticos, pois se ligam às enzimas forma não-específica, desativando-as e não inibindo-as (GACKO et al., 2007).

Como se pode perceber, muitos extratos empregados nos ensaios enzimáticos apresentaram interferências principalmente relacionadas aos taninos presentes, exibindo altos percentuais de inibição. Porém, é necessário ressaltar que inibidores são compostos que mostram afinidade química em relação a uma enzima ou possuem semelhança estrutural com o substrato, e assim são capazes de se ligar ao sítio catalítico de uma enzima formando um complexo inativo do tipo enzima-inibidor.

Os compostos químicos que reduzem a atividade da enzima por meio de outro mecanismo são chamados de “inativadores”, pois não apresentam especificidade em relação a uma determinada enzima ou um grupo de enzimas, mas fazem parte de um grupo de agentes desnaturantes de proteínas, como sais de metais pesados, taninos, detergentes, ácidos e bases, dentre outros (GACKO et al., 2007).

Esses compostos são denominados por alguns autores de “*PAINS*” (do inglês, *Pan Assay Interference Compounds*). Essa expressão é aplicada a compostos denominados artefatos, pois sua atividade não depende de uma interação específica com a proteína, mas se ligam de forma promíscua apresentando resultados falsos positivos em ensaios. Um exemplo de estrutura encontrada em produtos naturais, avaliada como “*PAINS*” é a curcumina, considerada promíscua nos ensaios em que é utilizada, mas que ainda é empregada como controle positivo em triagem de inibidores (BAELL & WALTERS, 2014).

BAELL e WALTERS (2014) chamam a atenção para esse tipo de problema, pois vários compostos considerados “*PAINS*”, de 5 a 12% dos compostos testados, estão sendo reportados como estruturas promissoras e inibidoras de determinadas enzimas, e na verdade são investimentos de tempo e dinheiro gastos em algo que não levará a um final de sucesso. Esses compostos apresentam falsos resultados, pois podem apresentar fluorescência ou são extremamente coloridos, dando sinais positivos até quando não há proteína presente. Outros compostos podem reagir com metais utilizados como reagentes nos ensaios e interagir com a proteína. Há alguns compostos que “sequestram” os íons metálicos essenciais para a função da proteína, e, finalmente, existem compostos que alteram as proteínas, mas não interagem especificamente com seu sítio ativo ou sítios alostéricos.

Por esses motivos, extratos que possuem taninos ou substâncias consideradas “*PAINS*” devem passar por tratamentos que eliminem efetivamente 100% destes interferentes ou devem ser evitados, pois, mesmo em quantidades muito pequenas, podem gerar resultados falsos nos ensaios enzimáticos.

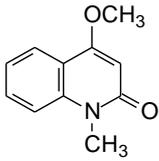
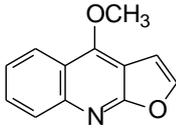
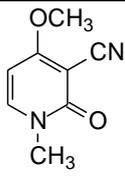
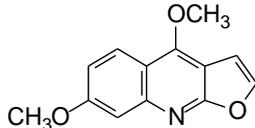
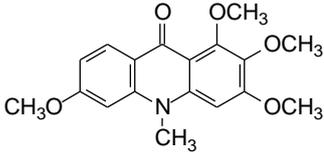
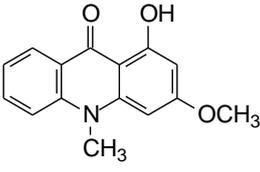
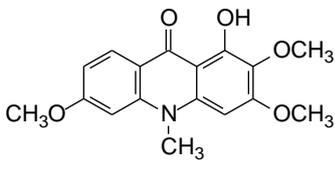
5.3.3 Triagem de substâncias puras utilizando a catepsina D em solução e o CatD-IMER

Além do estudo bioguiado dos extratos de plantas também se avaliou a atividade inibitória de 31 compostos frente à CatD utilizando o método em solução e a enzima imobilizada. A triagem realizada neste trabalho não resultou em inibições expressivas dos compostos frente à CatD. Porém, mais do que esses resultados, os ensaios mostraram a confiabilidade do CatD-IMER na triagem de inibidores. A seguir estão descritos os resultados de inibição (%) na concentração de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando as condições de ensaio previamente descritas.

5.3.3.1 Alcaloides

Os alcaloides apresentados na TABELA 5.3 não apresentaram inibições expressivas frente à catepsina D. A substância **4** mostrou uma inibição maior (43% e 27%) dentre os alcaloides testados. Quando sua estrutura é analisada verifica-se que a presença de uma metoxila a mais, quando comparada à estrutura do composto **2** (33% e 0%), proporcionou um aumento de atividade inibitória.

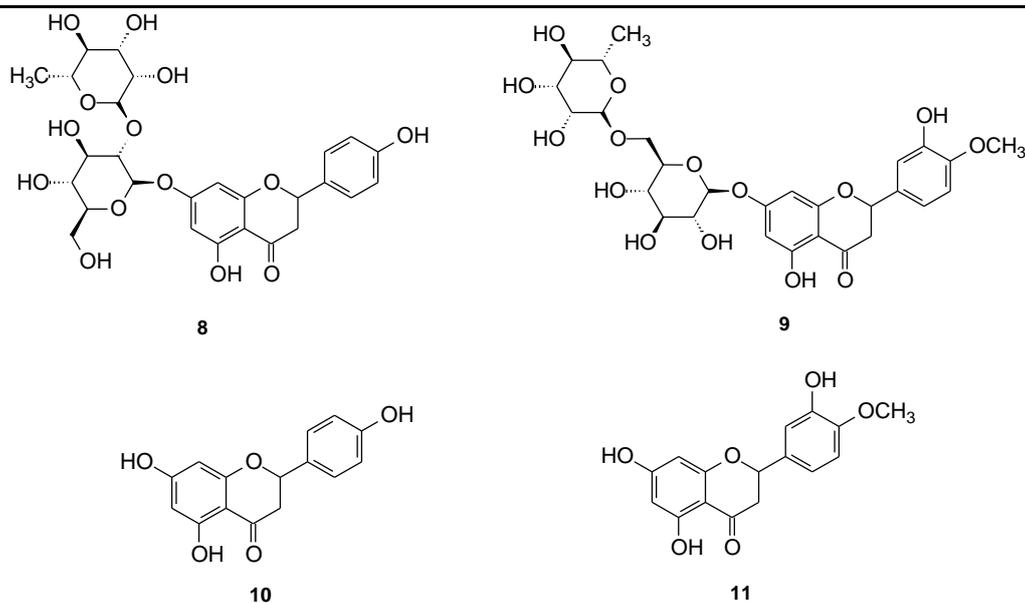
TABELA 5.3 - Porcentagem de inibição de alcaloides testados frente à CatD a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Composto	Inibição (%) CatD solução	Inibição (%) CatD-IMER
	15	15
	33	0
	7	19
	43	27
	31	0
	2	19
	6	0

5.3.3.2 Flavonoides e derivados

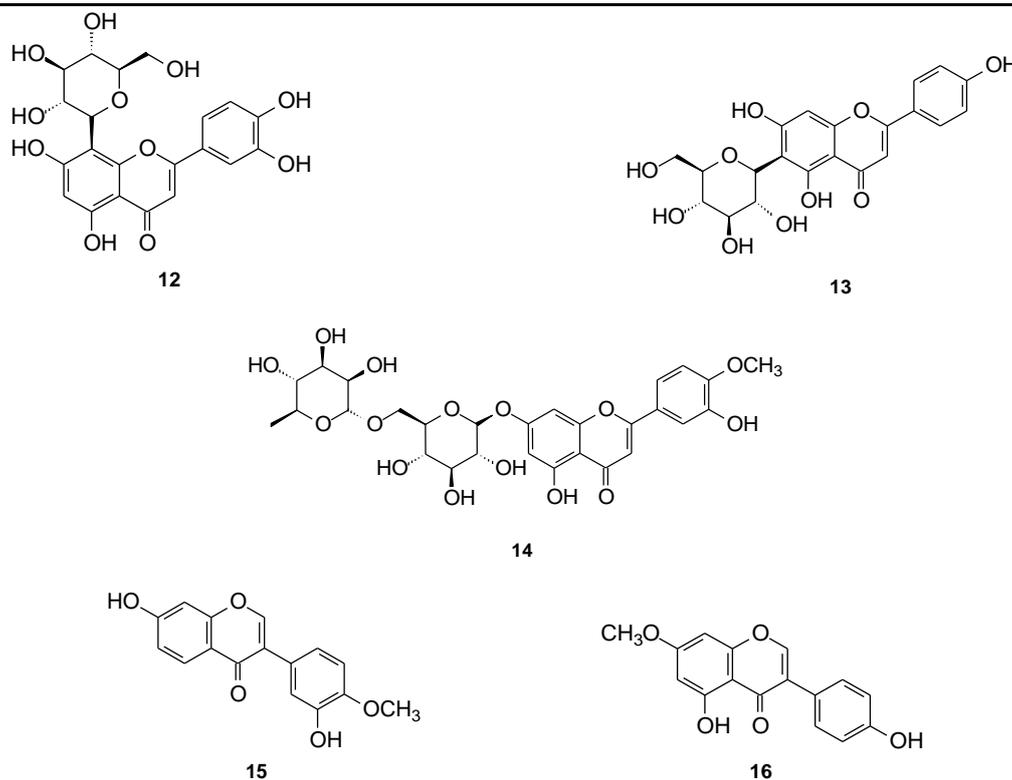
Alguns dos diversos flavonoides e seus derivados testados apresentaram atividade inibitória moderada, porém, mostraram resultados interessantes em termos da relação estrutura e atividade.

No caso das flavanonas e seus derivados, apresentados na TABELA 5.4, o ensaio em solução mostrou que há um pequeno aumento da atividade inibitória quando são modificados os substituintes do anel B. Em relação às substâncias **8** e **9**, pode-se verificar a mesma tendência tanto no ensaio em solução quanto no CatD-IMER, a modificação dos substituintes no anel B também proporcionaram uma ligeira mudança na atividade inibitória.

TABELA 5.4 - Porcentagem de inibição de flavanonas testadas frente à CatD a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Composto	Inibição (%) CatD solução	Inibição (%) CatD-IMER
8	15	8
9	20	29
10	25	0
11	37	0

No caso das flavonas (substâncias **12** a **14**) e das isoflavonas (**15** e **16**), apresentadas na TABELA 5.5, não se verificou atividade significativa tanto nos ensaios em solução como no CatD-IMER. Apenas observa-se uma maior inibição da isoflavona **15** em relação à estrutura **16** nos ensaios com o CatD-IMER.

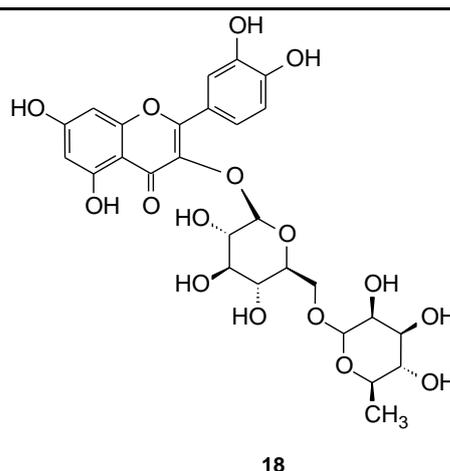
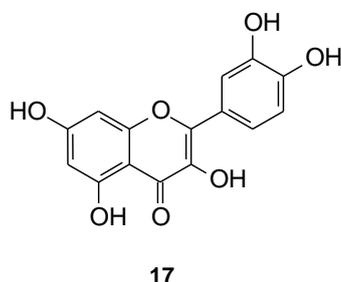
TABELA 5.5 - Porcentagem de inibição de flavonas e isoflavonas testadas frente à CatD a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Composto	Inibição (%) CatD solução	Inibição (%) CatD-IMER
12	6	3
13	3	0
14	15	0
15	0	27
16	0	1

Os flavonóis **17** e **18**, apresentados na TABELA 5.6, foram os que apresentaram os melhores percentuais de inibição dentro da classe estudada. Pode-se perceber que a presença das unidades de açúcares ligadas ao anel C no composto **18**, em relação à hidroxila na mesma posição no composto **17**, diminuiu a atividade inibitória frente à CatD nas duas técnicas utilizadas.

TABELA 5.6 - Porcentagem de inibição de flavonóis testados frente à CatD a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Composto	Inibição (%) CatD solução	Inibição (%) CatD-IMER
17	75	37
18	51	6

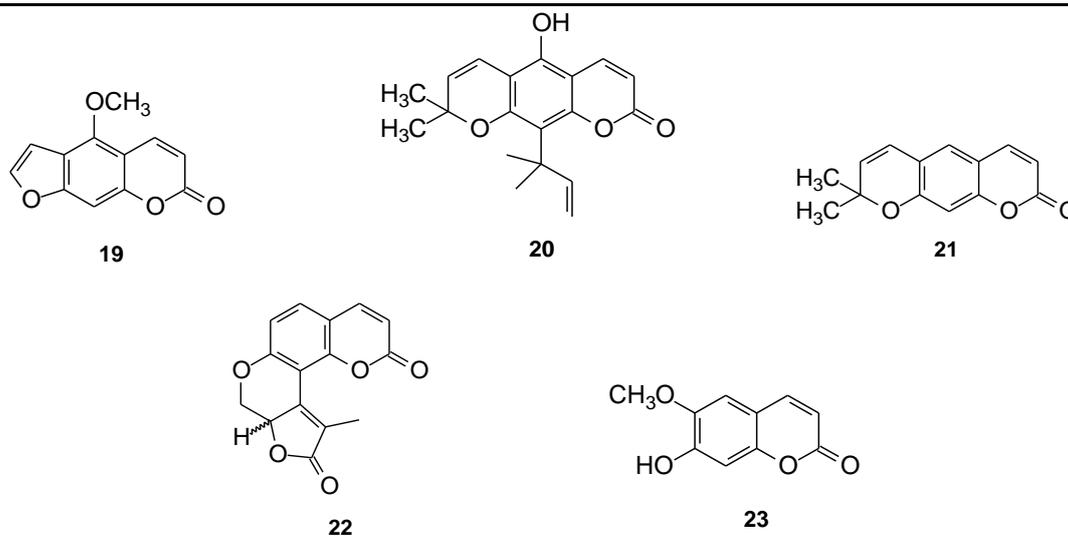


Em geral, nos ensaios em solução, dentro de cada grupo de flavonoides testados pôde-se verificar que unidades de açúcares ligadas proporcionaram uma diminuição na atividade inibitória do composto analisado. Porém, tanto no CatD-IMER quanto nos ensaios em solução não foi verificada nenhuma inibição expressiva dos flavonoides analisados, apenas inibição moderada do flavonol **17**.

5.3.3.3 Cumarinas

Dentro da classe das cumarinas, apresentadas na TABELA 5.7, observa-se uma inibição moderada nos ensaios em solução, da substância **22**. Pode-se perceber que a estrutura das pirano cumarinas **19** e **20** favorecem a inibição da CatD em solução quando comparadas com a inibição da cumarina **23** com estrutura simples.

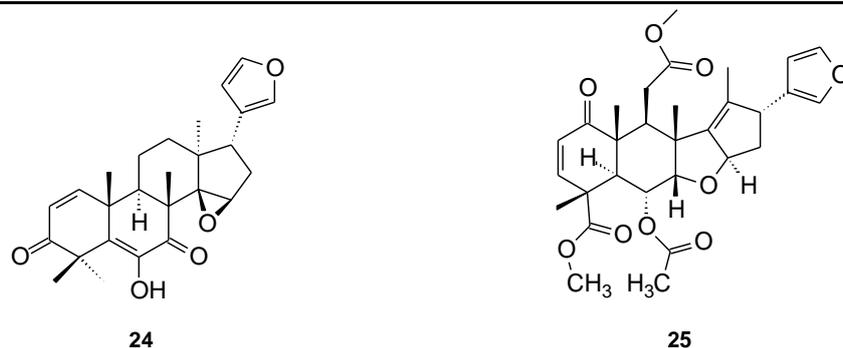
No CatD-IMER verificam-se percentuais de inibição muito parecidos entre si, porém nenhuma inibição expressiva dentre os compostos testados.

TABELA 5.7 - Porcentagem de inibição de cumarinas testadas frente à CatD a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Composto	Inibição (%) CatD solução	Inibição (%) CatD-IMER
19	3	18
20	10	39
21	43	14
22	65	21
23	0	19

5.3.3.4 Limonoides

Os limonoides apresentados na TABELA 5.8 não apresentaram atividade inibitória expressiva frente à CatD tanto em solução quanto no CatD-IMER. Não foram testados mais compostos dessa classe, portanto, pela indisponibilidade de estruturas a serem testadas não se pôde obter maiores conclusões, porém, esta classe não demonstra ser promissora na busca de inibidores da CatD.

TABELA 5.8 - Porcentagem de inibição de limonoides testados frente à CatD a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

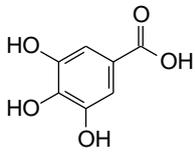
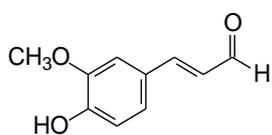
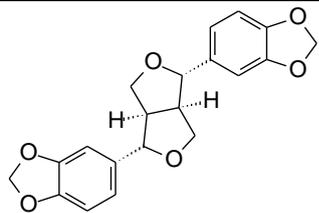
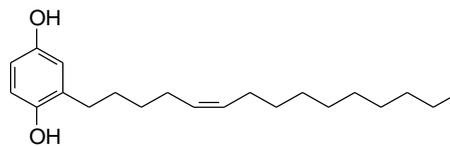
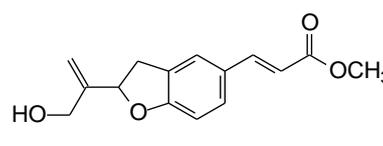
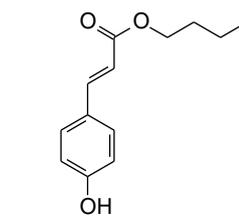
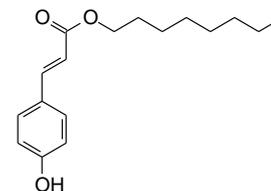
Composto	Inibição (%) CatD solução	Inibição (%) CatD-IMER
24	0	27
25	2	0

5.3.3.5 Outras classes de compostos de produtos naturais e compostos sintéticos

Dentre os compostos apresentados na TABELA 5.9, os de número **26** a **30** são oriundos de produtos naturais e os compostos **31** e **32** são sintéticos.

Dos resultados apresentados observa-se atividade expressiva do composto **29** tanto nos ensaios em solução quanto no CatD-IMER, com inibições de 100% e 54%, respectivamente. Sua estrutura é semelhante ao ácido cis-vacênico identificado em mistura na fração RRFH-DCM-Ace (pág. 66), e por esse motivo, ressalta-se a necessidade de ensaiá-lo isoladamente frente à CatD.

TABELA 5.9 - Porcentagem de inibição de diversas classes de compostos isolados de produtos naturais e compostos sintéticos testados frente à CatD a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Composto	Inibição (%) CatD solução	Inibição (%) CatD-IMER
	0	0
	21	30
	0	18
	100	54
	27	24
	0	29
	20	13

A fim de avalia-lo como inibidor de proteases de *S. mansoni*, essa estrutura (**29**) também foi ensaiada utilizando-se o EPV, e apresentou 90% de inibição frente às aspartil proteases presentes. Seu IC_{50} , calculado apenas frente à CatD em solução, foi de $27 \mu\text{mol L}^{-1}$. Não foi possível obter esse parâmetro para o CatD-IMER pelo baixo percentual de inibição obtido nos ensaios iniciais.

O composto **29** foi isolado de galhos da espécie *Lithraea molleoides* (LMGE), da família Anacardiaceae. Seu extrato etanólico bruto não apresentou resultados muito promissores nos ensaios com CatD, EPV e CatD-IMER, (52%, 68% e 28% de inibição, respectivamente). Porém, a espécie mostra ser muito promissora nos ensaios com a CatD, uma vez que a possibilidade da presença de outros compostos com estruturas semelhantes e o estudo de modificações estruturais podem trazer uma nova perspectiva na obtenção de inibidores de baixa massa molecular, como o composto **29**.

5.3.4 Análise da inibição do composto pepstatina A utilizando o CatD-IMER

A pepstatina A, um inibidor potente de aspartil proteases, é comumente utilizada como controle positivo nos ensaios utilizando a catepsina D como alvo, e neste trabalho foi utilizada nos ensaios em solução com a CatD e o EPV. No CatD-IMER, injetando-se uma concentração final de 1 nmol L^{-1} deste composto verificou-se que o biorreator tornou-se parcialmente inativo, com atividade reduzida em aproximadamente 60%.

Na tentativa de torná-lo novamente ativo foram testadas, na ordem que se segue, as condições:

- Eluição da fase H_2O durante 1 hora;
- Eluição de tampão fosfato 50 mmol L^{-1} pH 7,0;
- Injeção de solução com 10% de metanol;
- Injeção de solução com 40% de metanol.

Os cromatogramas que representam a injeção do substrato ($120 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) após o processo de limpeza descrito estão representados nas cores cinza, verde, laranja e rosa, respectivamente, na FIGURA 5.7.

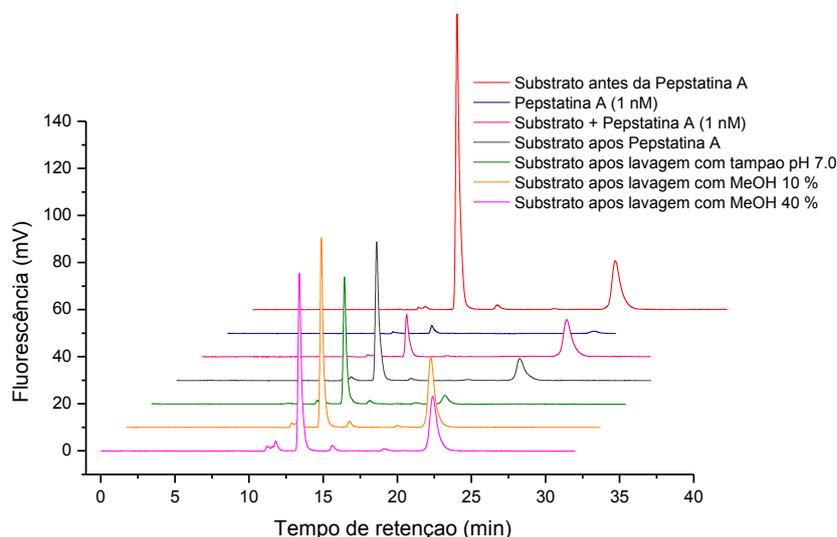


FIGURA 5.7 - Cromatogramas referentes à análise de inibição da pepstatina A e reativação do CatD-IMER.

Pode-se observar que a atividade da enzima imobilizada foi reduzida em aproximadamente 85% quando a solução de pepstatina A + substrato foi injetada (cromatograma pink) quando comparada com a enzima ativa (cromatograma vermelho). Porém, a atividade do CatD-IMER não retornou totalmente após lavagem com tampão de ensaio pH 4,0 (cromatograma cinza). Realizando-se vários processos de limpeza descritos verifica-se que, ao final, a atividade da enzima foi recuperada em aproximadamente 50% (cromatograma rosa).

Esses testes confirmam a alta potência inibitória da pepstatina A pela CatD, mesmo por meio de ensaios com a enzima imobilizada.

Em ensaios reportados com a catepsina D humana, a pepstatina A se mostra como o inibidor mais potente conhecido ($K_i = 0,01 \text{ nmol L}^{-1}$) (LEUNG et al., 2000). Seu mecanismo simplificado com as ligações de hidrogênio propostas é apresentado na FIGURA 5.8 (BALDWIN et al., 1993).

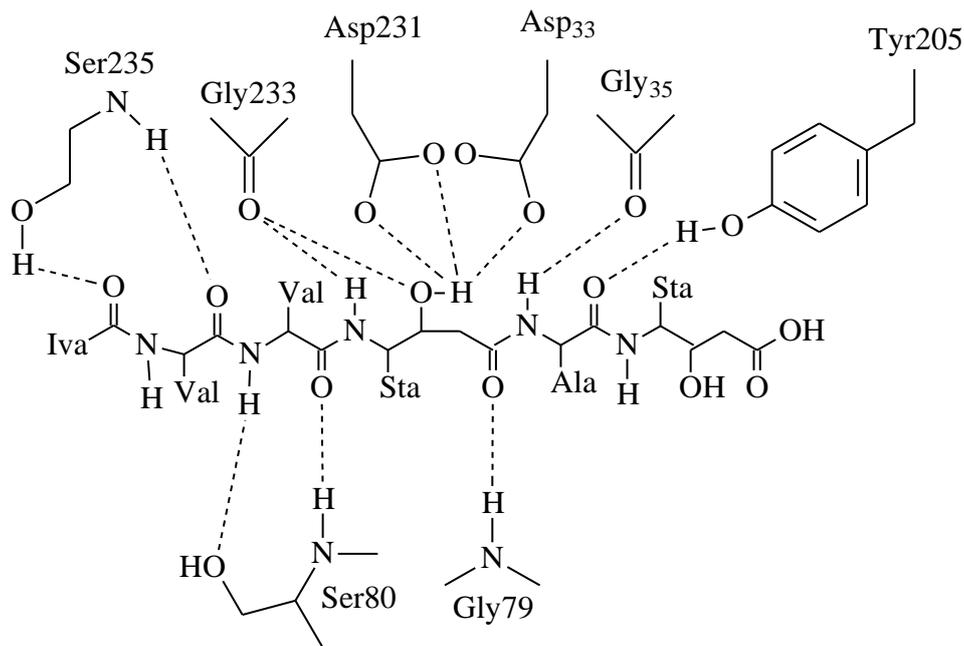


FIGURA 5.8 - Ligações de hidrogênio entre catepsina D e pepstatina. Figura adaptada de BALDWIN et al. (1993).

As interações entre a enzima e as pepstatinas não são consideradas irreversíveis, porém são inibidores muito potentes, com grandes afinidades. No CatD-IMER, mesmo realizando ensaios em concentrações baixas do inibidor (1 nmol L^{-1}) não foi possível recuperar toda a atividade do biorreator, devido à forte

interação entre a pepstatina A e a CatD imobilizada. Por esse motivo não foi possível realizar cálculos de IC_{50} utilizando-se o CatD-IMER e este composto e, como não há relatos de outros inibidores potentes confirmados na literatura, não foram realizados cálculos de IC_{50} nem determinados mecanismos de inibição de substâncias puras com o CatD-IMER.

5.4 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

A. Substância 4 - evolitrina

Analisando-se o espectro de RMN de 1H (FIGURAS 5.9 e 5.10) observam-se 5 sinais de hidrogênios aromáticos e dois sinais de hidrogênios de metoxilas, sendo um bastante desblindado em δ 4,42 (3H, s) característico de alcaloides furoquinolínicos, e outro em δ 3,94 (3H, s). O espectro mostra sinais em δ 7,57 (1H, d, $J = 2,8$ Hz) e δ 7,05 (1H, d, $J = 2,8$ Hz), referentes aos hidrogênios H-2' e H-3', respectivamente, do núcleo o furoquinolínico na estrutura de alcaloides. Nos alcaloides furoquinolínicos H-5 é mais desblindado, dessa forma, o sinal δ 8,15 (1H, d, $J = 9,3$ Hz) é atribuído a ele, acoplando com H-6 com constante *orto* de 9,3 Hz. O sinal em δ 7,10 (1H, dd, $J = 9,3$ e 2,5 Hz) foi atribuído a H-6 por acoplar com H-5 em *orto* (9,3 Hz) e com uma constante *meta* com H-8 (2,5 Hz). O sinal em δ 7,32 (1H, d, $J = 2,5$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-8 (1H, d, $J = 2,5$ Hz) acoplando em *meta* com H-6.

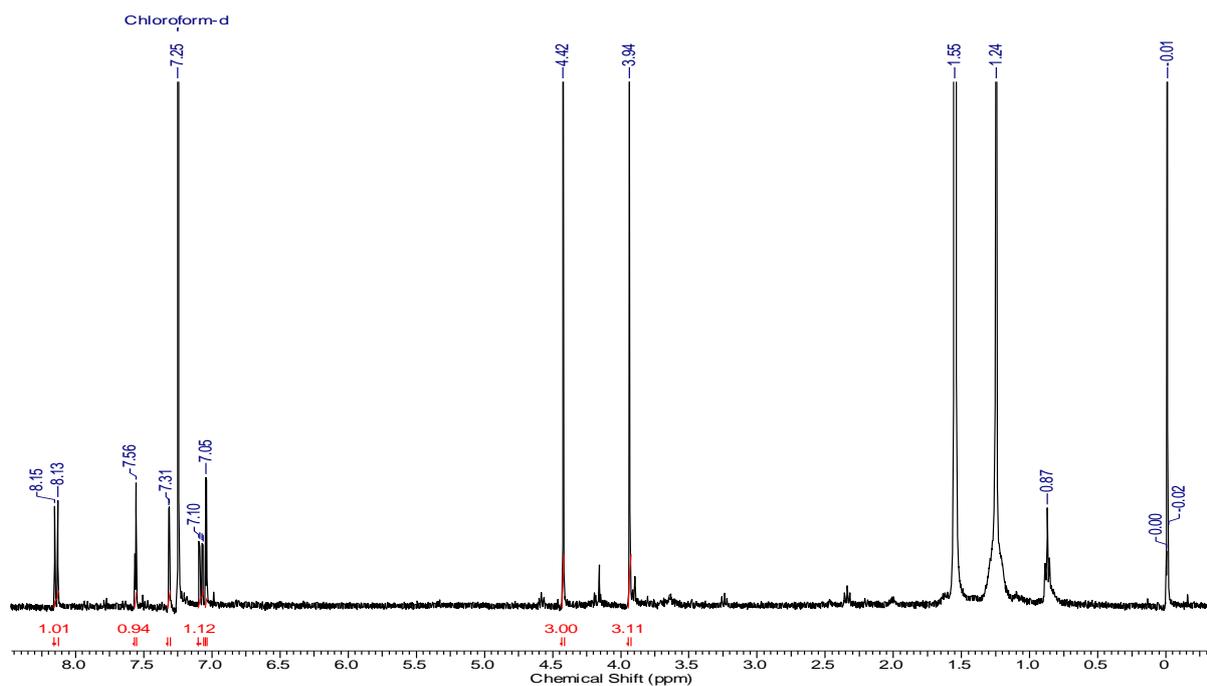


FIGURA 5.9 - Espectro de RMN de ^1H do composto evolitrina (CDCl_3 , 400 MHz).

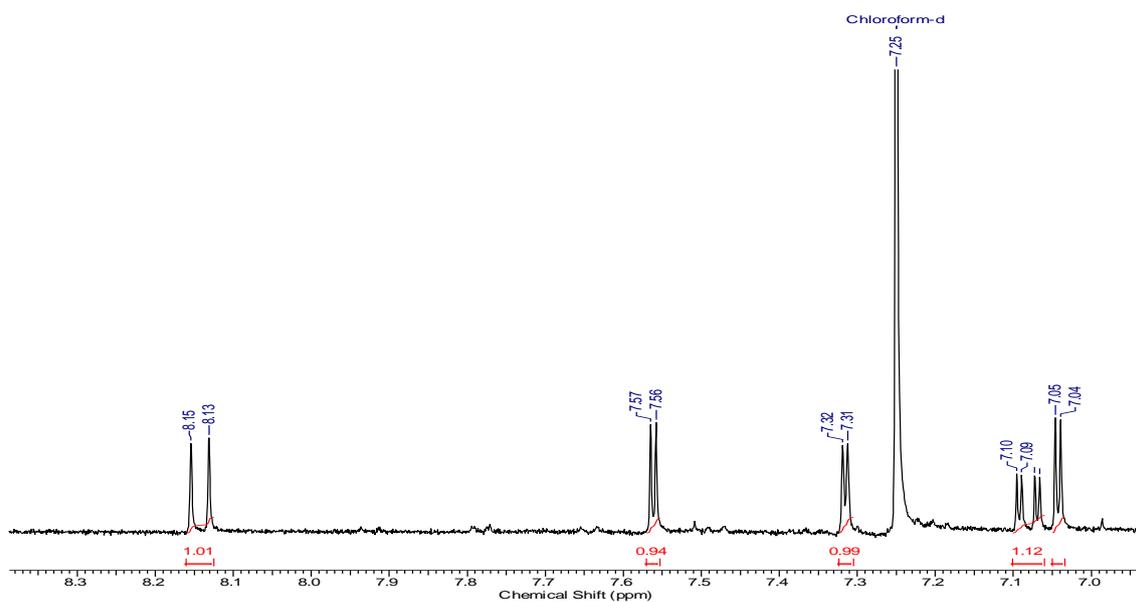


FIGURA 5.10 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto evolitrina (CDCl_3 , 400 MHz).

Também foram realizados experimentos de RMN 2D (COSY, HSQC e HMBC) (FIGURAS 5.11 a 5.13) e, portanto, a comprovação da estrutura do alcaloide evolitrina se deu pela análise dos dados do espectro e por comparação com os dados da literatura, apresentados na TABELA 5.10.

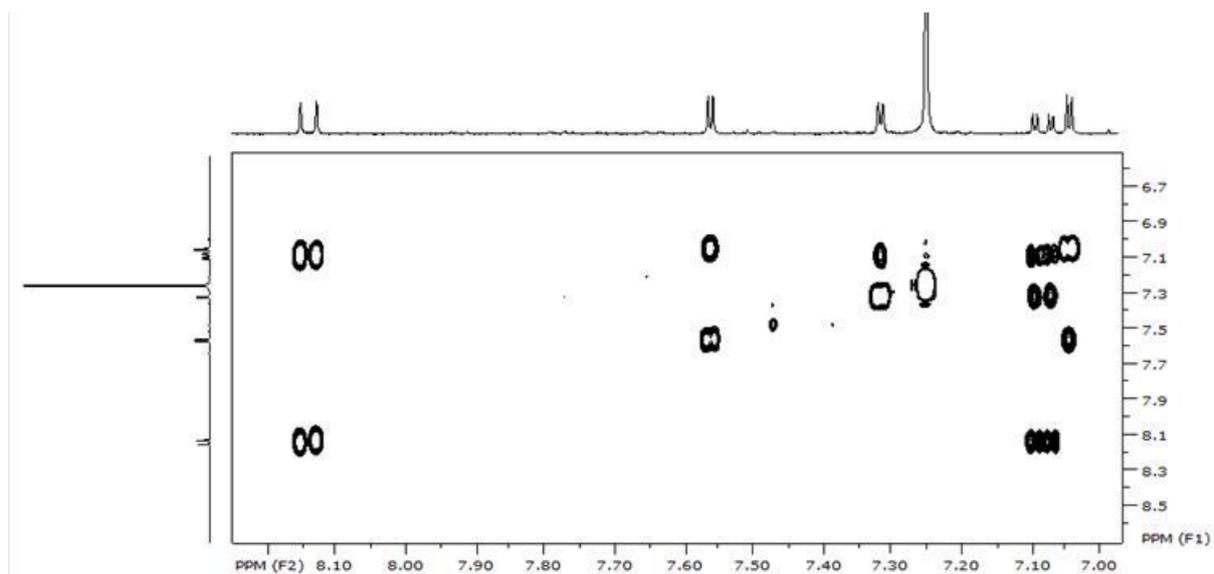


FIGURA 5.11 - Espectro de COSY do composto evolitrina (CDCl_3 , 400 MHz).

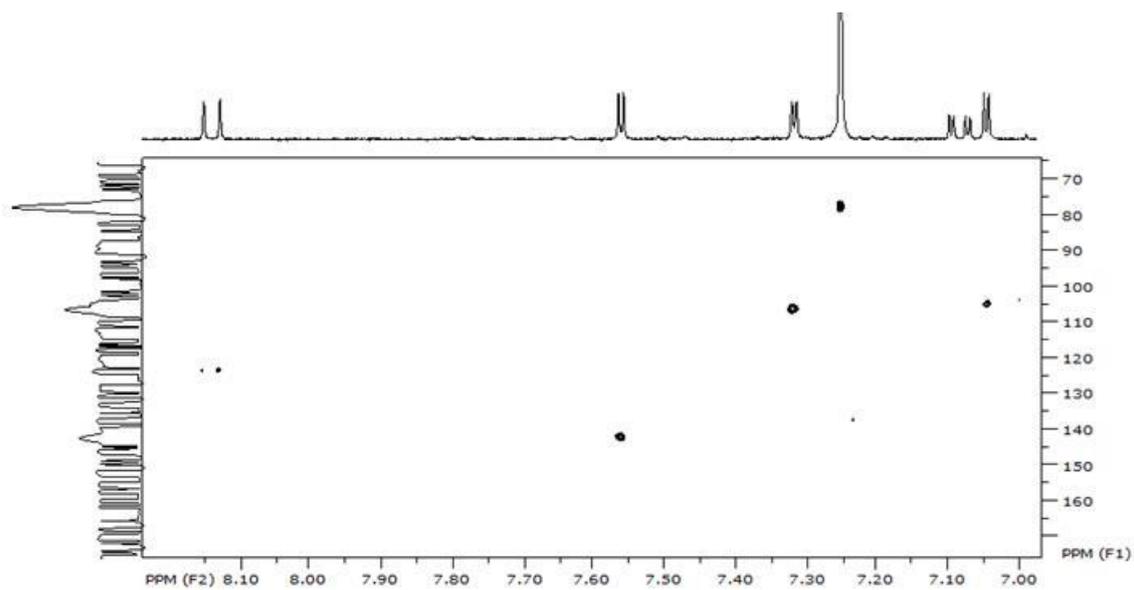


FIGURA 5.12 - Mapa de correlações HSQC do composto evolitrina (CDCl_3 , 400 MHz).

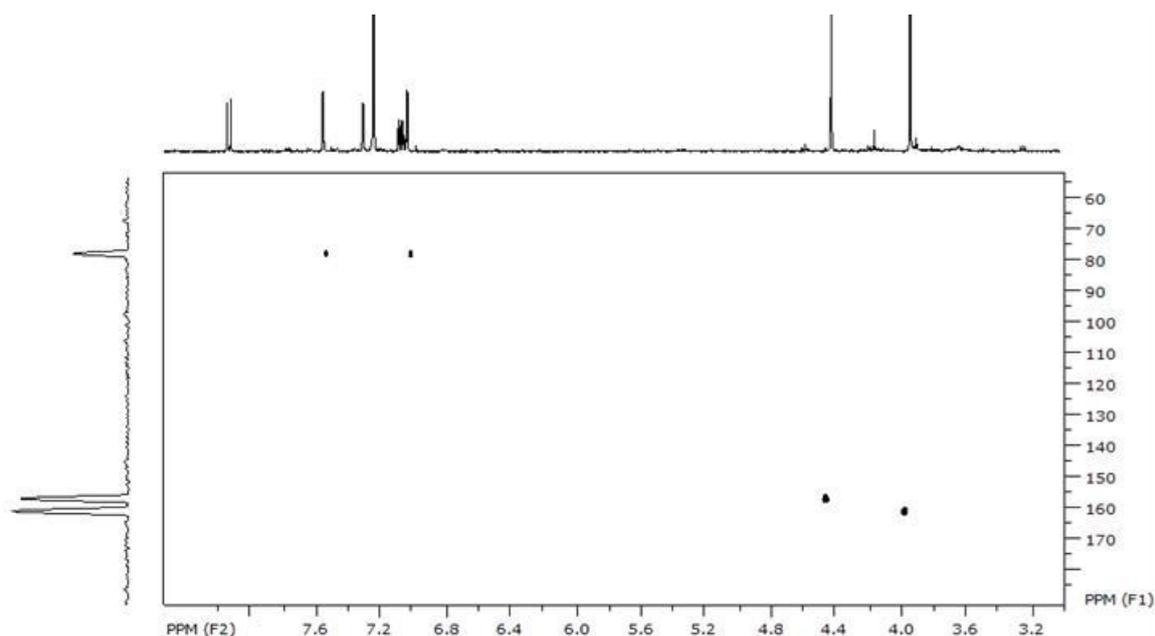
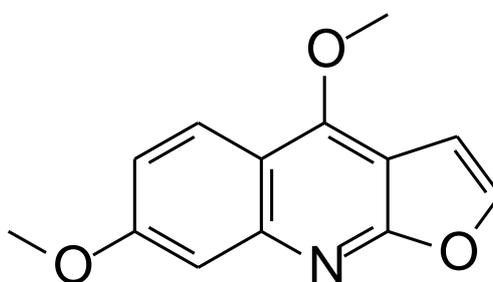


FIGURA 5.13 - Mapa de correlações HMBC do composto evolitrina (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 5.10 - Dados de RMN de ^1H do composto evolitrina.

Hidrogênio	δ (ppm), J (Hz) (CDCl_3 , 400 MHz)	δ (ppm), J (Hz) (CDCl_3 , 200 MHz) (PUSSET et al., 1991)
H-2'	7,57 (1H, d, $J = 2,8$)	7,57 (1H, d, $J = 2,8$)
H-3'	7,05 (1H, d, $J = 2,8$)	7,05 (1H, d, $J = 2,8$)
H-5	8,15 (1H, d, $J = 9,3$)	8,15 (1H, d, $J = 9,3$)
H-6	7,10 (1H, dd, $J = 9,3$ e $2,5$)	7,09 (1H, dd, $J = 9,3$ e $2,6$)
H-8	7,32 (1H, d, $J = 2,5$ Hz)	7,33 (1H, d, $J = 2,6$ Hz)
4-OCH ₃ , 3H	4,42 (3H, s)	4,30 (3H, s)
8-OCH ₃ , 3H	3,94 (3H, s)	3,88 (3H, s)



Evolitrina

B. Substância 27 – 4-hidroxi-3-metoxicinamaldeído

O espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 5.14 e 5.15) da substância isolada apresentou um duplo dubleto em δ 6,58 (1H, dd, $J = 15,8$ Hz e $7,7$ Hz) e dois dubletos em δ 7,40 (1H, $J = 15,8$ Hz) característicos de hidrogênios olefínicos em relação *trans*, e um dubleto em δ 9,64 (1H, d, $J = 7,7$ Hz) característico de hidrogênios de aldeídos. Observam-se ainda dois dubletos em δ 7,06 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) e δ 6,95 (1H, d, $J = 8,1$ Hz) e um duplo dubleto em δ 7,12 (1H, dd, $J = 8,1$ Hz e $2,0$ Hz), que sugere a presença de um anel aromático tri-substituído. Um singleto em δ 3,94 (3H, s) atribuiu-se à metoxila, o que se sugeriu ser esta, juntamente com a hidroxila, os substituintes do anel aromático.

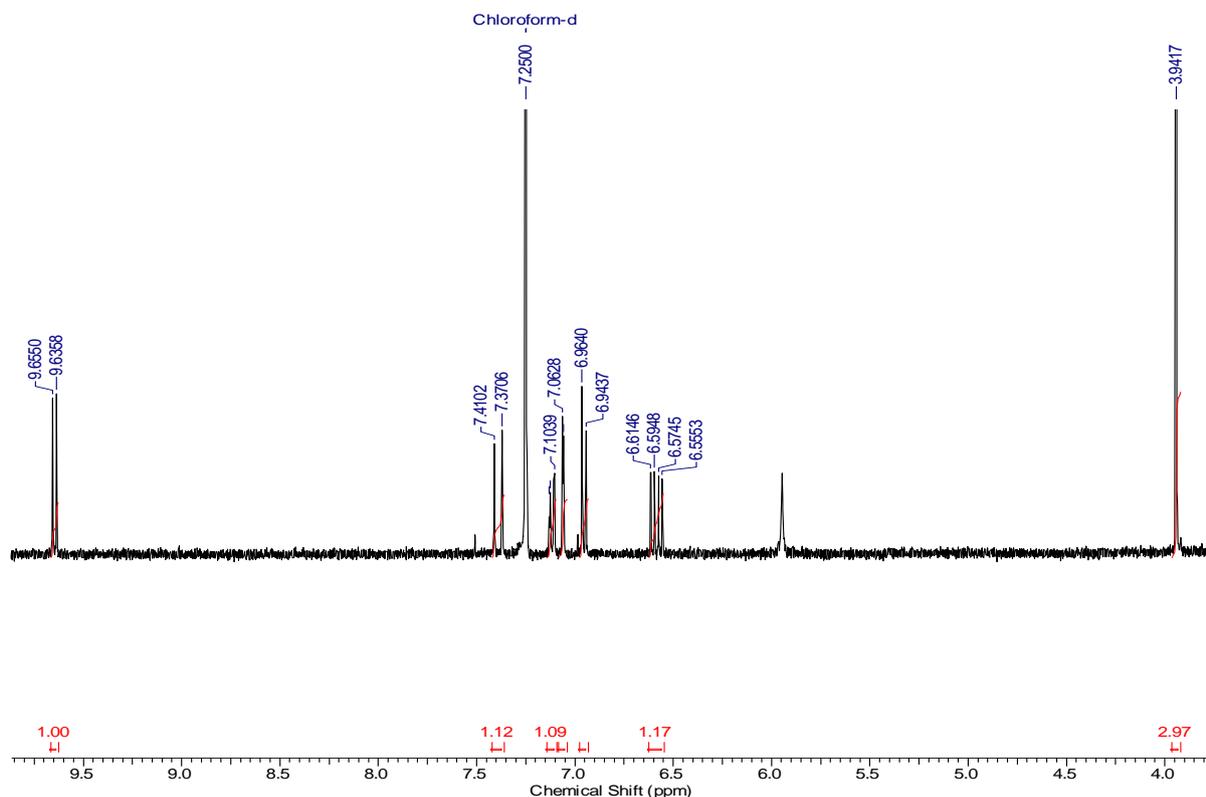


FIGURA 5.14 - Espectro de RMN de ^1H do composto 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído (CDCl_3 , 400 MHz).

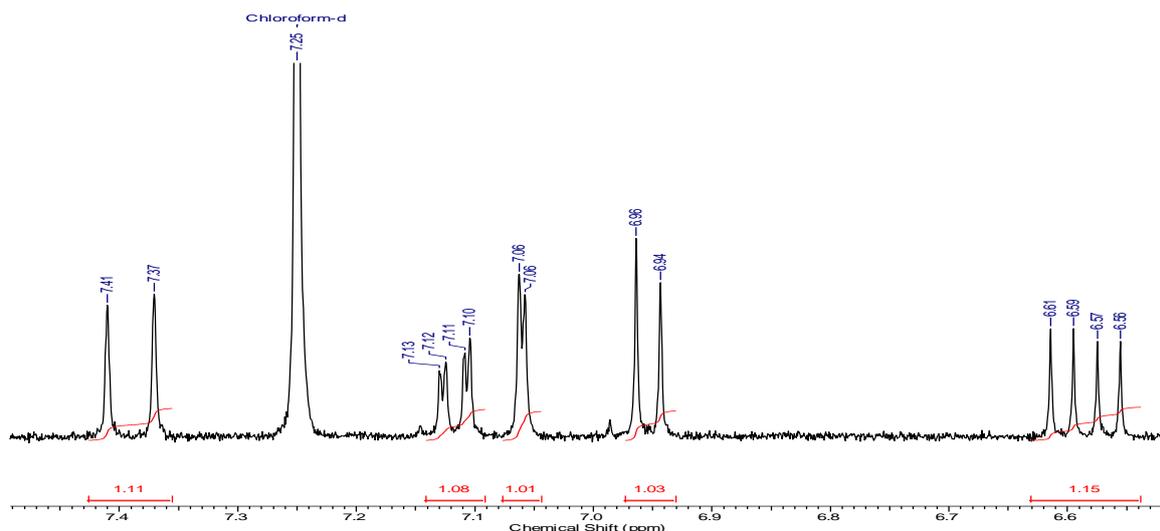


FIGURA 5.15 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído (CDCl_3 , 400 MHz).

A análise do espectro de COSY (FIGURA 5.16) mostra que o hidrogênio representado pelo duplo dubleto em δ 6,58 acopla com o representado pelo sinal em δ 9,64 e também com o do sinal em δ 7,40. Ainda o hidrogênio atribuído ao duplo dubleto em δ 7,12 acopla com o do sinal em δ 6,95.

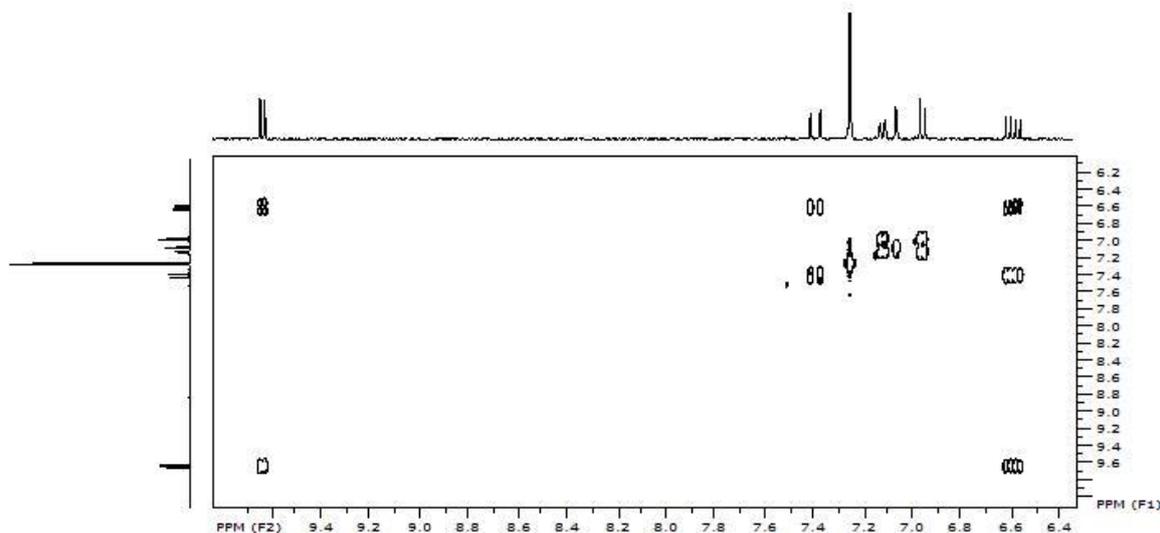


FIGURA 5.16 - Espectro de COSY do composto 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído (CDCl_3 , 400 MHz).

O espectro de HSQC (FIGURA 5.17) mostra a correlação a J_1 dos dois dubletos em δ 7,40 com o C-3 em δ 153,0, do duplo dubleto em δ 7,12 com o C-6' em δ 124,0, do dubleto em δ 7,06 com o C-2' em δ 110,0 e do dubleto em δ 6,95 com o C-5' em δ 116,0.

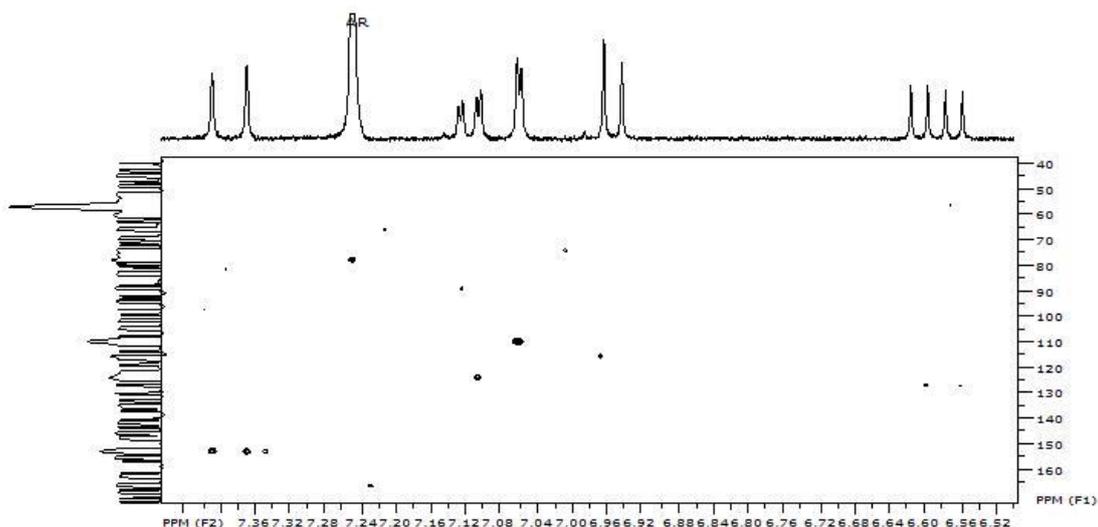
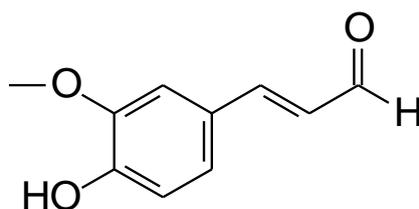


FIGURA 5.17 - Mapa de correlações HSQC do composto 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído (CDCl_3 , 400 MHz).

Com os experimentos citados e a comparação dos dados obtidos com a literatura (CARPINELLA et al., 2003) (TABELA 5.11) foi possível determinar a estrutura do composto como 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído.

TABELA 5.11 - Dados de RMN de ^1H do composto 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído.

Hidrogênio	δ (ppm), J (Hz) (CDCl_3 , 400 MHz)	δ (ppm), J (Hz) (CDCl_3 , 200 MHz) (CARPINELLA et al., 2003)
H-1	9,64 (1H, d, $J = 7,7$)	9,65 (1H, d, $J = 7,7$)
H-2	6,58 (1H, dd, $J = 15,8$ e $7,7$)	6,59 (1H, q, $J = 7,8$)
H-3	7,40 (1H, d, $J = 15,8$)	7,35 (1H, t, $J = 17,9$)
H-2'	7,06 (1H, d, $J = 2,0$)	7,07 (1H, d, $J = 1,8$)
3'-OCH ₃ , 3H	3,94 (3H, s)	3,94 (3H, s)
4'-OH	-	-
H-5'	6,95 (1H, d, $J = 8,1$)	6,96 (1H, d, $J = 8,6$)
H-6'	7,12 (1H, dd, $J = 8,1$ e $2,0$)	7,12 (1H, dd, $J = 8,1$ e $1,8$)



4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído

C. Substância 12 – orientina

O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 5.18) mostra um duplo dubleto em δ 7,42 (1H, dd, $J = 1,52$ e $J = 8,50$ Hz), um dubleto em δ 7,35 (1H, d, $J = 1,52$ Hz) e dubleto em δ 6,73 (1H, d, $J = 8,50$ Hz) indicando se tratar de um anel aromático B trissubstituído com constantes características de acoplamento *orto* e *meta*. A correlação *orto*, confirmada no espectro de COSY (FIGURA 5.19), foi atribuída aos hidrogênios H-5' (δ 6,73) e H-6' (δ 7,42) com constante de acoplamento $J = 8,5$ Hz, e a correlação *meta* com o hidrogênio H-2' (δ 7,35) com constante de acoplamento $J = 1,52$ Hz. A presença de dois singletos em δ 6,43 (1H) e δ 5,98 (1H) evidencia a presença de uma flavona, podendo-se atribuir o primeiro sinal ao hidrogênio H-3. Observou-se também a presença de um hidrogênio anomérico (H-1'') de glicosídeos em δ 4,68 (1H, d, $J = 9,50$ Hz).

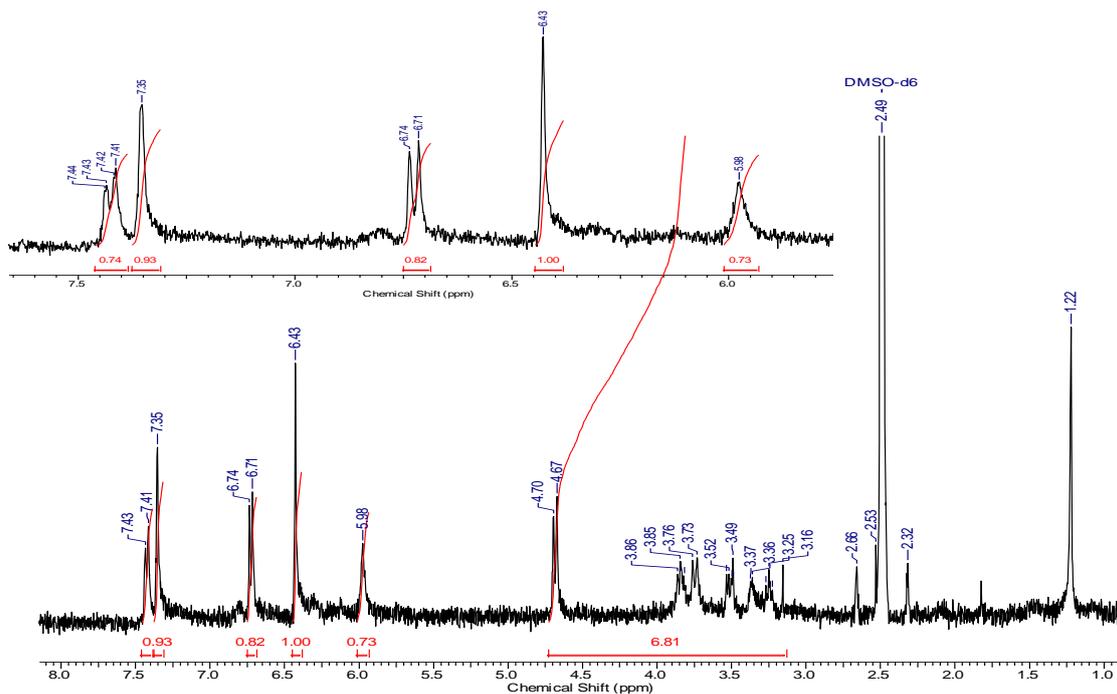


FIGURA 5.18 - Espectro de RMN de ^1H do composto orientina ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz).

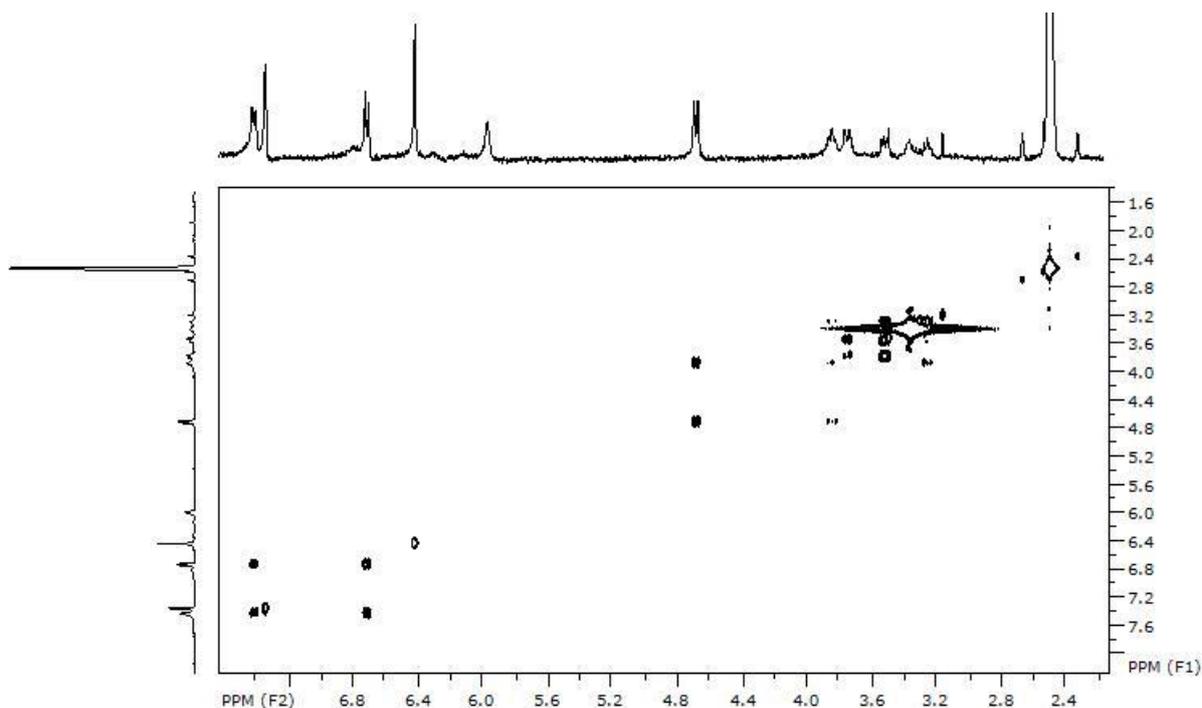


FIGURA 5.19 - Espectro de COSY do composto orientina (DMSO- d_6 , 400 MHz).

No espectro de HSQC (FIGURA 5.20) verificam-se as correlações dos hidrogênios em δ 7,42 (1H, dd, $J = 1,52$ e $J = 8,50$), δ 7,35 (1H, d, $J = 1,52$ Hz) e δ 6,73 (1H, d, 8,50) com os carbonos em δ 120,0, e δ 113,2 e δ 116,1, respectivamente e do singlete em δ 6,43 (H-3) com o carbono em δ 101,7 (C-3). Isso confirma a estrutura do anel B da flavona, restando somente as opções de duas flavonas, a isorientina e orientina, que diferem apenas na posição do açúcar nas posições C-6 ou C-8, respectivamente.

Segundo HARBONE (1994), os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento de hidrogênios anoméricos podem elucidar se o glicosídeo está ligado no C-6 ou C-8 através de uma ligação “C-glicopiranosídeo” ou “O-glicopiranosídeo”. O hidrogênio anomérico neste espectro, com deslocamento químico em δ 4,68 e constante de acoplamento $J = 9,52$ sugere a presença de uma glicose ligada de forma C-glicopiranosídeo (HARBONE, 1994).

Como a massa obtida do composto foi pequena, não foi possível obter o espectro de HMBC, porém, em comparação com dados apresentados na literatura podemos verificar que os valores dos sinais de RMN de ^1H coincidem com a flavona orientina. Quando se analisa a posição da glicose no anel A verifica-se que o singlete referente ao hidrogênio H-6 apresenta um deslocamento químico de δ 5,98

enquanto o deslocamento químico do hidrogênio H-8, apresentado na literatura para o composto isorientina, apresenta um deslocamento de δ 6,48 (CHANG, 2009).

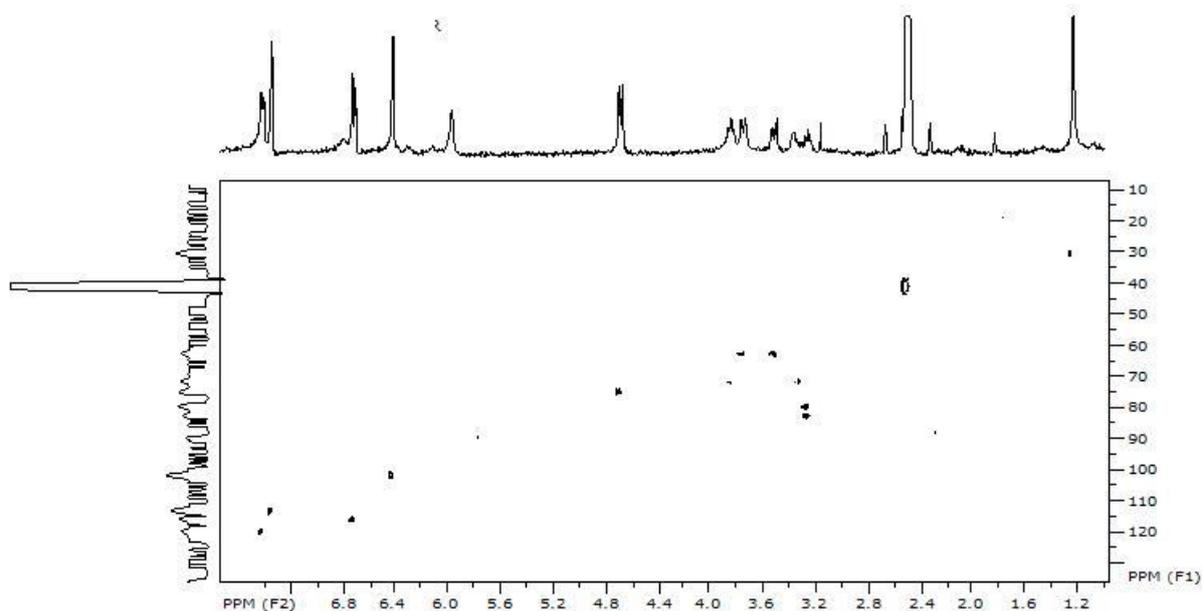
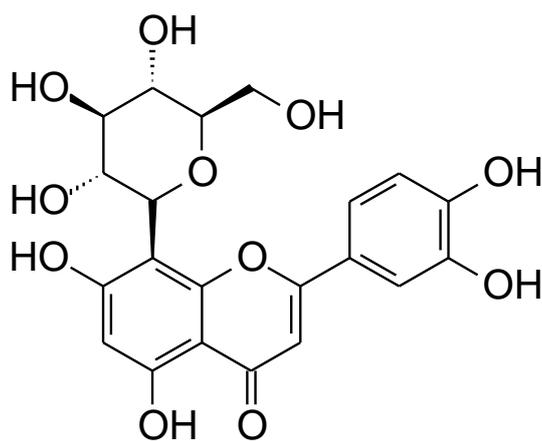


FIGURA 5.20 - Mapa de correlações HSQC do composto orientina (DMSO- d_6 , 400 MHz).

Portanto, por meio de experimentos de RMN 1D e 2D e comparação com dados apresentados na literatura (CHANG, 2009, DE OLIVEIRA et al., 2013) (TABELAS 5.12 e 5.13) foi possível identificar o composto como a flavona orientina.



Orientina

TABELA 5.12 - Dados de RMN de ^1H do composto orientina.

H	δ (ppm), J (Hz) (DMSO, 400 MHz)	δ (ppm), J (Hz) (DMSO, 500 MHz) (ZHOU et al., 2005)
3	6,43 (1H, s)	6,65 (1H, s, H-3)
5 – OH	-	13,15 (1H, s)
6	5,98 (1H, s)	6,25 (1H, s)
2'	7,35 (1H, d, $J = 1,52$)	7,44 (1H, d, $J = 2,1$)
6'	7,42 (1H, dd, $J = 1,5$ e $J = 8,5$)	7,50 (1H, dd, $J = 2,1$ e $8,0$)
5'	6,73 (1H, d, $J = 8,5$)	6,90 (1H, d, $J = 8,2$)
6-C-Glc	3,18-3,88 (6H, m)	3,22–3,88 (6H, m)
1''	4,68 (1H, d, $J = 9,50$)	4,72 (1H, d, $J = 9,0$)

TABELA 5.13 - Dados de RMN de ^{13}C do composto orientina.

C	HSQC δ (ppm) (DMSO, 400 MHz)	^{13}C δ (ppm) (DMSO, 125 MHz) (ZHOU et al., 2005)
2		164,16
3	101,7	102,41
4		182,03
5		160,47
6		98,31
7		162,80
8		104,65
9		156,01
10		103,99
1'	120,0	121,97
2'	113,2	114,07
3'		145,95
4'		149,90
5'	116,1	115,78
6'		119,45
6-C-Glc		
1''	74,0	73,50
2''	71,0	70,90
3''	79,8	78,88
4''	70,6	70,83
5''	82,0	82,04
6''	62,0	61,76

D. Substância 13 - isovitexina

O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 5.21) mostra dois dubletos em δ 7,84 e δ 6,88 (2H, d, $J = 8,0$ Hz) que possuem constante de acoplamento *orto*, confirmada pela correlação apresentada no espectro de COSY (FIGURA 5.22), atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-6', H3' e H-5'. A presença de um singlete em δ 6,58 (1H), atribuído ao hidrogênio H-3, evidencia a presença de uma flavona. Observou-se também a presença de um hidrogênio anomérico (H-1'') de glicosídeos em δ 4,54 (1 H, d, $J = 8,0$ Hz).

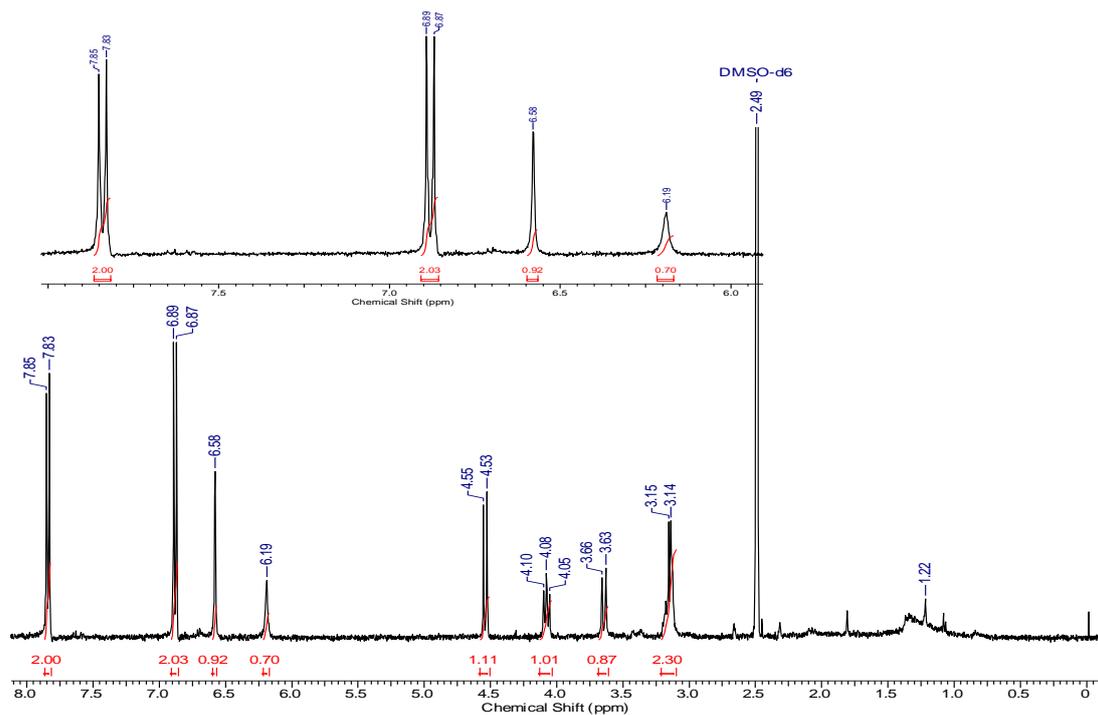


FIGURA 5.21 - Espectro de RMN de ^1H do composto isovitexina ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz).

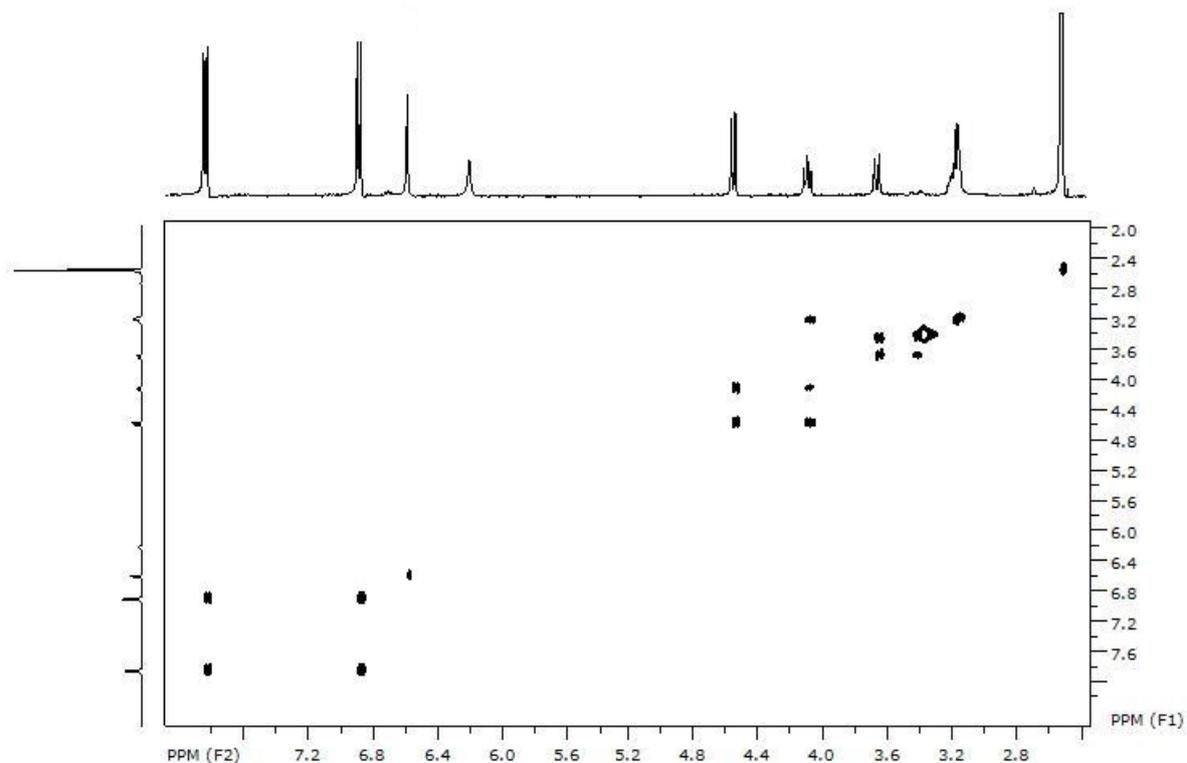


FIGURA 5.22 - Espectro de COSY do composto isovitexina ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz).

No espectro de HSQC (FIGURA 5.23) verificam-se as correlações dos hidrogênios em δ 7,84 (H2'/H6') e δ 6,88 (H-3'/H-5') com os carbonos em δ 128,4 e δ 116,4, respectivamente e do singlete em δ 6,58 (H-3) com um carbono em δ 102,7 (C-3). No espectro de HMBC (FIGURA 5.24) observa-se a correlação do sinal em δ 7,84 (H2'/H6') com o carbono em δ 161,8, atribuído ao carbono C-2 e a correlação do sinal em δ 6,88 (H-3'/H-5') com os carbonos em δ 121,8 e δ 161,8, atribuídos aos carbonos C-1' e C-2, respectivamente. O singlete em δ 6,58 (H-3) se correlaciona com os carbonos em δ 101,3, 121,8 e δ 161,8, atribuídos aos carbonos C-10, C-1' e C-2, respectivamente.

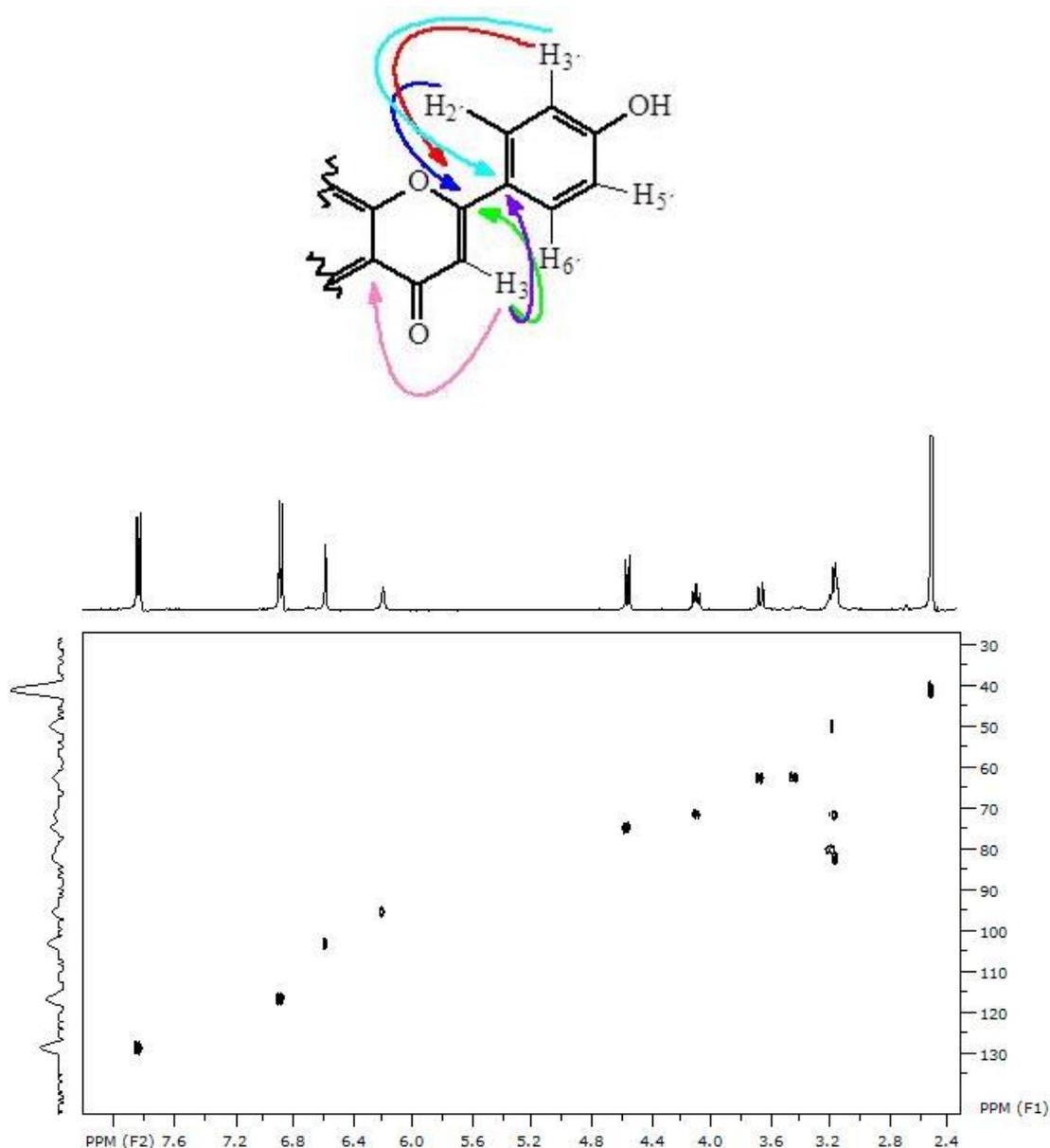


FIGURA 5.23 - Mapa de correlações HSQC do composto isovitexina (DMSO-*d*₆, 400 MHz).

A posição na qual o glicosídeo está ligado foi atribuída por meio das correlações observadas no espectro de HMBC e análise na literatura, pois a constante de acoplamento dos sinais dos hidrogênios anoméricos e seus deslocamentos químicos frequentemente indicam a configuração e posição do açúcar ligado à aglicona. O sinal do hidrogênio H1'' em δ 4,54 (1H, d, $J = 8$ Hz) apresenta correlação, no espectro de HMBC, com sinais em δ 70,5, 79,1, 109,6 e 161,1, atribuídos aos carbonos C-2'', C-3'', C-6 e C-5, respectivamente. Isso indica que a glicose está ligada à flavona por uma ligação C-glicopiranosídeo, evidenciada pelo deslocamento de C-6 em δ 109,6, valor baixo para ser um O-glicosídeo e muito alto para ser uma ligação C-H.

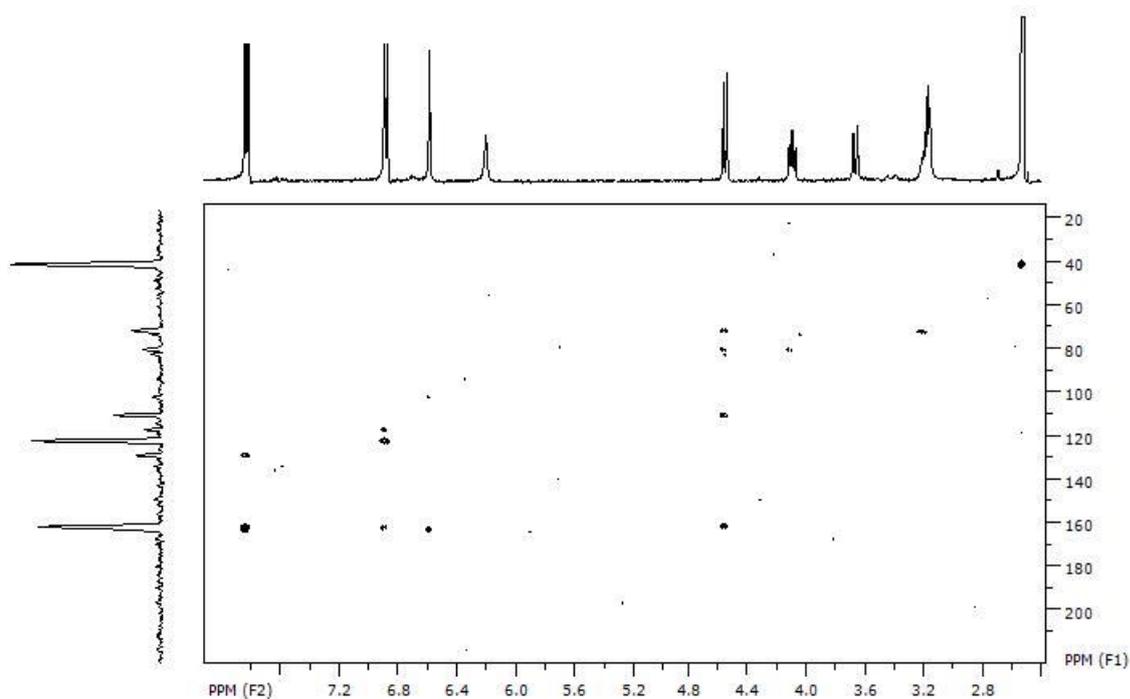
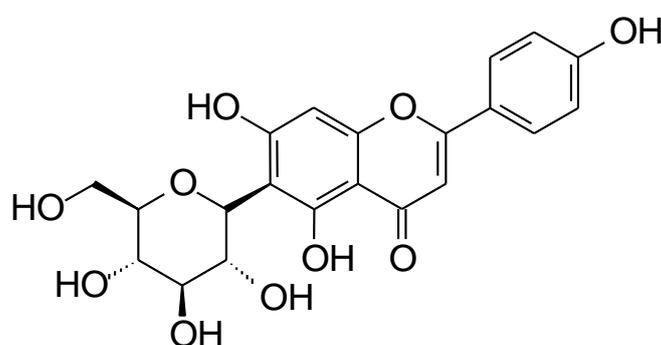


FIGURA 5.24 - Mapa de correlações HMBC do composto isovitexina (DMSO- d_6 , 400 MHz).

A glicose também pôde ser confirmada com a configuração 6-C- β -D-glicosídeo, pela correlação do hidrogênio H1'' com o C-5 se dá em δ 161,3. Caso o deslocamento químico desse sinal fosse maior (por volta de δ 163-164) essa confirmação não poderia ser feita somente com essa correlação, pois poderia ser com carbono C-7 e o açúcar poderia estar na posição C-8, uma vez que H-1'' não apresentou mais nenhuma correlação no espectro de HMBC. Além disso, HARBONE (1994) demonstra que o fato do deslocamento químico do hidrogênio

anomérico estar em δ 4,54 representa uma ligação do carbono C-6, pois se a ligação estivesse no carbono C-8 esse deslocamento seria acima de δ 4,64.

Os experimentos de RMN 1D e 2D e a comparação com dados apresentados na literatura (TABELAS 5.14 e 5.15) possibilitaram a identificação da flavona isovitexina (PENG et al., 2008).



Isovitexina

TABELA 5.14 - Dados de RMN de ^1H do composto isovitexina.

H	δ (ppm), J (Hz) (DMSO, 400 MHz)	δ (ppm), J (Hz) (DMSO, 500 MHz) (PENG et al., 2008)
3	6,58 (1H, s)	6,78 (1H, s)
5	-	13,55 (1H, s)
8	6,19 (1H, s)	6,51 (1H, s)
2', 6'	7,84 (2H, d, $J = 8,0$)	7,91 (2H, d, $J = 8,8$)
3', 5'	6,88 (2H, d, $J = 8,0$)	6,91 (2H, d, $J = 8,8$)
6-C-Glc	4,10 – 3,14 (6H, m)	4,03 - 3,11 (6H, m)
1''	4,54 (1H, d, $J = 8$)	4,58 (1H, d, $J = 9,0$)

TABELA 5.15 - Dados de RMN de ^{13}C do composto isovitexina.

C	HSQC δ (ppm) (DMSO, 400 MHz)	^{13}C δ (ppm) (DMSO, 500 MHz) (PENG et al., 2008)
2	161,8	163,5
3	102,7	102,8
4	-	181,9
5	161,1	161,2
6	109,6	108,9
7	-	163,3
8	95,1	93,6
9	-	156,2
10	101,3	103,4
1'	121,8	121,1
2', 6'	128,4	128,5
3', 5'	116,4	116,0
4'		160,7
6-C-Glc		
1''	74,6	73,6
2''	70,5	71,2
3''	79,1	78,9
4''	70,5	70,6
5''	81,7	81,6
6''	61,7	61,5

PARTE I
Conclusões

6 CONCLUSÕES

Esta parte do trabalho mostrou o sucesso da imobilização da enzima CatD em capilar de sílica fundida produzindo o CatD-IMER. O método multidimensional desenvolvido contou com a utilização, além dos eluentes apropriados, do CatD-IMER e de uma coluna C18 Luna-Phenomenex[®], responsável pela separação do substrato fluorogênico utilizado (S-MOCAC) e o produto fluorescente da reação, P-MOCAC, em um sistema de cromatografia zonal. O método de triagem se mostrou efetivo na avaliação da atividade inibitória individual dos extratos de plantas e compostos puros. Este método, ao contrário dos ensaios em solução, permitiu a reutilização da enzima CatD em diversos ensaios, a qual se manteve ativa por aproximadamente um mês. As análises mostraram reprodutibilidade principalmente por estarem associadas a um sistema automatizado, permitindo a triagem de muitos compostos por dia.

Deve-se ressaltar que, nos ensaios com o EPV não se objetivou ter a certeza de um inibidor específico de catepsina D, pois, por mais que o substrato utilizado fosse específico para CatD e E, e nos ensaios foram utilizados inibidores de outras classes de proteases, como as cisteíno, não há como garantir a clivagem total apenas por essas enzimas. Porém, os ensaios com EPV se mostraram confiáveis na busca de inibidores que pudessem inviabilizar a sobrevivência do parasita.

Neste estudo foi possível identificar o composto (*Z*)-2-(pentadec-5-enil)benzeno-1,4-diol (**29**) como uma nova classe de estruturas de baixa massa molecular promissora nos ensaios da inibição da CatD. Além disso, ainda se verifica a necessidade de investigação do extrato bruto (LMFE) no qual este composto foi isolado, pois outros compostos com estruturas semelhantes podem possuir melhores inibições frente à CatD.

A triagem bioquímica inicial dos extratos vegetais brutos e dos compostos isolados e sintéticos, demonstrado nesta parte, tinha como objetivo não somente a identificação de compostos inibidores, mas também complementar o estudo das técnicas desenvolvidas e aplicadas na triagem.

A metodologia que utiliza o CatD-IMER mostrou ter vantagens e desvantagens na configuração utilizada. Como vantagem pode-se citar a eficiência nos ensaios de compostos que fluorescem nos mesmos comprimentos de onda, pois estes podem ser separados do produto da clivagem na segunda dimensão. Porém, a

desvantagem está na possível coeluição que pode existir entre os analitos, e estes não poderão ser separados com a fase móvel validada para a segunda dimensão, problema que pode ser resolvido adotando-se outro tipo de detector, como a espectrometria de massas.

O método mostrou-se ser robusto e reproduzível principalmente por ser automatizado, fato que muitas vezes proporciona erros nos ensaios em solução. Além disso, a enzima imobilizada não está sujeita à autoproteólise, problema comum nos ensaios em solução com proteases, e pôde ser reutilizada por mais de 30 dias. O reconhecimento de compostos com características irreversíveis ou com fortes interações também foi observado nos primeiros ensaios com o CatD-IMER, como o caso dos taninos e da pepstatina A, respectivamente. Infelizmente esses ensaios ocasionam a inativação parcial ou integral do biorreator, porém fornecem informações úteis das quais os ensaios em solução não fornecem. A vantagem dos ensaios em solução está no tempo de realização dos ensaios, que no geral é menor, porém isso pode ser otimizado utilizando-se colunas menores e sistemas do tipo UHPLC.

Dessa forma, os resultados demonstram que os métodos utilizados apresentam-se como ferramentas analíticas extremamente úteis na avaliação de inibidores.

PARTE II

Estudo da hidrólise da hemoglobina humana pela Catepsina D por meio da técnica de Microbalança em Cristal de Quartzo (QCM)

Nesta parte do trabalho são descritos os procedimentos de formação de monocamadas auto-organizadas funcionalizadas com Hb humana. A reação enzimática é monitorada pela QCM por meio da variação de frequência, proporcional à variação de massa, proporcionada pela hidrólise do substrato Hb imobilizado quando a CatD é adicionada. Parâmetros cinéticos, como o K_d e k_{cat} , relacionados respectivamente à formação do complexo enzima-substrato e à formação do produto, são calculados pelo ajuste de curvas obtidas e observados em tempo-real. São demonstradas aplicações da técnica de QCM em triagem de compostos inibidores utilizando extratos de plantas, compostos isolados de produtos naturais e o inibidor comercial pepstatina A.

Esta parte do trabalho foi desenvolvida em parceria com o Prof. Dr. Ronaldo C. Faria e a Dra. Mariele M. Pedroso do Laboratório de Bioanalítica e Eletroanalítica do Departamento de Química da UFSCar e foi integralmente publicada na revista *Analytica Chimica Acta*, sob o título: ***"New Approach for Natural Products Screening by Real-time Monitoring of Hemoglobin Hydrolysis using Quartz Crystal Microbalance"***.

PARTE II

Introdução

Parte II. Estudo da hidrólise da hemoglobina humana pela Catepsina D por meio da técnica de Microbalança em Cristal de Quartzo

7 INTRODUÇÃO

Tem-se verificado nas últimas décadas um grande desenvolvimento analítico, principalmente relacionado ao uso de sistemas como sensores químicos, biossensores, dispositivos bioanalíticos e eletrodos quimicamente modificados. Quando se entra na área de sensores químicos e biossensores constata-se esse grande avanço devido à possibilidade de aplicação destes sistemas para avaliação de processos sintéticos ou biológicos (DAMOS et al., 2004, ROGERS, 2000).

O principal papel de um sensor é explorar as interações entre um analito alvo e um elemento de reconhecimento biológico. Segundo a IUPAC, os biossensores são um subgrupo de sensores químicos que são capazes de proporcionar informações analítica quantitativa ou semi-quantitativa, usando um elemento de reconhecimento biológico (como enzimas, anticorpos, proteínas ou microorganismos) em contato com transdutores (como os eletroquímicos, ópticos, térmicos, etc) (THÉVENOT et al., 2001). Esta interação irá produzir um sinal mensurável (fluorescente, elétrico, etc.), que pode ser utilizado para se obter informações sobre a presença e a concentração do alvo (ROGERS, 2000).

No caso das reações enzimáticas, o interesse na construção de biossensores está no estudo das interações enzima-substrato e na obtenção das constantes cinéticas envolvidas, que muitas vezes são resultado de aproximações e estimativas quando os ensaios são realizados em solução. Além disso, oferece uma excelente alternativa para contornar problemas relacionados à interferência nos ensaios que utilizam técnicas dependentes de fluorescência ou absorvância dos seus produtos reacionais, pois não dependem de características estruturais das moléculas, como pode ser confirmado pela técnica de Microbalança de Cristal de Quartzo.

7.1 Microbalança de Cristal de Quartzo

A microbalança de cristal de quartzo (QCM) é uma dessas técnicas que fornece um sinal utilizado para a compreensão do que ocorre em um sistema

biológico em tempo real (BUNDE et al., 1998). Seu uso se baseia nas propriedades piezoelétricas de alguns materiais, como o quartzo. O termo piezoeletricidade, reportado pela primeira vez em 1880, descreve a geração de cargas elétricas na superfície de um sólido causada por pressão, e, como consequência, uma deformação mecânica ocorre devido à aplicação de um campo elétrico (JANSHOFF et al., 2000).

A propriedade de ressonância piezoelétrica desses materiais é utilizada na QCM para monitorar a mudança na frequência fundamental de oscilação do cristal com o aumento de massa em sua superfície. Ganhou maior atenção como técnica analítica quando SAUERBREY (1959) estabeleceu a relação na qual a variação de frequência medida (Δf) em um cristal de quartzo piezoelétrico (f_0) é diretamente proporcional à variação de massa (Δm) sobre sua superfície. Sua equação (7.1), portanto, é empregada para estimar a massa de filme depositado.

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \frac{\Delta m}{A}$$

No qual Δf representa a variação da frequência, f_0 é frequência fundamental do cristal de quartzo, Δm é a variação de massa sobre o eletrodo, ρ_q é densidade do cristal de quartzo, μ_q representa o modo de cisalhamento do quartzo e A é área ativa do cristal (SAUERBREY, 1959). Essa equação pode ser simplificada como:

$$\Delta f = -C_f \Delta m \quad (7.1)$$

Sendo C_f o fator de sensibilidade linear, que, para o cristal de quartzo com corte AT de 5 MHz adota-se o valor de $56,6 \text{ Hz } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^2$.

O material mais comumente utilizado na QCM é o quartzo, na forma de discos finos com corte AT (geometria mais adequada pela estabilidade oferecida), com filmes metálicos depositados, como o ouro, em ambos os lados do cristal, como mostra a FIGURA 7.1. A sensibilidade de massa de um cristal de quartzo de 5 MHz é aproximadamente $0,057 \text{ Hz cm}^2 \text{ ng}^{-1}$, 100 vezes maior do que uma balança com sensibilidade de $0,1 \mu\text{g}$ (JANSHOFF et al., 2000). É possível, portanto, medir

variações extremamente sensíveis de massa em tempo real, na ordem de nanogramas, possuindo, portanto, aplicações nos mais diversos tipos de sistemas.

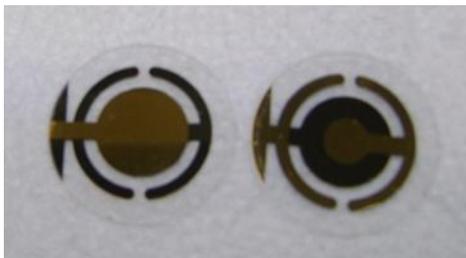


FIGURA 7.1 - Representação de um cristal de quartzo revestido com ouro nas faces superior e posterior.

Este cristal, por sua vez, é acoplado a um circuito oscilador responsável pela aplicação do campo elétrico alternado nas faces opostas do cristal, cujo propósito é provocar uma oscilação devido ao deslocamento dos átomos do cristal paralelo à sua superfície. Diretamente ligado ao circuito oscilador há um contador de frequência (frequencímetro) responsável pelo monitoramento das variações na frequência de oscilação do cristal e um computador para obtenção e tratamento dos dados, conforme apresentado na FIGURA 7.2 (DAMOS et al., 2004).

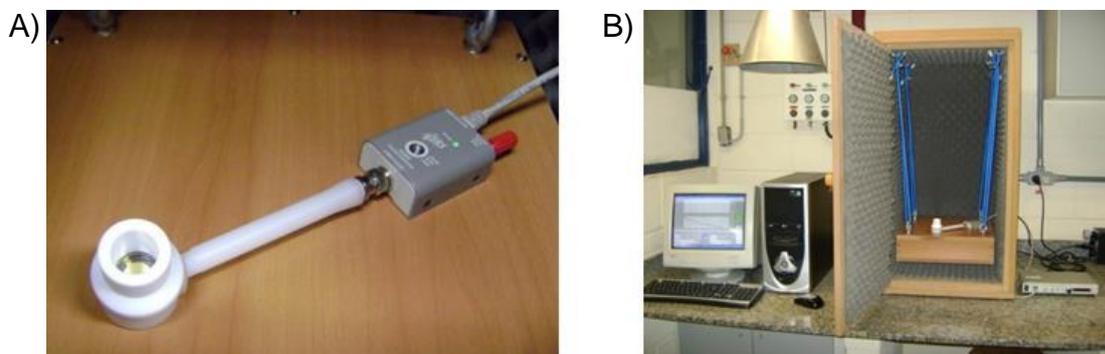


FIGURA 7.2 - Representação de um circuito oscilador (A) ligado a um contador de frequência (frequencímetro) e um computador (B) para obtenção e tratamento dos dados.

Desta forma, se um material é depositado sobre a superfície do cristal, cuja massa é pequena quando comparada à massa do cristal de quartzo (até 2% da massa do cristal), ocorre uma redução no movimento de oscilação, resultando no decréscimo da frequência de ressonância do cristal proporcional à massa do material depositado (DAMOS et al., 2004). Conseqüentemente, mediante um

monitoramento contínuo da frequência do cristal é possível investigar os fenômenos interfaciais e superficiais relacionados a sistemas biológicos.

No cristal de quartzo é possível imobilizar, por meio de diversas técnicas, moléculas nas quais se deseja avaliar a atividade biológica, como por exemplo, as enzimas e seus ligantes. O processo de imobilização envolve a formação de monocamadas auto-organizadas, as quais consistem na adsorção ou na ligação covalente de alguns grupos funcionais específicos que interagem, em uma extremidade com a superfície do metal depositado sobre a superfície do cristal de quartzo, e a outra extremidade com a biomolécula que se deseja imobilizar (GOODING et al., 2003, LOVE et al., 2005). Porém, para que haja sucesso, é necessário que os biocomponentes, quando imobilizados, mantenham sua atividade biológica, para que o biossensor possa capturar, com sensibilidade significativa, sua interação com o composto alvo (BAIN et al., 1989).

A formação da monocamada pode ser realizada quimicamente por meio da ligação de grupos funcionais do material biológico (proteínas, enzimas, anticorpos), com os grupamentos ativos do suporte, tais como $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-SH$ (LOJOU & BIANCO, 2006). Esses grupamentos ativos, na maioria das vezes, são compostos de enxofre (geralmente alcanotióis) adsorvidos em superfícies planares metálicas, como a prata, platina e cobre, sendo o ouro mais utilizado por não apresentar um óxido mais estável em condições ambiente. A grande utilização desses compostos é devido à facilidade de preparação, espontaneidade de adsorção e estabilidade da monocamada formada (YANG et al., 1995). A FIGURA 7.3 representa de forma ilustrativa a estrutura da monocamada formada.

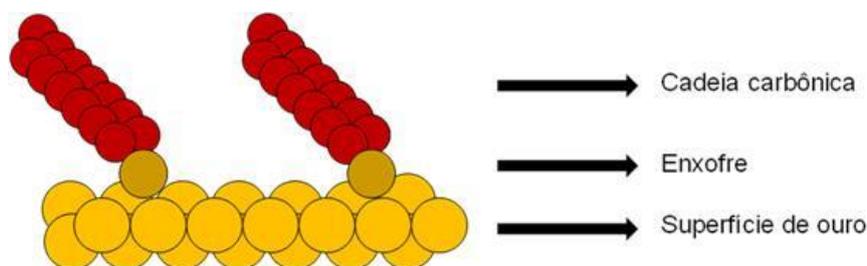


FIGURA 7.3 - Representação da estrutura de uma monocamada formada.

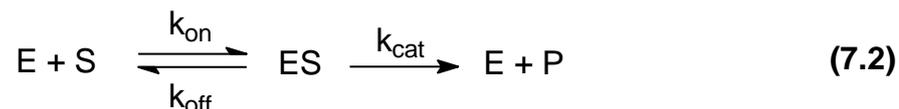
Podem-se destacar algumas vantagens do uso de monocamadas auto-organizadas para a fabricação de biossensores (ALLARA, 1995):

1. As monocamadas são fáceis de serem formadas, são estáveis e formam estruturas ordenadas;
2. Formam filmes finos (com espessura na ordem de nanômetros), minimizando os efeitos viscoelásticos observados quando se utilizam métodos de imobilização com filmes espessos;
3. Podem formar membranas que lembram ambientes celulares, tornando-se adequadas para a imobilização de biomoléculas;
4. A versatilidade na variação do grupo terminal, por meio de grupos funcionais diferentes, permite que se obtenham superfícies com características hidrofóbicas ou hidrofílicas e ainda permitindo reações de imobilização;
5. É necessária uma quantidade mínima de biomolécula para a imobilização na monocamada, diminuindo custos com reagentes;
6. As monocamadas apresentam razoável estabilidade por um período longo de tempo, permitindo que sejam utilizadas para a realização de um grande número de medidas.

7.2 Utilização da QCM na obtenção de parâmetros cinéticos de biossensores enzimáticos

Nos últimos anos, a QCM tem sido utilizada para determinar parâmetros cinéticos de inúmeras biomoléculas (AFONSO et al., 2013, LAZERGES et al., 2012, NISHINO et al., 2004, PESQUERO et al., 2010) incluindo-se as endo e exo-peptidases (FURUSAWA et al., 2008, HUENERBEIN et al., 2007, STOYTCHIEVA et al., 2013), β -amilase (MORI et al., 2012), glucosiltransferase (NIHIRA et al., 2011), com a intenção de se desenvolver protocolos e métodos para se medir e entender a atividade de enzimas (BILITEWSKI, 2006).

Conforme citado anteriormente, as reações enzimáticas realizadas em solução são estudadas por meio da cinética de Michaelis-Menten (Eq. 7.2), na qual se aplica a aproximação do estado-estacionário, onde a concentração do complexo enzima-substrato (ES) é estimada a ser constante durante a reação, pela dificuldade em se detectar essa espécie.



Por meio da reação enzimática obtém-se a velocidade inicial (v_0), e assim os valores de k_{cat} e K_M podem ser deduzidos, conforme foi detalhadamente explicado na introdução da Parte I deste trabalho. K_M é uma constante composta de k_1 (k_{on}), k_2 (k_{off}) e k_3 (k_{cat}). Porém, essas últimas constantes não são obtidas separadamente em ensaios em solução, limitando assim, a discussão sobre as etapas da reação enzimática, como a formação do complexo ES e do produto.

As enzimas interagem de forma específica e particular com seus substratos. Há casos em que substratos interagem mais devagar com enzimas e em outros, a formação do complexo ES leva muito pouco tempo. A constante de dissociação $K_d = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$, um parâmetro não obtido em tempo-real nas reações em solução, mas sim como aproximações matemáticas, fornece informações sobre o processo de interação enzima-substrato.

Desenvolvendo-se biossensores com enzimas ou substratos estrategicamente imobilizados e realizando-se estudos de atividade por QCM, parâmetros cinéticos (K_d e k_{cat}) podem ser monitorados em tempo-real por meio da variação de massa (frequência) no cristal de quartzo em função do tempo. Portanto, se a formação e decomposição do complexo ES podem ser monitoradas durante a reação, as constantes cinéticas obtidas serão mais precisas. Além disso, como a detecção da atividade inibitória da enzima não se baseia em características estruturais das moléculas envolvidas, inibidores enzimáticos podem ser avaliados por meio do monitoramento da reação enzimática em tempo-real sem interferências (VEDVIK et al., 2004). Sendo assim, a QCM pode ser uma técnica útil em processos de triagens de inibidores, pois utiliza o conceito “*label-free*”, ou seja, com substratos não-marcados, como princípio de funcionamento (BILITEWSKI, 2006).

PARTE II

Objetivos

8 OBJETIVOS

Os objetivos desta parte do trabalho foram:

- ❖ Estudar e desenvolver um método “*label-free*”, ou seja, sem a dependência de substratos marcados, para o monitoramento da hidrólise da hemoglobina humana pela catepsina D por QCM;
- ❖ Obter os parâmetros cinéticos de hidrólise (K_d e k_{cat}) da Hb imobilizada em cristal de quartzo por meio do monitoramento de tempo-real da clivagem pela CatD por QCM;
- ❖ Utilizar a metodologia desenvolvida utilizando a Hb e a CatD para realização de triagem de compostos inibidores de diferentes estruturas.

PARTÉ II

Procedimento Experimental

9 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

9.1 Materiais e Métodos

Reagentes:

- ❖ Hemoglobina humana da SIGMA-ALDRICH;
- ❖ Inibidor Pepstatina A da SIGMA-ALDRICH;
- ❖ Reagentes utilizados no preparo de tampões da SIGMA-ALDRICH;
- ❖ Reagentes: ácido mercaptoundecanóico (MUA), 2-mercaptoetanol (MHO), *N*-etil *N*-dimetilpropil carbodiimida (EDC), Etanolamina e *N*-hidroxisuccinimida (NHS) da SIGMA-ALDRICH.

9.2 Instrumentação

Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM):

- ❖ Stanford modelo QCM 200 utilizando-se cristais de corte AT com frequência fundamental de 5 MHz de 16 mm de diâmetro contendo eletrodos de ouro concêntricos.

Balança Analítica:

- ❖ Shimadzu AUW-D UniBloc.

Centrífuga:

- ❖ Eppendorf modelo 5415D.

pH-metro:

- ❖ Qualxtron 8010.

Espectrofotômetro UV-Vis:

- ❖ Varian UV-Vis Spectrometer Cary 50.

9.3 Tampões utilizados na QCM

- ❖ Tampão MES utilizado no procedimento para formação da monocamada → ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado e NaOH, 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5;
- ❖ Tampão utilizado no procedimento de imobilização → fosfato-salino (PBS), 0,01 mol L⁻¹, pH 7,2.
- ❖ Tampão C de ensaio = ácido fórmico e formiato de sódio, 0,05 mol L⁻¹, pH 3,8.

9.4 Imobilização do substrato hemoglobina humana em cristal de quartzo

Neste estudo, a Hb humana foi utilizada como o substrato responsável pela avaliação da atividade da enzima catepsina D utilizando a técnica de QCM como método de detecção. A reação enzimática, neste caso, foi monitorada por meio da hidrólise da Hb imobilizada pela catepsina D, a qual produziu uma variação de massa na superfície do cristal, medida pela variação de frequência.

9.4.1 O sistema de QCM e cristais piezelétricos

Os cristais de quartzo utilizados nesse trabalho possuem 16 mm de diâmetro e cerca de 14 mm de espessura, contendo um filme fino de ouro concêntrico em ambos os lados, corte AT e frequência fundamental de 5 MHz. Os cristais foram conectados à célula de medida confeccionada em politetrafluoretileno (PTFE), conforme mostra a FIGURA 9.1, no qual somente um dos lados do cristal permanece em contato com a solução.



FIGURA 9.1 - Célula de medida do cristal de quartzo.

Este, por sua vez, foi acoplado a um circuito oscilador responsável pela aplicação do campo elétrico alternado ao cristal, cujo propósito é provocar uma oscilação no centro do cristal de quartzo. Diretamente ligado ao circuito oscilador há um contador de frequência (frequencímetro controlador) responsável pelo monitoramento das variações na frequência de oscilação do cristal e um computador para obtenção e tratamento dos dados. Todos esses componentes fazem parte da Microbalança de Cristal de Quartzo Stanford, modelo QCM 200, utilizada neste trabalho.

9.4.2 Limpeza do cristal

Para a limpeza dos cristais de quartzo utilizou-se solução “piranha” (BAIN et al., 1989) que consiste na mistura de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio na proporção de 3:1. A solução “piranha” utilizada era recém-preparada e os cristais foram, então, lavados com essa solução por 1 min e posteriormente com água ultra-pura em abundância e secos com $N_{2(g)}$.

9.4.3 Formação da monocamada auto-organizada e imobilização da Hb humana

Após limpeza do cristal com solução piranha, a imobilização do substrato foi realizada utilizando-se as monocamadas auto-organizadas na superfície de ouro do cristal de quartzo (LOVE et al., 2005, WINK et al., 1997). Os cristais foram colocados em um béquer contendo 1 mL de uma mistura de dois tióis, $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} de ácido mercaptoundecanóico (MUA) e $1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} de 2-mercaptoetanol (MHO) preparados em etanol absoluto como solvente. O objetivo de se usar essa proporção é que o filme formado tenha a mesma estequiometria da solução, ou seja, 1:100 de ácido 11-mercaptoundecanóico e 2-mercaptoetanol, respectivamente (GOODING et al., 2003). A utilização de tióis com cadeias diferentes define o número de sítios de ligação para a proteína, que se liga apenas ao ácido 11-mercaptoundecanóico, resultando em diminuição do impedimento estérico.

O cristal foi mantido em solução no béquer por aproximadamente 4 horas em temperatura ambiente e após esse período foi lavado com 5 mL de etanol absoluto e água ultra-pura em abundância.

Preparou-se uma solução de *N*-etil *N*-dimetilpropil carbodiimida (EDC – 20 mmol L⁻¹) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS – 50 mmol L⁻¹) em tampão MES. Os cristais foram mantidos na solução de EDC/NHS por 1,5 horas e posteriormente foram lavados com água e seco com N_{2(g)} (TLILI et al., 2004).

Para imobilização da Hb no cristal de quartzo preparou-se uma solução 1,5 mg mL⁻¹ de hemoglobina humana em tampão PBS. O cristal foi colocado em contato com essa solução em geladeira a aproximadamente 5°C por aproximadamente 20 horas. O processo de imobilização foi também realizado a temperatura fixa de 24°C e monitoradas por QCM. O cristal foi retirado da geladeira, lavado com tampão PBS, posteriormente com água ultra-pura e seco com N_{2(g)}. Após a etapa de imobilização do substrato, os resíduos de ácidos carboxílicos remanescentes do tiol (MUA) foram bloqueados com uma solução 100 mmol L⁻¹ de etanolamina (pH 8,0) por 30 minutos. Após esse período lavou-se o cristal com água ultra-pura e estes foram secos com N_{2(g)}.

9.4.4 Realização de ensaios enzimáticos na QCM

O cristal foi, então, colocado na célula aberta da QCM com uma face em contato com a solução e outra em contato com o ar.

Foram realizadas medidas na QCM com a enzima ativa (controle negativo), inibida com pepstatina A (controle positivo), brancos e triagem de extratos e um composto puro. Porém, primeiramente determinou-se o limite de detecção do equipamento pela construção de uma curva de resposta de variação de frequência (variação de massa = Hb hidrolisada) em função da concentração de enzima adicionada.

9.4.4.1 Construção da curva na QCM

Diferentes concentrações de solução de catepsina D bovina foram adicionadas à célula contendo a Hb imobilizada. As diferentes respostas no aumento de variação de frequência, que indicam a clivagem da Hb pela CatD (variação de massa negativa), resultaram na construção da curva para determinação do limite de detecção do equipamento.

Em todos os ensaios, inicialmente equilibrou-se o cristal de quartzo funcionalizado com Hb com 924 µL do tampão C, 45 µL de DMSO e 6 µL de solução

de BSA (2% m/v H₂O) na célula de medida a uma temperatura de 24°C. Após estabilização gotas de 20 µL contendo diferentes concentrações da solução de CatD (0,76x10⁻⁸, 2,17x10⁻⁸, 4,57x10⁻⁸, 7,61x10⁻⁸, 10,7x10⁻⁸ mol L⁻¹ em H₂O) foram adicionadas ao cristal contendo a Hb imobilizada. Respeitou-se a concentração fixa final de DMSO na solução, conforme apresentado na TABELA 9.1.

TABELA 9.1 - Condições utilizadas para realização de experimentos em QCM utilizando a CatD e a Hb imobilizada em cristal de quartzo.

Ensaio	Solução de CatD ^a (µL)	Tampão C ^b (µL)	H ₂ O (µL)	Solução de pepstatina A ^c (µL)	Amostra a ser testada ^d (µL)	DMSO (µL)
Branco	0	8,0	7,0	0	0	5
Controle Negativo	1,5	8,0	5,5	0	0	5
Controle Positivo	1,5	8,0	5,5	5	0	0
Triagem	1,5	8,0	5,5	0	5	0

^a Concentração da solução de estoque CatD = 0,7 mg mL⁻¹ em H₂O.

^b Tampão = 0,05 mol L⁻¹ formiato de sódio, pH 3,8.

^c Concentração da solução estoque de pepstatina A = 1 mmol L⁻¹.

^d Concentração final da solução da amostra testada como inibidor = A2CH (125 mmol L⁻¹), A2CD (125 mmol L⁻¹) e evolitrina (546 mmol L⁻¹).

9.4.4.2 Ensaios de inibição na QCM

As reações enzimáticas, sejam com a enzima ativa ou inibida, foram realizadas adicionando-se uma gota de 20 µL de solução enzimática, contendo volumes e concentrações destacados na TABELA 9.1, ao cristal de quartzo contendo a Hb imobilizada alocado na QCM. A pré-estabilização do cristal funcionalizado com a Hb foi feita com 924 µL do tampão C, 45 µL de DMSO e 6 µL de solução de BSA (2% m/v H₂O) na célula de medida a uma temperatura de 24°C.

Como controle positivo utilizou-se a CatD inibida com pepstatina A, um inibidor de aspartil proteases comercial. Os ensaios com extratos de plantas e o composto isolado foram realizados utilizando-se os extratos hexânico e diclorometano de *Almeidea sp* (A2CH e A2CD, respectivamente) e o alcaloide evolitrina isolado do extrato A2CD. Antes da sua adição ao meio reacional contendo

a Hb imobilizada, a solução de CatD foi incubada durante 10 min com a amostra a ser testada (extrato ou composto em DMSO), de acordo com as concentrações e os volumes apresentadas na TABELA 9.1. O volume de injeção foi de 20 μL para todos os ensaios enzimáticos, os quais foram monitorados por 5 horas.

9.4.4.3 Cálculo dos parâmetros cinéticos (K_d e k_{cat}) utilizando a QCM

É possível, por meio desta técnica, estabelecer uma relação entre a variação na frequência de oscilação do cristal e a quantidade de massa depositada na superfície do mesmo, de acordo com a equação de Sauerbrey. Utilizando a Eq. 7.1 pôde-se estimar a massa de Hb depositada no cristal, considerando o fator de sensibilidade linear C_f , dado como $56,6 \text{ Hz } \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^2$ para um cristal de quartzo de 5 MHz com corte AT utilizado na QCM, à temperatura ambiente.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos, K_d e k_{cat} , foram utilizados os resultados de variação de frequência obtidos com a adição de diferentes concentrações da solução de CatD para a construção da curva de análise do limite de detecção do equipamento. Como resultado, a taxa de hidrólise da Hb foi determinada pelas curvas registradas: mudança de frequência em função do tempo, que varia como função da atividade da enzima.

Os resultados com as curvas obtidas na QCM e os devidos ajustes matemáticos tornaram possível a obtenção da constante de dissociação, K_d , que está diretamente relacionada à formação do complexo enzima-substrato (ES), e a taxa de catálise da hidrólise, k_{cat} , relacionada à formação do produto. Estes parâmetros cinéticos foram obtidos por métodos de ajuste de curvas com o auxílio do software Origin 8.0.

9.4.5 Hidrólise da Hb pela CatD em solução monitorada por SDS-Tricina-PAGE

A hidrólise da Hb pela CatD em solução foi também monitorada por gel de eletroforese em diferentes períodos reacionais (KOEHLER et al., 2007).

Iniciou-se preparando uma solução a partir de 7 μL de solução da CatD ($0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ em água ultra-pura), 75 μL de Hb humana (2 mg mL^{-1} em tampão C), e o volume final foi de 100 μL completados com o tampão C. Ao mesmo tempo também foram preparadas soluções chamadas de branco Hb, contendo somente Hb humana (concentração final de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão C), e outro branco, com a CatD (concentração final $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$), contendo somente esta enzima. Os volumes foram ajustados para a concentração correta com a adição de tampão C.

Após 1, 2, 3 e 20 horas foram retiradas alíquotas de 20 μL da amostra reacional e dos brancos e a estas alíquotas foram adicionados 10 μL de tampão utilizado para parar a reação (Tris-HCl $0,188 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,8, contendo glicerol 30% (m/v), β -mercaptoetanol 15% (m/v), SDS 6% (m/v) e azul de bromofenol 0,01% (m/v)). Essas amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e o sobrenadante foi aplicado no gel de eletroforese de poliacrilamida na presença de tricina 15% (SDS-Tricina-PAGE) (LAEMMLI, 1970, SCHAGGER, 2006).

9.4.6 Ensaios em solução utilizando espectrofotômetro de UV/Vis

Ensaios em espectrofotômetro de UV/Vis foram realizados a fim de se corroborar a hidrólise da Hb pela CatD e também para acompanhar as reações realizadas em QCM. Esses ensaios foram conduzidos utilizando-se CatD e Hb humana em solução.

Para realização dos ensaios, à solução contendo a enzima CatD ($3 \mu\text{L}$; $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ em H_2O) e 184,5 μL de tampão C, foi adicionado 62,5 μL de solução de Hb humana (6 mg mL^{-1} em H_2O). Depois de incubação por 3 horas em temperatura ambiente, a reação foi interrompida por precipitação adicionando-se 250 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10% em gelo por 10 minutos. Esses períodos de incubação foram escolhidos com base nos experimentos citados na literatura (CAFFREY et al., 2005), e também por análise feita por gel de SDS-Tricina-PAGE. Após centrifugação a 8800 rpm por 5 min, o sobrenadante chamado de TCA-peptídeos solúveis foi quantificado medindo-se a absorbância em espectrofotômetro de UV/Vis a 280 nm. Como controle positivo adicionou-se à solução 1 μL de

pepstatina A (1 mmol L^{-1} em DMSO) incubando-se por 10 minutos antes de se adicionar a solução de Hb humana, mantendo-se o volume final de $250 \text{ }\mu\text{L}$. Todos esses experimentos foram realizados em triplicata.

Uma curva linear utilizando-se diferentes concentrações de Hb (0.6, 0.9, 1.5, 2.1, 2.7, 3.0, 3.5, 4.0 e 4.5 mg mL^{-1}), porém com o mesmo volume final de $250 \text{ }\mu\text{L}$ e a mesma concentração de Hb, foi construída sob as mesmas condições citadas.

Nos ensaios de inibição enzimática, foi adicionado à solução contendo CatD ($3 \text{ }\mu\text{L}$; 0.7 mg mL^{-1}) e $183,25 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão C, $1,25 \text{ }\mu\text{L}$ de solução do composto evolitrina (20 mmol L^{-1} em DMSO). Depois de 15 minutos de incubação a solução de Hb humana foi adicionada, e após 3 horas à temperatura ambiente, a reação foi interrompida e a absorbância foi medida conforme procedimento descrito.

A absorbância dos compostos pepstatina A e evolitrina, e dos tampões e solventes utilizados também foi analisada para se descartar qualquer possível interferência.

PARTÉ II

Resultados e Discussão

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das etapas do desenvolvimento de um biossensor piezelétrico serão apresentados nesta segunda parte do trabalho. Para isso, foram avaliados os processos de imobilização do substrato Hb em cristal de quartzo e hidrólise deste pela enzima catepsina D.

Ensaio em solução utilizando gel de SDS-Tricina-PAGE e espectrofotômetro de UV/Vis como técnicas de detecção da hidrólise também foram realizados a fim de se atestar a reação enzimática entre o substrato Hb e a enzima catepsina D, bem como confirmar se a reação ocorreu na QCM.

10.1 Imobilização do substrato Hb e análise por QCM

O procedimento adotado antes da imobilização da Hb foi a formação da monocamada auto-organizada na superfície do cristal. Estes tipos de biossensores podem ser construídos por diferentes métodos de imobilização na superfície do cristal de quartzo. Os mais eficientes e mais usados são os métodos irreversíveis, como a ligação covalente da proteína na superfície do ouro modificada previamente com grupos tióis.

Neste trabalho foi avaliado o processo de imobilização *in situ* da Hb pela utilização de uma mistura de dois alcanotíols, MUA e MHO, em proporções definidas, conforme descrito previamente (PESQUERO et al., 2010). O intuito da utilização dessa proporção foi de que a estequiometria da solução se reproduzisse na superfície do cristal e, assim, aumentasse a mobilidade entre as enzimas imobilizadas e também houvesse melhor acessibilidade da enzima aos sítios de clivagem da Hb.

A hemoglobina, conforme mencionado, é o substrato natural da catepsina D no corpo humano, portanto, sua utilização é extensa na literatura (CAFFREY et al., 2005). Sua imobilização foi escolhida pela facilidade no processo de ligação com a monocamada e, além disso, a imobilização de substratos ao invés de enzimas torna a realização do experimento mais simples, pois não requer a utilização de uma célula em fluxo.

Analisando-se a hemoglobina sabe-se que, por ser uma proteína com diversos resíduos de aminoácidos com aminas livres, principalmente lisinas, estas

podem reagir covalentemente com o ácido carboxílico do tiol (MUA) imobilizado na superfície do cristal, formando uma amida (LOVE et al., 2005).

Na primeira etapa de análise utilizando a técnica de QCM avaliou-se a imobilização substrato Hb humana na superfície do cristal, e posteriormente monitorou-se sua clivagem pela enzima CatD.

O processo de imobilização de Hb humana em cristal de quartzo foi medido por QCM para confirmar a formação de camadas múltiplas do sistema de ligação covalente. A QCM mostra uma variação em tempo real da frequência de oscilação quando uma solução de Hb foi adicionada em cristal de quartzo (indicada pela seta no GRÁFICO 10.1).

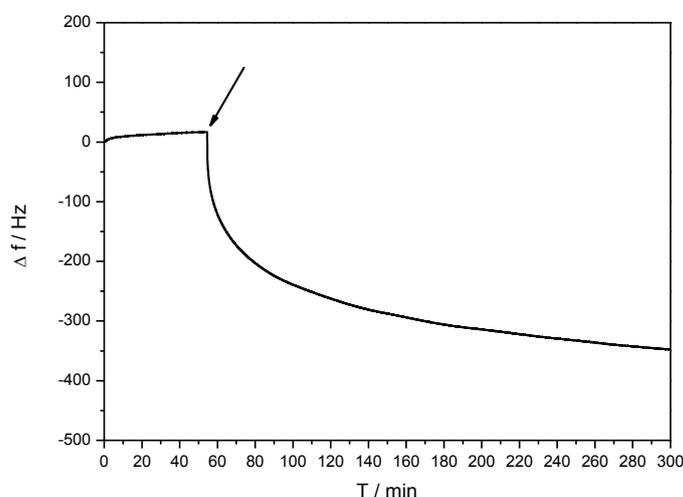


GRÁFICO 10.1 - Curva típica que representa a variação da frequência em função do tempo respondendo à adição de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de Hb humana (tampão PBS, pH 7,2) em monocamada de cristal de quartzo e analisada por QCM.

A diminuição na frequência de oscilação do cristal em $345 \pm 10 \text{ Hz}$ indica um aumento de massa em sua superfície, e foi obtida por meio de experimentos realizados em triplicata considerando as frequências iniciais e finais da medida.

Experimentos com a adição do mesmo volume de tampão PBS foram realizados no lugar da Hb para confirmar que a variação de frequência observada depois da adição de Hb ao cristal de quartzo resultou da interação da monocamada com a Hb. Após a adição do PBS foi verificada uma diminuição na variação de frequência, mas após poucos minutos a variação de frequência atingiu os valores iniciais.

A equação de Sauerbrey (7.1) pode ser utilizada para quantificar as alterações na frequência de um cristal de quartzo, e pode ser associada à massa ou espessura depositada sobre a superfície do quartzo. Desta forma, levando-se em consideração a variação de frequência obtida (345 ± 10 Hz), pôde-se estimar que a quantidade de hemoglobina humana imobilizada foi de $6 \pm 0,2 \mu\text{g cm}^{-2}$, o qual representa $3,75 \times 10^{-11}$ mols de Hb imobilizada. Este valor é uma estimativa, considerando que a equação é aplicável a depósitos de filmes uniformes, rígidos e finos. No entanto, a equação de Sauerbrey tem sido extensamente utilizada em experimentos que envolvem o reconhecimento molecular em sistemas biológicos (AFONSO et al., 2013, BILITEWSKI, 2006, PESQUERO et al., 2010).

10.2 Clivagem da Hb imobilizada pela catepsina D monitorada por QCM

A partir da confirmação da imobilização, a clivagem da Hb pela CatD é monitorada por meio da variação de frequência em tempo real. Após estabilização do cristal de quartzo funcionalizado com a Hb imobilizada contendo tampão C, 20 μL da solução de enzima foi cuidadosamente adicionado. O GRÁFICO 10.2 mostra uma variação em tempo real da frequência de oscilação em função do tempo, em resposta à adição de diferentes concentrações de solução de CatD ($0,76 \times 10^{-8}$, $2,17 \times 10^{-8}$, $4,57 \times 10^{-8}$, $7,61 \times 10^{-8}$, $10,7 \times 10^{-8}$ mol L^{-1}) no cristal de quartzo modificado com a Hb.

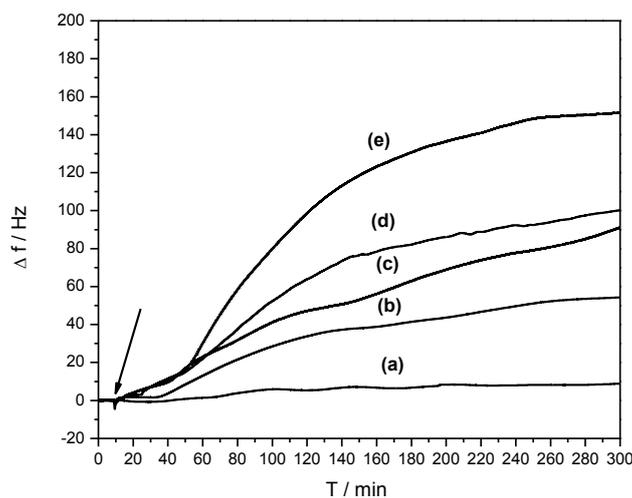


GRÁFICO 10.2 - Gráfico da variação de frequência em resposta à adição de diferentes concentrações de CatD ($0,76 \times 10^{-8}$, $2,17 \times 10^{-8}$, $4,57 \times 10^{-8}$, $7,61 \times 10^{-8}$, $10,7 \times 10^{-8}$ mol L^{-1}). A célula da QCM continha 924 μL de tampão formiato ($0,05$ mol L^{-1} , pH 3,8), 45 μL de DMSO e 6 μL de solução de BSA (2% m/v de H_2O) com a Hb imobilizada, 1,5 mg mL^{-1} .

A hidrólise da Hb pela CatD é detectada diretamente por meio da variação de frequência do cristal, apresentada pela curva característica. Quando o volume da solução de enzima descrito foi adicionado na célula com a Hb imobilizada, uma diminuição de frequência inicial (ou seja, aumento de massa) é verificada. Isso se deve à interação da CatD com o substrato Hb, indicando a formação do complexo ES, que é caracterizada por uma constante de dissociação $K_d = k_{off} / k_{on}$. A formação do complexo ES também é confirmada pela hidrólise do substrato, que só é possível se tal interação ocorrer. Imediatamente, a frequência aumenta gradualmente (isto é, há uma diminuição de massa) devido à hidrólise da Hb e, conseqüentemente, a formação dos produtos de clivagem no meio reacional, quando é possível obter a constante catalítica, k_{cat} . Por fim, a frequência atinge valores constantes. Esse comportamento sugere que CatD tem uma alta capacidade de se ligar ao substrato, porém possui uma taxa de hidrólise lenta, conforme o longo tempo de reação observado.

O aumento das concentrações de CatD produziu também um aumento na variação de frequência, permitindo obter a curva apresentada no GRÁFICO 10.3 e as constantes de hidrólise, K_d e k_{cat} .

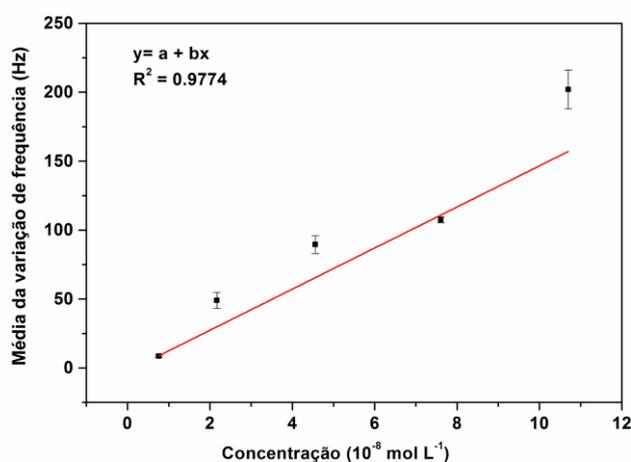


GRÁFICO 10.3 - Curva analítica da variação de frequência em função da concentração de CatD ($0,76 \times 10^{-8}$, $2,17 \times 10^{-8}$, $4,57 \times 10^{-8}$, $7,61 \times 10^{-8}$, $10,7 \times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$) na célula da QCM contendo Hb humana imobilizada.

Os experimentos foram adquiridos por 5 horas, com base nos tempos de reação estabelecidos por SDS-tricina-PAGE. A taxa de hidrólise da Hb foi determinada pelo ajuste da parte linear das curvas registadas: mudança de

frequência em função do tempo, que varia com a atividade da enzima. A reação é analisada por meio do estudo da constante de velocidade de hidrólise aparente (k_{app}). Este parâmetro está presente nos ajustes de curvas de Equações 10.1 – 10.5, considerando $[E] = [E]_0$ e $[S] = [S]_0 - [ES]$.

$$k_{app} = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat} [ES] \quad (10.1)$$

$$[P] = [S]_0 (1 - e^{-\alpha k_{cat} t}) \quad (10.2)$$

$$\alpha = \frac{[E]_0}{[E]_0 + K_d} \quad (10.3)$$

$$k_{app} = \frac{d[P]}{dt} = \alpha k_{cat} = \frac{k_{cat} [E]_0}{[E]_0 + K_d} \quad (10.4)$$

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{1}{k_{cat}} + \frac{K_d}{k_{cat} [E]_0} \quad (10.5)$$

Obtendo-se esse parâmetro, uma correlação linear entre $1/k_{app}$ e diferentes valores de $1/[E]_0$, indicados na Eq. 10.5, torna possível obter a constante de dissociação $K_d = 0,00267 \times 10^{-6}$ M e a taxa de hidrólise catalítica $k_{cat} = 1,228 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Estes parâmetros cinéticos foram obtidos por métodos de ajuste de curvas, e os resultados estão resumidos na TABELA 10.1.

TABELA 10.1 - Parâmetros cinéticos de hidrólise da Hb humana pela CatD obtidos com a QCM.

Substrato	Enzima	$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	$K_d (10^{-6} \text{ M})$	$k_{cat}/K_d (10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$
Hb Humana	CatD bovina	$1,23 \times 10^{-4}$	0,00267	0,04593

A cinética de Michaelis-Menten em uma reação em solução normalmente não revela a constante de dissociação (K_d) pela dificuldade de se obter a concentração do complexo ES e também não é possível detectá-lo em tempo real. No entanto, a formação do complexo ES é observada em tempo real em ensaios utilizando a QCM, e reflete a real constante de dissociação, não sendo uma

estimativa ou uma aproximação. Além disso, a QCM também é uma ferramenta útil para compreender os parâmetros cinéticos, como k_{cat} , em reações enzimáticas.

A obtenção destas constantes é extremamente importante para a compreensão da relação de afinidade enzima-substrato. Um exemplo desse tipo de estudo foi realizado com proteases do tipo endo e exo, nas quais as reações enzimáticas foram caracterizadas usando uma Microbalança de Cristal de Quartzo. Neste caso observou-se que o k_{cat} de $1,1 \text{ s}^{-1}$ para uma exo-carboxipeptidase foi maior do que o k_{cat} de $0,08 \text{ s}^{-1}$ para a subtilisina do tipo endo-peptidase, e o valor de K_d para a subtilisina foi menor do que o K_d para a exo-carboxipeptidase. Estes valores sugeriram que a enzima do tipo endo-peptidase tem maior afinidade pelos sítios de hidrólise específicos dos seus substratos (valor pequeno de K_d) e, em seguida, hidrolisa lentamente o sítio específico (valor pequeno de k_{cat}). Em contraste, a enzima do tipo exo-peptidase não interage tão facilmente com os sítios de ligação do substrato (valor grande de K_d) e hidrolisa mais rapidamente e continuamente o substrato (valor grande de k_{cat}) (FURUSAWA et al., 2008). Para CatD e Hb, os parâmetros cinéticos obtidos ($K_d = 2,67 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ e $k_{cat} = 1,23 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) sugerem uma alta capacidade de se ligar ao substrato, como evidenciado por um pequeno K_d , e uma taxa de hidrólise lenta, como evidenciado pela constante k_{cat} pequena.

10.3 Hidrólise da Hb pela CatD em solução monitorada por SDS-Tricina-PAGE

Antes de iniciar os ensaios utilizando Hb humana imobilizada em cristal de quartzo e analisada por QCM, foi necessário analisar o tempo da reação de hidrólise da Hb pela CatD em solução, ou seja, qual o tempo necessário para se observar o produto da reação enzimática. Para isso, as alíquotas reacionais retiradas com 1, 2, 3 e 20 horas de reação foram devidamente preparadas e adicionadas em um gel de desnaturação de poliacrilamida na presença de tricina (SDS-Tricina-PAGE). O resultado da eletroforese é mostrado na FIGURA 10.1.

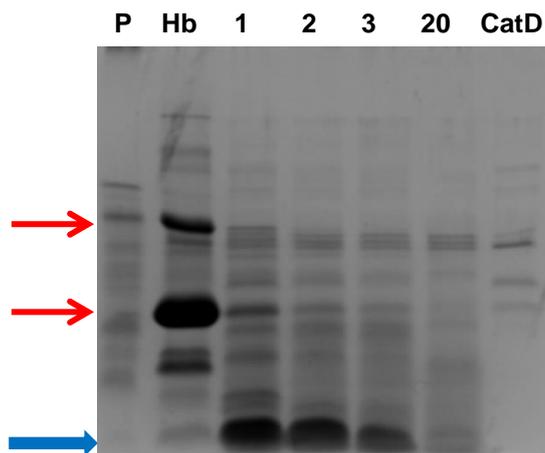


FIGURA 10.1 - Gel de SDS-Tricina-PAGE para análise da hidrólise da Hb pela CatD. “P” representa os padrões do gel de tricina com suas respectivas massas em kDa. Hb representa a hemoglobina humana. Os números 1, 2, 3 e 20 representam uma, duas, três e vinte horas de reação, respectivamente. CatD representa a enzima catepsina D bovina. As setas vermelhas indicam as bandas dos dímeros e monômeros da Hb humana e a seta azul indica as bandas dos peptídeos formados na reação de hidrólise da Hb pela CatD.

A molécula de Hb presente em seres humanos adultos é um tetrâmero que contém quatro subunidades proteicas, estruturalmente semelhantes, e com aproximadamente o mesmo tamanho. Cada subunidade tem uma massa molecular de aproximadamente 16 kDa, de um total de cerca de 64 kDa e 32 kDa para o dímero da Hb. O gel do tipo tricina foi empregado neste estudo, pois a degradação do dímero e tetrâmero da Hb resulta em fragmentos de baixa massa molecular, alvos na detecção deste estudo.

Após 1 hora de reação, fragmentos de peptídeos menores (~ 7 kDa), resultantes da clivagem de dímeros e monômeros de Hb (~ 32 kDa e 16 kDa, respectivamente – setas vermelhas) tornou-se aparente. Aumentando-se o tempo de reação a clivagem das formas de Hb se intensifica e a hidrólise de peptídeos menores (~ 3 kDa – seta azul) são detectados durante a reação, conforme observado no tempo de 20 horas. Este resultado mostra a tendência da enzima em clivar os peptídeos, incluindo os menores, resultando na produção de resíduos de aminoácidos, que são utilizados para a síntese das proteínas necessárias para a sobrevivência do parasita.

Pela análise do gel é possível verificar que a cinética da reação da CatD com a Hb é lenta, mesmo em solução, quando se deseja analisar a clivagem

completa da Hb. Esses resultados justificam o tempo de reação utilizado nos ensaios com a Hb imobilizada em cristal de quartzo e análise por QCM e confirmam o uso da Hb como substrato da CatD.

10.4 Ensaios de inibição da CatD realizadas em QCM

Ensaios enzimáticos tradicionais são geralmente realizados utilizando detecções espectrofotométricas. Porém, interferências resultantes da autofluorescência de compostos a serem testados (propriedades fluorescentes intrínsecas) são observadas rotineiramente em nossos laboratórios. Como a QCM está associada somente à variação de massa, a técnica se mostrou útil para realizar ensaios de inibição com compostos e extratos de plantas nos quais muitas vezes não se conhece o perfil dos metabólitos.

O GRÁFICO 10.4 apresenta seis curvas que representam os ensaios realizados com os extratos brutos A2CH e A2CD; o composto puro isolado a partir de A2CD, evolitrina; o inibidor comercial pepstatina A; branco (contendo H₂O, DMSO e tampão) e o controle negativo (representado pela enzima sem qualquer inibição).

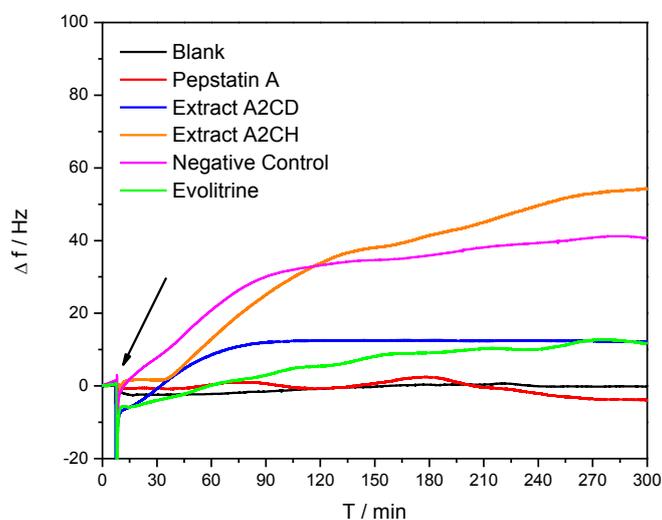


GRÁFICO 10.4 - Gráfico da variação e frequência em resposta à adição de solução de CatD (rosa) e: pepstatina A (vermelho), A2CD (azul), A2CH (laranja) e Evolitrine (verde) (concentrações finais: 5 mmol L⁻¹, 125 mmol L⁻¹, 125 mmol L⁻¹ e 546 mmol L⁻¹, respectivamente). A célula da QCM continha 924 µL de tampão formiato (0,05 mol L⁻¹, pH 3,8), 45 µL de DMSO e 6 µL de solução de BSA (2% m/v de H₂O) e a Hb imobilizada.

Quando se injeta a enzima inibida com a pepstatina A, a variação da frequência é pequena (-3 Hz) comparando-se com o controle negativo (42 Hz),

indicando uma excelente inibição deste composto. O extrato A2CH foi testado para mostrar a seletividade da técnica quando um extrato que não possui inibidores é injetado (54 Hz), indicando não apresentar propriedades inibidoras. No entanto, o extrato A2CD apresentou 12 Hz como variação da frequência, o que sugere interação entre um ou mais compostos, presentes no extrato bruto, e a enzima. O fracionamento deste último extrato levou ao isolamento do alcaloide evolitrina, que apresentou $\Delta f = 12$ Hz, quando testada. Estes resultados indicam que a QCM também pode ser utilizada de forma eficiente para investigar a capacidade de inibição de produtos naturais contra proteases aspárticas como catepsina D.

10.5 Ensaios enzimáticos monitorados por espectrofotômetro de UV/Vis

Adicionalmente aos ensaios realizados com a técnica de QCM, a hidrólise da Hb pela CatD em solução foi monitorada utilizando um detector de UV. A reação utilizando a enzima CatD e diferentes concentrações do substrato Hb (0.6, 0.9, 1.5, 2.1, 2.7, 3.0, 3.5, 4.0 e 4.5 mg mL⁻¹), conforme curva apresentada na GRÁFICO 10.5, confirma a hidrólise, comportamento também observado na QCM; no entanto, não é possível comparar os resultados, uma vez que a disponibilidade do substrato e os métodos de detecção são diferentes. Pode-se confirmar somente, que o aumento da concentração de Hb resultou em aumentos de absorbância, indicando uma maior disponibilidade de Hb para a clivagem.

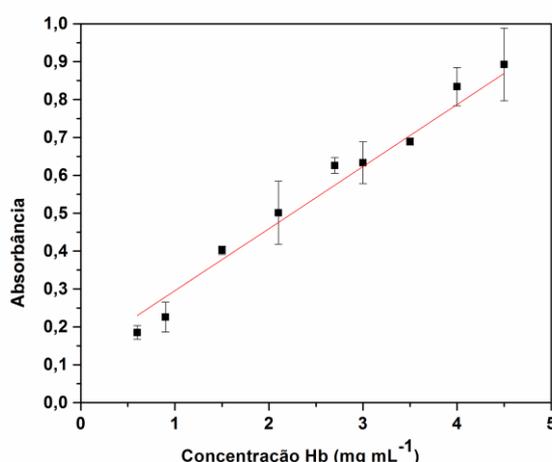


GRÁFICO 10.5 - Curva analítica da absorbância obtida em função da variação da concentração de Hb (0.6, 0.9, 1.5, 2.1, 2.7, 3.0, 3.5, 4.0 e 4.5 mg mL⁻¹) utilizando UV/Vis.

A detecção por UV foi utilizada para confirmar também a reação realizada na QCM. Para isso, após 5 horas de reação na QCM, a solução foi retirada e devidamente preparada para medir a absorbância. Esse resultado, juntamente com as absorbâncias obtidas nos ensaios enzimáticos utilizando os inibidores pepstatina A e o composto evolitrina são apresentados na TABELA 10.2.

TABELA 10.2 - Dados de D.O.²⁸⁰ obtidos com ensaios enzimáticos em solução utilizando CatD e Hb e leitura de solução coletada da QCM com Hb imobilizada.

Ensaio CatD e Hb	D.O. obtida
Enzima inibida com Pepstatina A (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,02
Enzima inibida com Evolitrina (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,11
Enzima não inibida	0,40
Ensaio QCM	0,41

Os valores confirmam a pepstatina A como um inibidor muito potente da CatD e o composto evolitrine com moderada inibição, resultados também observados nos ensaios QCM. A amostra reacional coletada da QCM confirma a clivagem da Hb imobilizada pela enzima CatD.

PARTE II

Conclusões

11 CONCLUSÕES

Este trabalho descreve uma nova abordagem para a triagem de inibidores enzimáticos utilizando produtos naturais, como os extratos de plantas, que são matrizes complexas e possuem uma diversidade muito grande de metabólitos secundários. O uso da QCM para realizar os ensaios com a Hb imobilizada (substrato) e a enzima catepsina D (alvo) elimina interferências causadas por propriedades intrínsecas das moléculas analisadas, que são observadas em ensaios espectrofotométricos, comumente utilizados. A QCM baseia-se em variações de massa em tempo real e não nas características estruturais da molécula.

A metodologia desenvolvida pode ser usada para identificar a hidrólise de Hb por qualquer enzima que a utiliza como substrato, sem necessitar de substratos do tipo marcados, como os fluorogênicos, demonstrando ser muito útil em processos de triagem na descoberta de compostos inibidores de alvos enzimáticos. Além disso, os parâmetros cinéticos do processo de hidrólise foram elucidados, $K_d = 0,00267 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ e $k_{cat} = 1,23 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, possibilitando um melhor entendimento sobre a formação e decomposição do complexo ES e as etapas de hidrólise da reação catalítica, que convencionalmente, não são observados em tempo-real em ensaios em solução. Portanto, a QCM pode se tornar uma nova ferramenta para obtenção de parâmetros cinéticos de reações que envolvem proteases, pois a reação catalítica de hidrólise pode ser diretamente observada por meio de pequenas variações de massa.

PARTE III

Estudos bioquímicos das enzimas catepsina D e B de S. mansoni e realização de ensaios in vitro

Nesta parte do trabalho são descritos os procedimentos envolvidos na clonagem e expressão da catepsina D de *S. mansoni* por meio do emprego de vetores de passagem pGem[®]-T Easy, vetores de expressão pET-45b(+) e a utilização de *E. coli* “ArcticExpress Competent Cells” (DE3). São abordados os processos de trans-ativação da enzima recombinante catepsina B1 de *S. mansoni* por meio da utilização da enzima legumina. São apresentados também resultados de ensaios *in vitro* com vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni* empregando compostos isolados de produtos naturais.

Esses estudos foram realizados durante o período de doutorado sanduíche no Centro de Pesquisas “Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases - CDIPD” da Universidade da Califórnia, campus São Francisco, sob a orientação do Prof. Dr. James McKerrow e Dr. Conor Caffrey.

PARTE III

Introdução

Parte III. Estudos bioquímicos das enzimas catepsina D e B de *S. mansoni* e realização de ensaios *in vitro*

12 INTRODUÇÃO

A catepsina D, conforme mencionado, é uma das enzimas responsáveis pelo processo de hidrólise da hemoglobina digerida por vermes adultos de *S. mansoni* de seus hospedeiros. Devido seu papel essencial na nutrição do parasito e por estar envolvida em outros processos patológicos, a catepsina D representa um bom alvo terapêutico.

O projeto genoma de *S. mansoni* (PGS) iniciou-se em 1992 com o objetivo principal de descobrir e caracterizar novos genes de *S. mansoni* e *S. japonicum* (FRANCO et al., 2000, WILLIAMS et al., 1999). Antes de 1994, existiam apenas 220 sequências em bancos de dados para todas as espécies de esquistossomos (FRANCO et al., 1995). Esta iniciativa foi capaz de aumentar em mais de 50% o número de genes conhecidos de *S. mansoni*, demonstrando o potencial desta estratégia para a descoberta de novos genes (MERRICK et al., 2003).

A primeira clonagem do gene de uma aspartil hemoglobinase de esquistossomos a partir de uma biblioteca de cDNA de *S. japonicum* foi relatada pelo grupo de P.J. Brindley, que mostrou tratar-se de uma enzima similar à catepsina D (SjCD1; BECKER et al., 1995). Originalmente, BECKER et al. (1995) relataram a sequência do cDNA do zimogênio da aspartil proteinase clonada (chamada de Sjasp) com 380 resíduos de aminoácidos. A sequência de aminoácidos, traduzida a partir do cDNA, apresentava 50-55% de identidade com outras catepsinas D previamente descritas, incluindo a humana.

Depois disso, o conhecimento sobre as proteases associadas ao trato digestivo de esquistossomos, foi aprofundado em duas excelentes revisões publicadas em 1997 e 2004, por BRINDLEY e CAFFREY, respectivamente (BRINDLEY et al., 1997, CAFFREY et al., 2004).

Em 1997, outro grupo (WONG et al., 1997) relatou a sequência de uma aspartil proteinase de *S. mansoni* (denominada Smasp por esses autores), e conforme esperado, a sequência de aminoácidos de Smasp apresentou elevada similaridade com a enzima ortóloga Sjasp (84% id. em 379 resíduos) e semelhança

mediana (50-55%) com enzimas ortólogas de vertebrados, como humanos e aves, e invertebrados, como *Aedes aegypti*. Entretanto, uma diferença crucial foi encontrada na sequência de Smasp em relação à enzima de *S. japonicum* e demais catepsinas D conhecidas, uma extensão de 43 resíduos no C-terminal. Assim, foi predita a massa de 41,2 kDa para os 377 resíduos da protease madura.

Aparentemente, todas as aspartil proteases são sintetizadas na forma de seus zimogênios inativos. A conversão na forma ativa envolve a remoção do pro-peptídeo (ou peptídeo de ativação) de cerca de 45 resíduos do N-terminal. Esse mecanismo se dá quando um processo intramolecular de desnaturação local do pro-peptídeo que acarreta na exposição do sítio ativo e clivagem entre os resíduos 16-17 do peptídeo de ativação. A estrutura do pepsinogênio revela que o pro-peptídeo enovela-se independentemente do restante da proteína, cujo domínio catalítico apresenta conformação muito semelhante à enzima madura (JAMES & SIELECKI, 1986).

BRINDLEY et al. (2001) fizeram uma importante contribuição para o estudo da especificidade de substrato das enzimas catepsina D-símile de esquistossomos ao determinar os sítios de clivagem na Hb humana. Para isto, as proteases de *S. mansoni* e *S. japonicum* foram produzidas em sistema de expressão em células de inseto, obtendo-se espécies migrando com ~ 40 kDa em SDS-PAGE, a partir da fração do sobrenadante de cultura ligada à pepstatina-agarose. No processo de expressão em baculovírus foi utilizada a sequência de DNA depositada no Genbank sob código U60995.1 para a proenzima de *S. mansoni*. Com a enzima recombinante ativa foi possível identificar os sítios de clivagem na Hb humana e realizar ensaios de para a identificação de inibidores (BRINDLEY et al., 2001).

Outra catepsina com atividade proteolítica importante na degradação da Hb ingerida pelos vermes de *S. mansoni*, e que também representa um potencial alvo na busca de inibidores, é a catepsina B, a mais abundante cisteíno protease encontrada no intestino do parasito, essencial para sua sobrevivência (CAFFREY & RUPPEL, 1997, JILKOVA et al., 2011, SAJID et al., 2003). Essa enzima é sintetizada como zimogênio inativo e é convertida, *in vitro*, na sua forma madura e ativa, com 31 kDa, pela remoção proteolítica do pro-peptídeo catalisada pela enzima legumaina (SAJID ET AL., 2003).

PARTE III

Objetivos

13 OBJETIVOS

Os objetivos desta parte do trabalho foram:

- ❖ Obter a catepsina D recombinante de *S. mansoni*;
- ❖ Investigar o processo de ativação da catepsina B recombinante de *S. mansoni* para futuras realizações de ensaios de inibição enzimáticos;
- ❖ Realizar ensaios *in vitro* com vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni* para avaliar a atividade de compostos isolados de produtos naturais.

PARTE III

Procedimento Experimental

14 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

14.1 Bioinformática

As buscas em bancos de dados foram realizadas usando programas da família BLAST, implementados no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Os desenhos dos oligonucleotídeos foram realizados com auxílio do programa ApE - A plasmid Editor by M. Wayne Davis. Os alinhamentos de sequências foram realizados com o programa BIOEDIT (TOM HALL, Ibis Pharmaceuticals). Ferramentas de análise proteômica, como tradução de sequência de nucleotídeos e análise de ORFs, foram realizadas em programas ExPASy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org/>).

14.2 SDS-PAGE

Para as análises por SDS-PAGE utilizou-se um sistema de eletroforese em gel vertical Mini-protean II (Bio-Rad Laboratories, California) com géis comerciais NuPAGE® Bis-Tris Mini Gels e tampão recomendado NuPAGE® MES SDS Running Buffer 1X. Aliquotas de amostras de proteínas foram adicionadas a solução tampão de aplicação em condições redutoras (200 mmol L⁻¹ DTT). As corridas foram rotineiramente feitas aplicando-se uma diferença de potencial constante de 120 Volts. As proteínas foram reveladas com solução Coomassie Brilliant Blue G-250.

14.3 Immunoblots

Para a detecção imunológica de amostras separadas eletroforeticamente (*immunoblots*), as proteínas presentes nos géis de poliacrilamida foram inicialmente eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose previamente mergulhadas em tampão de corrida com 10% MeOH. As transferências foram realizadas com auxílio do sistema “Transblot semi-dry transfer cell” (Bio-Rad Laboratories, California) usando voltagem constante de 15 Volts, por 60 min. Em seguida, a etapa de bloqueio foi realizada incubando-se as membranas em solução salina PBS 1X contendo 3% de albumina sérica bovina (BSA) por 30 min sob agitação à temperatura ambiente. A etapa de ligação do anticorpo primário Anti-His-tag foi realizada retirando-se as membranas da lavagem, transferindo-se

diretamente para solução diluída do soro policlonal (1:2000) em uma solução PBS 1X contendo 0,2% Tween 20 e 1% BSA e incubando-se “overnight” sob agitação à 4°C. Após 3 ciclos de 10 min de lavagem com solução de PBS 1X contendo 0,2% de Tween 20, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente, sob agitação, por 2h em solução PBS 1X, contendo 0,2% de Tween 20, 1% de BSA e o anticorpo secundário (1:5000). Após 3 ciclos de 10 min de lavagem com solução de PBS 1X contendo 0,2% de Tween 20 e 1 ciclo de lavagem somente com solução PBS 1X, foi adicionada a solução quimioluminescente preparada com o kit “Novex[®] ECL Chemiluminescent Substrate Reagent” misturando-se partes iguais dos dois reagentes do kit, seguindo-se as instruções do fabricante. Após esse procedimento as membranas foram colocadas em contato com filmes de raio-X para serem reveladas.

14.4 Estimativa do conteúdo protéico

O conteúdo protéico das amostras foi rotineiramente estimado pelos métodos de Bradford (1976), conforme destacado no kit “Protein Assay” (Bio-Rad Laboratories, California), ou acompanhado pela medida da D.O.²⁸⁰, quando se necessitava de respostas rápidas.

14.5 Eletroforese em gel de agarose

Géis de agarose para análise de amostras de DNA foram rotineiramente preparados com 0,4 g de agarose, 40 mL de tampão TAE 1X (40 mmol L⁻¹ Tris base + 0,115% v/v ácido acético glacial + 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0) e 1 µL de “Red Nucleic Acid Stain” para que as bandas pudessem ser visualizadas em transiluminador com radiação U.V. e fotografado. As corridas foram realizadas com voltagem constante (80 Volts).

14.6 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento das amostras era realizado diariamente pela empresa Elim Biopharmaceuticals, Califórnia.

14.7 Clonagem e expressão da SmCD

14.7.1 Desenho dos oligonucleotídeos (primers)

Usando-se a sequência de DNA depositada no Genbank sob código U60995.1 codificando a pre-pro-enzima SmCD1 (BRINDLEY et al., 2001), primers foram desenhados visando a amplificação das formas longa e curta da pro-enzima (proSmCD1) a partir de amostras de RNA. O primer “*forward*”, comum às duas formas, foi desenhado com 22 bases 5’ gcG GTA CCA GTG GTT AGG ATC C 3’. O oligonucleotídeo apresenta um sítio de KpnI (sublinhado) para subsequente clonagem em vetor pet-45b+ e expressão em *E. coli*.

Para clonagem da forma longa (SmCD-longa), desenhou-se o oligonucleotídeo “*reverse*” com 22 bases anelando-se com o mRNA da enzima contendo a sequência C-terminal completa: 5’ gcG AGC TCT CAA ACT TCA TCT G 3’. Este primer contém o sítio de restrição de SacI (sublinhado) para subsequente clonagem em vetor pET-45b(+) e expressão em *E. coli*.

Para clonagem da forma longa (SmCD-longa), utilizou-se o primer “*reverse*” anelando com a região do mRNA codificando o COOH-terminal da enzima, menos os 43 últimos resíduos de aminoácido, conforme informação e sequência apresentada na literatura (WONG et al., 1997): 5’ gcG AGC TCT CAT GGA TGA AGA G 3’. Este primer também contém o sítio de restrição de SacI para subsequente clonagem em vetor pET-45b+ e expressão em *E. coli*.

Os primers foram desenhados respeitando-se a temperatura média de desnaturação (T_m), o tamanho da sequência (quantidade de nucleotídeos) e a percentagem de guaninas e citosinas (% GC) da sequência (dados analisados com auxílio do programa ApE - A plasmid Editor by M. Wayne Davis).

14.7.2 Otimização das condições de PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para obtenção e amplificação do cDNA das formas longa e curta de proSmCD1 a partir do cDNA de vermes adultos e de ambos os sexos de *S. mansoni*. Realizou-se um gradiente de PCR para se identificar a melhor temperatura de anelamento com as seguintes condições de PCR: 1 ciclo 95°C, 2 min (desnaturação do cDNA) / 30 ciclos 95°C, 40 segundos (desnaturação do DNA); 60; 59,1; 57,2; 55; 52,1; 49,7; 48 e 47°C, 40

segundos (anelamento); 71°C, 1 min e 30 s (extensão) / 1 ciclo 72°C, 7min (extensão final) / 1 ciclo 10°C (fim da reação). Dez minutos antes do final da reação adicionou-se a enzima DNA polimerase alta fidelidade.

Para a reação utilizou-se dNTP, tampão Pfu (10X), enzima Pfu Ultra, H₂O, cDNA, Primers Forward e Primers Reverse. No controle negativo utilizaram-se todos os reagentes menos o cDNA e no controle positivo utilizaram-se os primers que amplificam o cDNA da enzima GPDH de *S. mansoni*.

14.7.3 Eletroforese em gel de agarose

Os géis de agarose para análise de amostras de DNA foram preparados aquecendo-se em um Erlenmeyer por 1 min e 30 s os seguintes reagentes: 1% de agarose em tampão TAE 1x (40 mmol L⁻¹ Tris base + 0,115% v/v ácido acético glacial + 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0) e 1 µL de Corante “Red Nucleic Acid Stain”. As corridas foram feitas com voltagem constante (80 Volts). Como se utilizou o corante citado, o gel podia ser instantaneamente visualizado em câmara com radiação UV e fotografado.

14.7.4 Clonagem em vetores de passagem (pGem®-T Easy)

14.7.4.1 Ligação do produto de PCR em vetor pGem®-T Easy

Para dar início ao processo de ligação, a concentração de DNA ligado foi medida com o auxílio de um nano espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer).

Seguindo-se as instruções do kit pGem®-T Easy Vector (Promega) para a reação de ligação, utilizou-se 3 µL do produto de PCR (realizou-se o cálculo sugerido pelo protocolo para otimização da quantidade de produto de PCR utilizado com a proporção de 1:1 (vetor:inserto), 1 µL de plasmídeo pGem®-T Easy (50 ng), 1 µL de enzima T4 DNA ligase (3 Weiss units / µL - Promega) e 5 µL do tampão de ligação 2X concentrado fornecido pelo kit. Incubou-se por uma noite a 4°C para produzir um máximo número de transformações, segundo o protocolo.

14.7.4.2 Transformação e seleção dos clones positivos

Antes de dar início à transformação, placas LB/AMP foram preparadas espalhando-se 100 μL de IPTG (100 mmol L^{-1}) e 20 μL de X-Gal (50 mg mL^{-1}) com auxílio de bico de Bunsen.

O produto da ligação, acondicionado em eppendorf, foi centrifugado e 5 μL desse sobrenadante foi adicionado a 50 μL de células do tipo “*One shot top 10 competent cells*” seguindo-se o protocolo de transformação pGem[®]-T Easy. Brevemente, as células com o produto da ligação foram gentilmente homogeneizadas com a pipeta e deixados no gelo por 15 min. Após esse período, as células foram submetidas a um choque de temperatura em banho de água a 42°C por 40 segundos. Imediatamente colocou-se no gelo e adicionou-se 250 μL de meio SOC. Deixou-se agitando por 1 h 30 min a 37°C (~ 150 rpm). As células então foram adicionadas à placa previamente preparada e deixadas a 37°C “*overnight*”.

Alguns clones positivos, identificados pela coloração branca das colônias crescidas na placa, foram coletados e adicionados em tubos do tipo Falcon (de 50 mL) contendo 10 mL de meio LB + 10 μL de AMP (100 mg mL^{-1}). Foram deixados agitando (~ 235 rpm) a 37°C “*overnight*”.

Após esse período os tubos foram centrifugados a ~ 5000 rpm por 10 min a 25°C. O sobrenadante foi removido completamente e iniciou-se então o protocolo de purificação do DNA plasmidial utilizando o kit “*miniprep da QIAprep Spin*”. Depois de finalizado o procedimento a concentração foi determinada por nano-espectrofotômetro e enviado para sequenciamento.

14.7.5 Clonagem em vetores de expressão pET-45b(+)

14.7.5.1 Digestão do inserto e do plasmídeo e purificação dos fragmentos

De forma concomitante digeriu-se o vetor pET-45b(+) (1 μg em 30 μL) e o vetor pGem[®]-T Easy + proSmCD1 (6 μg em 30 μL) com as duas enzimas de restrição, SacI e KpnI.

Para a digestão do vetor pET-45b(+) utilizaram-se as duas enzimas na mesma reação de digestão. O volume final de 30 μL de reação continha 1 μg de plasmídeo, 3 μL de tampão 10X *NEBuffer* (New England Biolabs), 10 u de cada enzima de restrição (SacI e KpnI) e 0,3 μL de BSA (10 mg mL^{-1}), incubados por 1 h a

37 ° C. A reação foi parada com um choque térmico a 65 ° C por 20 min. Após esse período adicionou-se 1 unidade da enzima CIAP (*Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal* – fosfatase alcalina intestinal – New England Biolabs) para cada 1 pmol de DNA (aproximadamente 1 µg de 3 kb plasmídeo) conforme protocolo, e foi incubado a 37°C por 60 min. Esse procedimento foi adotado para prevenir a recircularização do plasmídeo durante a ligação.

A digestão do vetor pGem[®]-T Easy + proSmCD1 foi realizada em duas etapas, para que se confirmasse a digestão da enzima SmaI antes da digestão com a enzima KpnI. Primeiramente seguiu-se o protocolo para a enzima SmaI utilizando-se 6 µg de plasmídeo, 3 µL de tampão 10X *NEBuffer* (New England Biolabs), 10 u da enzima de restrição SmaI e 0,3 µL de BSA (10 mg mL⁻¹) em um meio reacional de 30 µL, incubados por 1 h a 37°C. A reação foi parada com choque térmico a 65°C por 20 min. O produto da digestão foi então submetido a uma eletroforese em gel de agarose e a banda referente ao vetor pGem[®]-T Easy + proSmCD1 foi recortada e processada com o kit “*QIAquick[®] Gel Extraction*”, para extração do DNA e posterior digestão com a enzima KpnI. Seguindo-se o mesmo protocolo utilizou-se 3,4 µg de vetor + inserto pGem[®]-T Easy + proSmCD1 e a enzima KpnI. Após eletroforese em gel de agarose a banda referente ao inserto (1,4 kb para a forma longa) foi recortada e processada com o kit “*QIAquick[®] Gel Extraction*”, para extração do DNA.

14.7.5.2 Ligação, Transformação em *E. coli* DH5α, seleção dos clones positivos e preparação dos plasmídeos

Para a reação de ligação do fragmento referente ao gene da forma longa em pET-45b(+), usou-se o mesmo protocolo de ligação anteriormente citado. Utilizando-se a proporção de 1:1 (vetor:inserto) incubou-se com a enzima T4 DNA ligase (3 Weiss units / µL - Promega) num volume final de 10 µL completados pelo tampão de ligação 2X concentrado fornecido pelo kit a 4°C “*overnight*”.

O produto da reação de ligação foi usado para transformação em células do tipo “*DH5α competent cells*” (Invitrogen), seguindo-se o protocolo de transformação da mesma.

Placas LB/AMP foram preparadas espalhando-se 100 µL de IPTG (100 mmol L⁻¹) e 20 µL de X-Gal (50 mg mL⁻¹). O produto da ligação foi centrifugado e 5 µL desse sobrenadante foi adicionado à 50 µL de células competentes “*DH5α*”.

As células com o produto da ligação foram gentilmente homogeneizadas com uma pipeta e deixadas no gelo por 30 min. Após esse período, as células foram submetidas a um choque de temperatura em banho de água a 42°C por 20 segundos. Imediatamente colocou-se no gelo por 2 min e adicionou-se 250 µL de meio SOC. Deixou-se agitando por 1 h 30 min a 37°C (~ 225 rpm). As células então foram adicionadas à placa previamente preparada e deixadas a 37°C “*overnight*”.

Alguns clones foram coletados e adicionados em tubos do tipo Falcon (de 50 mL) contendo 10 mL de meio LB + 10 µL de AMP (100 mg mL⁻¹). Foram deixados agitando (~ 235 rpm) a 37°C “*overnight*”.

Após esse período os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 10 min a 25°C. O sobrenadante foi removido completamente e iniciou-se então o protocolo de purificação do DNA plasmidial utilizando o kit miniprep da QIAprep Spin. Depois de finalizado o procedimento a concentração foi determinada por nano-espectrofotômetro e enviado para sequenciamento.

14.7.6 Correção do clone pET-45b(+)/proSmCD1 por Mutagênese sítio-dirigida

Para a correção da mutação da sequência no clone pET-45b(+)/proSmCD1 retirou-se apenas um nucleotídeo no desenho dos primers para que a sequência codificasse os aminoácidos corretos. Os seguintes primers foram desenhados: SmCD-Mut Fw 5' CAC CAT CAC GTG GGT ACC GTG GTT AGG ATC CCT CTT C 3' e SmCD-Mut Rv 5' GAA GAG GGA TCC TAA CCA CGG TAC CCA CGT GAT GGT G 3' (reverso). A estratégia para correção consistiu na utilização do kit “*QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis*”, no qual se usa o inserto+plasmídeo permitindo a mutação em sítios específicos de qualquer plasmídeo de cadeia dupla, não necessitando de vetores especializados, sítios de restrição únicos, ou múltiplas transformações, eliminando assim a necessidade de subclonagem. Seguindo-se o protocolo do kit, a reação de síntese de cadeia mutante permaneceu no termociclador por 5 horas e após esse período foi realizada a digestão com a adição da enzima DpnI (1 µL) diretamente ao meio reacional incubando-se por 2 horas.

A transformação foi realizada utilizando-se 45 µL de células ultracompetentes XL10-Gold[®] e 2 µL da reação de mutação. Utilizou-se meio LB para incubar as células por 1 hora agitando-se a 235 rpm. As células foram então

espalhadas em placas LB/AMP contendo $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de X-Gal e 20 mmol L^{-1} de IPTG e incubadas “overnight” a 37°C .

Alguns clones foram coletados e adicionados em tubos do tipo Falcon (de 50 mL) contendo 10 mL de meio LB + 10 μL de AMP (100 mg mL^{-1}). Foram deixados agitando ($\sim 235 \text{ rpm}$) a 37°C “overnight”.

Após esse período os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 10 min a 25°C . O sobrenadante foi removido completamente e iniciou-se então o protocolo de purificação do DNA plasmidial utilizando o kit miniprep da QIAprep Spin. Quando finalizado o procedimento a concentração foi determinada por nano espectrofotômetro e enviado para sequenciamento para análise da correção efetuada.

14.7.7 Expressão em *E. coli* “ArcticExpress Competent Cells” (DE3)

14.7.7.1 Transformação do clone pET-45b(+)/proSmCD1 corrigido em células competentes ArcticExpress (DE3)

A transformação foi realizada utilizando-se 45 μL de células *ArcticExpress* (DE3) seguindo-se o protocolo descrito no manual “*ArcticExpress (DE3) Competent Cells*”. Às células adicionou-se 1 μL de XL10-Gold β -mercaptoetanol, em correta diluição, providenciado no kit. A mistura foi gentilmente agitada e incubada por 10 min em gelo, agitando-se a cada 2 min. A essa mistura foi adicionado 1 μL do plasmídeo corrigido (37 ng mL^{-1}), mexendo-se gentilmente. A reação foi incubada em gelo por 30 min. Após esse período a reação de transformação foi submetida a um choque de temperatura a 42°C por 20 s e incubada em gelo por 2 min. Essa mistura reacional foi adicionada a 250 μL de meio SOC ambientado, e deixado em agitação ($\sim 235 \text{ rpm}$) a 37°C por 1h 30min. A reação foi então espalhada em duas placas LB/AMP preparadas com de gentamicina ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$), com uma delas contendo 100 μL e a outra 200 μL de meio reacional e deixadas incubando “overnight” a 37°C .

14.7.7.2 Teste de indução do clone pET-45b(+)/proSmCD1 corrigido em células competentes ArcticExpress (DE3)

Para iniciar o teste de indução de expressão seguiu-se o protocolo de instrução “*ArcticExpress (DE3) Competent Cells*” da Agilent Technologies. Alguns clones observados na placa foram colocados em tubos do tipo Falcon (50 mL) contendo 10 mL de meio LB, gentamicina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) deixando-se agitando por uma noite a 37°C .

Após esse período, o inóculo foi preparado adicionando-se 2 mL dessa solução à 100 mL de meio LB. As culturas em Erlenmeyers de 250 mL foram cultivadas em agitadores orbitais (235 rpm) termostatizados (37°C) até que a D.O.⁶⁰⁰ atingisse 0,5 - 0,6 U.A.. Neste momento a mistura foi colocada em um Erlenmeyer adicionando-se IPTG em uma concentração final de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$. No momento da adição foi retirada uma alíquota de 1 mL, chamada de T_0 , e centrifugadas 4°C / 13000 rpm / 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi armazenado a -20°C . A partir disso, alíquotas foram retiradas em diferentes tempos (3h (T_1), 6h (T_2), 12h (T_3) e 24h (T_4)) e processadas como descrito acima.

Finalizado o processo, as células foram retiradas do freezer e ressuspendidas em 300 μL de tampão (20 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,4 + 250 mmol L^{-1} NaCl + 20 mmol L^{-1} de Imidazol). Procedeu-se então a homogeneização e fragmentação do DNA liberado com 2 ciclos de 15 s/15 s de sonicação/descanso em gelo. Dessa mistura coletaram-se 10 μL de cada amostra (5 amostras), denominadas “extrato total”, e o restante foi submetido à centrifugação 4°C / 13000 rpm / 30min. Os sobrenadantes das amostras Induzidas (5 amostras) dos diferentes tempos de indução testados foram transferidos para novo tubo e denominadas “extrato solúvel”. As 10 amostras obtidas, sendo elas 5 de extrato solúvel Induzidas e 5 de extrato total Induzidas foram analisadas por SDS-PAGE e *immunoblot*.

14.8 Trans-ativação da enzima recombinante SmCB1 de *S. mansoni*

A enzima SmCB1 de *S. mansoni* foi expressa de forma recombinante pelo laboratório do “*Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases - CDIPD*” da Universidade da Califórnia, conforme descrito (CAFFREY & RUPPEL, 1997, SAJID et al., 2003). Quando expressa de forma recombinante, essa enzima apresenta-se na forma de zimogênio inativo, impossibilitando seu uso em ensaios de

atividade e inibição. Porém, em estudos realizados pelo grupo analisou-se sua transativação com o uso da enzima legumaína, uma asparaginil peptidase (SAJID et al., 2003).

A enzima SmCB1 e a legumaína encontravam-se liofilizadas e visualmente percebia-se que o pó continha meio de cultura de *Pichia pastoris*, na qual foram expressas. Por esse motivo, aproximadamente 170 mg do liofilizado de SmCB1, solubilizados em 2 mL de tampão 50 mmol L⁻¹ NaOAc, pH 5,5, foram submetidos à cromatografia utilizando-se uma coluna comercial PD-10 Sephadex G-25 pré-equilibrada com o mesmo tampão. Para a enzima legumaína 50 mg do liofilizado foram solubilizados em 2 mL de tampão CPS (50 mmol L⁻¹ ácido cítrico, 10 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 100 mmol L⁻¹ NaCl, pH4,5). Nos dois casos, somente foram coletados os primeiros 5 mL eluídos e o restante foi descartado, pois se tratava dos interferentes do meio de cultura. As soluções foram concentradas em tubos de centrifugação Millipore® com filtros específicos para o tamanho das proteínas de interesse.

Para ativação da enzima SmCB1 pela enzima legumaína foram testados diversos tampões e tempos de incubação. Primeiramente em 50 µL da enzima legumaína concentrada, obtida com a purificação, foram adicionados a 50 µL de tampão CPS (50 mmol L⁻¹ ácido cítrico, 10 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 100 mmol L⁻¹ NaCl, pH 4,5) com DTT (4 mmol L⁻¹) “overnight”.

Após esse período foram adicionados 10 µL dessa solução em 10 µL de solução concentrada e purificada de SmCB1 diluídos em 179 µL de tampão 50 mmol L⁻¹ NaOAc, pH 5,5 com DTT (2 mmol L⁻¹) incubando-se por 4 h.

Para o teste de atividade foi utilizado uma placa de 96 poços composta de amostras em triplicata. Em cada triplicata a atividade das enzimas foi avaliada conforme protocolo:

- ❖ 3 poços contendo 10 µL de legumaína ativa, 188 µL de tampão CPS (pH 4,5, ácido cítrico 50 mmol L⁻¹, Na₂HPO₄ 100 mmol L⁻¹, NaCl 100 mmol L⁻¹) com DTT (4 mmol L⁻¹) e 1 µL do substrato (Z)-Ala-Ala-Asn-7-amido-4-metil-cumarina (Z-AAN-AMC) (20 µmol L⁻¹);
- ❖ 3 poços contendo 10 µL de SmCB1 (não ativa), 188 µL de tampão NaOAc (pH 5,5, 50 mmol L⁻¹) com DTT (2 mmol L⁻¹) e 1 µL do substrato (Z)-Phe-Arg-7-amido-4-metil-cumarina (Z-FR-AMC) (10 µmol L⁻¹);

- ❖ 3 poços contendo 10 μL de legumaina ativa, 188 μL de tampão CPS (pH 4,5, ácido cítrico 50 mmol L^{-1} , Na_2HPO_4 100 mmol L^{-1} , NaCl 100 mmol L^{-1}) com DTT (4 mmol L^{-1}) e 1 μL do substrato da SmCB1, Z-FR-AMC, para confirmar que as enzimas possuem atividade apenas com os seus respectivos substratos específicos;
- ❖ 3 poços contendo 10 μL da SmCB1 ativa, 188 μL de tampão NaOAc (pH 5,5, 50 mmol L^{-1}) com DTT (2 mmol L^{-1}) e 1 μL do substrato da legumaina (Z-AAN-AMC), para confirmar que as enzimas possuem atividade apenas com os seus respectivos substratos específicos;
- ❖ 3 poços contendo 10 μL da solução de SmCB1 ativa, 188 μL de tampão NaOAc (pH 5,5, 50 mmol L^{-1}) com DTT (2 mmol L^{-1}) e 1 μL do substrato Z-FR-AMC (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

A atividade das enzimas foi monitorada por meio da clivagem dos substratos fluorogênicos específicos citados para cisteína (Z-FR-AMC) e asparaginil (Z-AAN-AMC) proteases, usando-se um fluorímetro com comprimentos de onda de excitação e emissão ajustados em 360 e 465 nm, respectivamente, para os dois substratos.

14.9 Ensaios *in vitro* com vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni*

O procedimento adotado para a realização dos ensaios *in vitro*, como a aquisição, preparação e manutenção de esquistossômulos (derivados da cercaria) e vermes adultos de *S. mansoni* com 42 dias de idade foram descritos previamente pelo grupo do “*Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases - CDIPD*” da Universidade da Califórnia (ABDULLA et al., 2009, STEFANIC et al., 2010). Ambos os estágios (esquistossômulos e vermes adultos) fazem parte do ciclo de infecção do parasito *S. mansoni* no hospedeiro humano, conforme pode ser verificado na FIGURA 14.1.

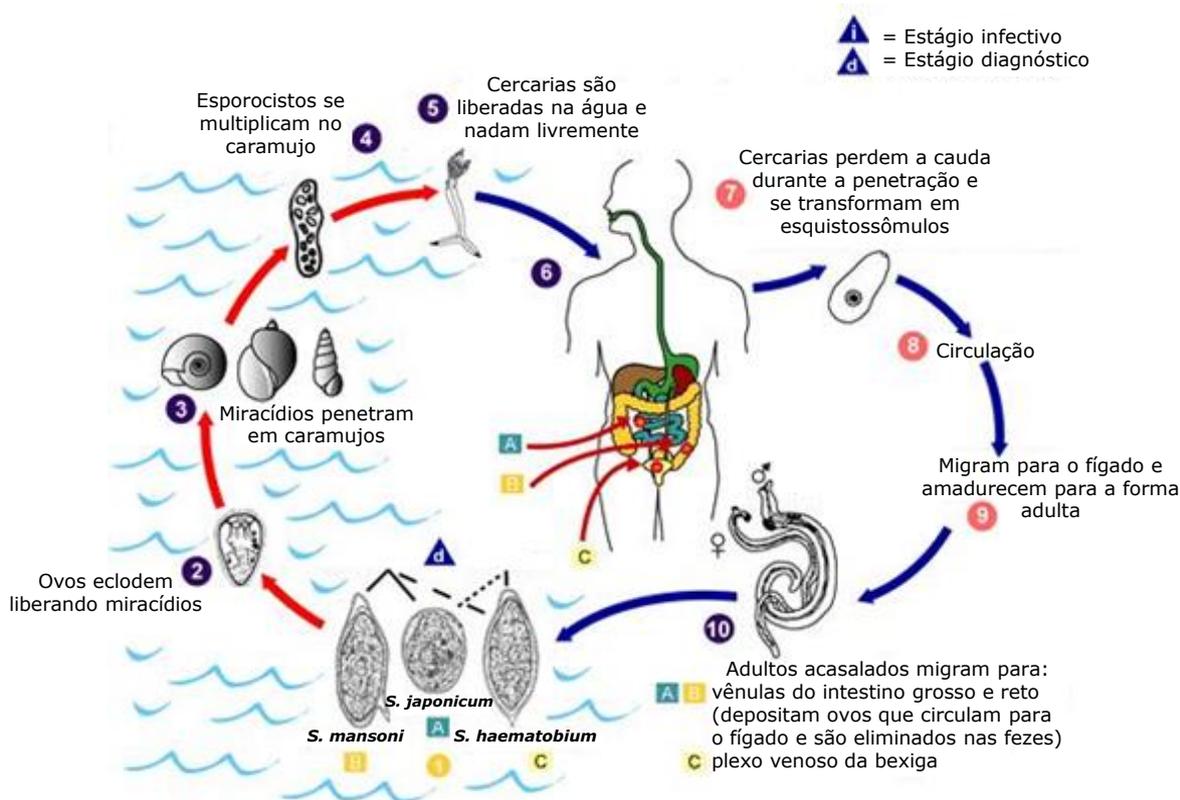


FIGURA 14.1 - Ciclo evolutivo do *Schistosoma* sp.

14.9.1 Esquistossômulos

Para avaliar a atividade frente aos esquistossômulos, 21 compostos, dentre eles: xantiletina, ácido gálico, hesperetina, nimbina, hesperidina, naringenina, naringina, dictamina, sesamina, *N*-metil-4-metoxi-2-quinolona, cedrelona, ricinina, isovitexina, orientina, rauianina, evolitrina, quercetina, 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído, diosmina e rutina foram testados em triplicata em concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os que apresentaram bons resultados na menor concentração foram novamente testados em concentrações menores até chegar a 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e sucessivamente até obter a menor concentração na qual os esquistossômulos apresentassem respostas aos compostos, chegando à concentração de 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os extratos foram testados nas concentrações de 100, 50 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram preparadas a partir de soluções estoques em DMSO. As concentrações finais de DMSO em cada poço nunca foram superiores a 0,5%.

Esquistossômulos foram distribuídos em placas de 96 poços de fundo plano a uma densidade de 300 parasitos por 200 μL de meio de cultura. O meio de

cultura utilizado era composto de meio Basch 169 (preparado pelo centro de facilidades de Cultura Celular da UCSF) contendo 5% de FBS, 100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 mg mL⁻¹ de solução de estreptomicina. As placas foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂.

Respostas fenotípicas dos esquistossômulos em relação aos compostos foram registradas diariamente no período de 1, 2, 3 e 4 dias. O processo de se analisar manualmente as respostas fenotípicas envolve mudanças de movimento, forma, translucidez, integridade do tegumento e, os compostos que são bioativos podem provocar um escurecimento e arredondamento do parasita e um processo que se denominou "degeneração". Para ambos os ensaios, os tipos e número de respostas fenotípicas registrados manualmente foram convertidos em um "score de gravidade" que varia de 0 (sem efeito) a 4 (severamente comprometido). Para cada resposta foi atribuído uma pontuação, somando-se 1 ponto.

A cada dia foram fotografadas imagens representativas e o número de parasitas degenerados calculado como uma porcentagem do número total de vermes na imagem dada. Imagens de cada tratamento foram captadas com uma Zeiss Axiovert 40 com microscópio invertido C (10x objetiva) e uma câmera digital Zeiss AxioCam MRc controlada por software AxioVision 40 (versão 4.8.1.0).

14.9.2 Vermes adultos

Para os ensaios com adultos de *S. mansoni*, 5 machos foram colocados em 2 mL do meio acima citado em placas de cultura de 24 poços. Para avaliar a atividade, 21 compostos, dentre eles: xantiletina, ácido gálico, hesperetina, nimbina, hesperidina, naringenina, naringina, dictamina, sesamina, *N*-metil-4-metoxi-2-quinolona, cedrelona, ricinina, isoovitexina, orientina, rauianina, evolitrina, quercetina, 4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído, diosmina e rutina, e os extratos A2CD e SOF-Hex, foram testados nas concentrações finais de 20 µmol L⁻¹ e 50 µg mL⁻¹, respectivamente, solubilizados em DMSO e não ultrapassando o percentual de 0,5%.

Respostas fenotípicas dos parasitas adultos, aos compostos foram registrados diariamente no período de 1 a 7 dias. O processo de análise manual às respostas fenotípicas envolve mudanças de movimento, forma, translucidez, integridade da superfície e a capacidade de aderir no fundo da placa de cultura.

Da mesma forma que os esquistossômulos, os tipos e número de respostas fenotípicas registrados manualmente para os vermes adultos foram convertidos em um "score de gravidade" que varia de 0 (sem efeito) a 4 (severamente comprometido). Para cada resposta foi atribuído uma pontuação, somando-se 1 ponto, salvo quando danos ao tegumento do parasita (superfície) era evidente, e, nesse caso, a pontuação máxima de 4 foi dada, pressupondo-se que tal dano é letal para parasitas adultos.

A cada dia foram fotografadas imagens representativas captadas com uma Zeiss Axiovert 40 com microscópio invertido C (10x objetiva) e uma câmera digital Zeiss AxioCam MRc controlada por software AxioVision 40 (versão 4.8.1.0).

PARTE III

Resultados e Discussão

15 RESULTADOS E DISCUSSÃO

15.1 Clonagem das formas longa e curta do zimogênio de SmCD1

Devido à ineficácia de uma série de tentativas na capacidade de amplificação das formas longa e curta de SmCD1 por PCR decidiu-se realizar um gradiente de PCR para verificar a melhor temperatura de anelamento para as duas formas. Com isso, foi possível detectar somente a forma longa (1,4 kb) utilizando-se 47°C como temperatura de anelamento, identificado pela coluna 6 da FIGURA 15.1B.

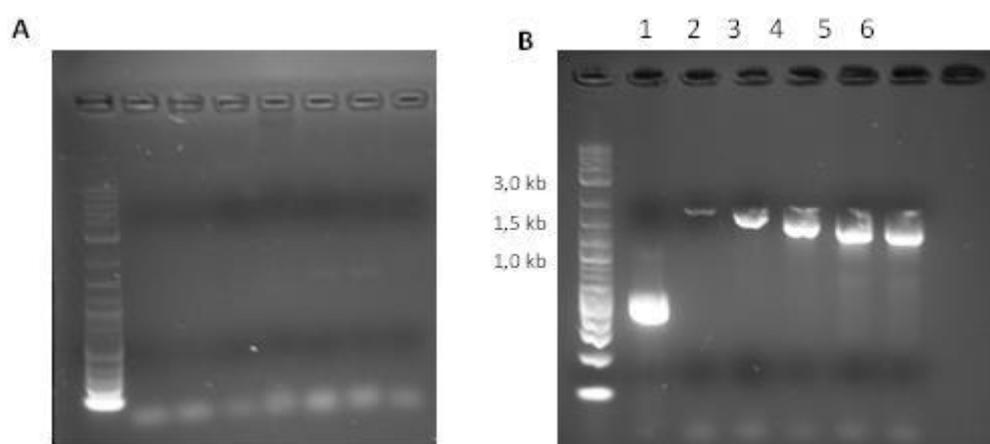


FIGURA 15.1 - Gel de agarose de amostras provenientes da amplificação das formas curta (A) e longa (B) de SmCD1.

Como não havia tempo hábil para a otimização de parâmetros de obtenção da forma curta, prosseguiu-se com o estudo da forma longa.

15.1.1 Clonagem em vetor pGem[®]-T Easy e sequenciamento

Os fragmentos amplificados dos genes da forma longa (proSmCD1) foram ligados em vetor pGem[®]-T Easy e o produto da ligação usado na transformação de células competentes “One shot top 10 competent cells”. Quatro colônias brancas da ligação com proSmCD1 foram selecionadas para preparação do pré-inóculo. As colônias brancas são indicativas da presença do inserto, pois estes clones são deficientes em β -galactosidase devido à inserção do gene clonado fora de fase com a pauta de leitura do gene desta enzima codificado em pGEM-t[®]-T Easy. Isto inativa a β -galactosidase que se torna incapaz de converter X-gal no produto que do contrário daria coloração azul à colônia. Após purificação do pré-

inóculo as quatro amostras foram enviadas para sequenciamento e quando retornaram foram analisadas e a sequência foi corretamente confirmada.

Iniciou-se então a digestão do plasmídeo pET-45b(+) e inserto+ pGem[®]-t[®]-T Easy para purificação e posterior clonagem do fragmento em vetor de expressão pET-45b(+).

Durante a realização da digestão percebemos um sítio de clivagem da enzima *SacI* também na sequência do DNA do plasmídeo pGem[®]-T Easy. Analisando-se as possibilidades de posição do inserto e a sequência do plasmídeo percebe-se que haveria duas possibilidades de digestão (FIGURA 15.2), dificultando a purificação no final caso a digestão fosse feita simultaneamente.

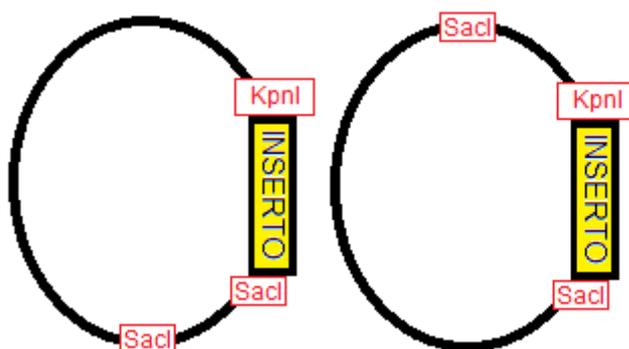


FIGURA 15.2 - Possibilidades de posição do inserto e das enzimas de restrição na sequência do plasmídeo.

Por esse motivo, após insucesso com a digestão simultânea utilizando as enzimas *SacI* e *KpnI*, decidiu-se investir na digestão do inserto+plasmídeo de forma separada, ou seja, primeiro com uma das enzimas, seguido de uma purificação, e depois com a outra enzima. Em um primeiro momento utilizamos a enzima *SacI*, na qual poderia gerar dois fragmentos, dependendo da posição que o inserto se encontrava. Os dois fragmentos foram gerados, porém, de tamanhos bem diferentes, como se verifica no gel da FIGURA 15.3.

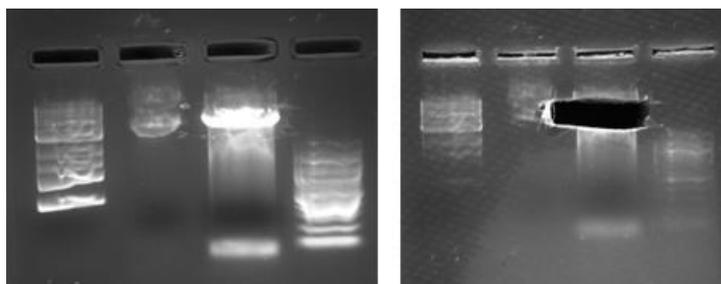


FIGURA 15.3 - Gel de agarose do inserto+plasmídeo digerido com a enzima *SacI*.

Após purificação da banda de interesse foi feita a digestão com a enzima KpnI (FIGURA 15.4).

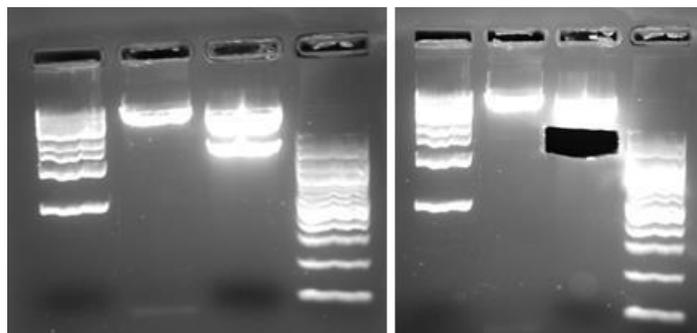


FIGURA 15.4 - Gel de agarose do inserto+plasmídeo digerido com a enzima KpnI.

Pode-se verificar que duas bandas estavam presentes no gel, sendo a menor a banda de interesse (inserto ~ 1,5 kb) devido ao tamanho do plasmídeo (~3 kb).

Após purificação das bandas do inserto e do plasmídeo pET-45b(+), iniciou-se o processo de ligação nos sítios SacI e KpnI de pET-45b(+) com auxílio da enzima T4 DNA ligase seguido do processo de transformação em células competentes de *E. coli* DH5 α . As células foram plaqueadas e quatro colônias positivas foram purificadas e enviadas para sequenciamento.

Neste momento percebe-se que a sequência não estava correta, pois um nucleotídeo a mais estava proporcionando a codificação de aminoácidos incorretos. A sequência completa depositada no GenBank (U60995.1) é apresentada:

LLVLLHLVASEVVRIPHLPLKSAQRTLIEFETSLEIVKKVWLSRVSGVDPQPEYLKN
 YLDAQYYGDITIGTPPQTFSVFDTGSSNLWVPSKYCSYFDIACLLHRKYDSSKSST
 YIPNGTEFSVHYGTGSLSGFLSTDSLQLGSLSVKGQTFGEATQQPGLVFMKFDG
 ILGMAYPSISVDGVTPVFNMIQQGIVESPVFSFYLSRNISAVLGGELMIGGIDKKYYS
 GEINYVDLTEQSYWLFKMDKLTISDMTACPDGCLAIADTGTSMIAGPTDEIQKINAKL
 GATRLPGGIYTVSCGNINNLPTIDFVINGKAMTLEPTDYLLKVS KMGSEICLTGFMGL
 DLPKRKLWILGDIFIGKFYTVFDMGKNRVGFAKALHP DSVHRTKTYIPMMRLFPAQS
 VPQAASET PNGVFAFSKLLSDEV

A parte destacada em verde na sequência se refere à pré-forma, no caso, não utilizada, e a parte destacada em rosa difere as formas curta e longa.

Quando os primers foram desenhados foi utilizada a sequência de nucleotídeos que codifica os aminoácidos da pro-forma, que se traduz nos nucleotídeos:

AGTGGTTAGGATCCCTCTTCATCCGTTAAAATCTGCTCAACGCACTCTTATTGAG
 TTTGAAACTTCTCTAGAAATTGTTAAGAAGGTCTGGTTATCCAGGGTATCTGGAG
 TTGATCCCCAACCGGAATACTTGAAAACTACCTTGATGCTCAATACTACGGTGA
 TATAACGATTGGTACGCCACCTCAGACATTCAGCGTTGTATTTGATACTGGTTCCG
 TCTAATCTTTGGGTGCCGTCAAATACTGTAGCTACTTTGACATTGCTTGCCTAC
 TACACAGGAAGTATGACAGTTCAAAGTCTTCCACTTACATCCCGAATGGTACTGA
 GTTCAGTGTTCAATTACGGTACTGGCAGTCTCAGTGGGTTCTTAAGTACAGATTCC
 CTTCAGTTGGGCTCACTGAGTGTAAGGGCCAAACGTTTGGGGAAGCGACACA
 ACAACCAGGGTTGGTTTTCGTCATGGCGAAGTTCGATGGTATCCTTGGTATGGC
 CTACCCCTCAATTTCCGTGGATGGCGTACTCCTGTATTCGTAAACATGATCCAG
 CAAGGTATAGTTGAATCTCCAGTATTCTCCTTTTATCTCAGCAGGAATATATCAG
 CTGTGCTGGGTGGTGAAGTACTGATGATTGGTGGTATCGATAAAAAGTATTACTCCG
 GCGAAATCAACTATGTGGACTTAACGGAACAGTCCTATTGGTTGTTCAAAATGGA
 CAAGCTGACTATCTCAGATATGACGGCTTGTCTGATGGATGTCTAGCTATTGCT
 GATACTGGCACTTCGATGATCGCCGGTCCAACAGACGAAATACAAAAATCAAT
 GCAAAGCTCGGAGCCACTCGTCTACCCGGTGGTATTTATACCGTTTCTTGTGGG
 AATATAACAATCTCCCAACGATTGATTTTGTAAATAACGGAAAAGCTATGACATT
 AGAACCTACAGATTATTTATTGAAGGTATCTAAAATGGGTTCTGAGATTTGCCTA
 ACCGGTTTCATGGGATTGGACCTACCGAAGAGGAAATTATGGATATTAGGAGAT
 ATATTCATAGGTAAATTTTATACAGTATTCGATATGGGCAAAAACCGTGTCCGGTT
 TTGCGAAAGCTCTTCATCCAGATTCTGTTTCATCGTACCAAACATATATACCTAT
 GATGCGATTATCCCTGCTCAATCAGTTCCACAAGCTGCTTCAGAAACCCCGAA
 TGGGGTATTCGCCTTTTCTAAACTTCTTTCAGATGAAGTTIGA

Porém, quando essa sequência foi amplificada com os primers desenhados e ligada ao vetor, houve codificação dos aminoácidos errados, e a sequência teve que ser corrigida.

Utilizando-se o kit “*QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis*” para a correção do inserto+plasmídeo inteiro, dois primers localizados na mesma posição no meio da sequência foram desenhados e corrigiu-se a mutação.

O sequenciamento mostrou a correção da mutação e este clone da forma longa foi utilizado nos estudos de expressão desta enzima.

15.1.2 Estudo da expressão forma longa de SmCD1 em *E. coli* “ArcticExpress Competent Cells” (DE3)

A construção pET-45b(+)/proSmCD1 permite a expressão da forma longa de SmCD1 como proteína de fusão com uma cauda N-terminal de histidina. Mais especificamente, as proteínas são expressas com a seguinte sequência anexada ao N-terminal: “MAHHHHHHVGT”. Portanto, a forma longa do zimogênio de SmCD1 expressa em *E. coli* “ArcticExpress Competent Cells” (DE3) deve apresentar massa de aproximadamente 47 kDa.

O clone mutado e transformado em células *ArcticExpress* (DE3) foi cultivado em pequena escala na temperatura de 37°C. Quando a D.O.⁶⁰⁰ atingiu entre 0,5 - 0,6 U.A. a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de 0,4 mmol L⁻¹ de IPTG e as culturas incubadas por mais 24h. Alíquotas das células foram coletadas ao longo da indução (3h (T₁), 6h (T₂), 12h (T₃) e 24h (T₄)) e processadas para obtenção de extratos solúveis e extratos totais (corpo de inclusão). A análise destas amostras por SDS-PAGE está ilustrada na FIGURA 15.5.

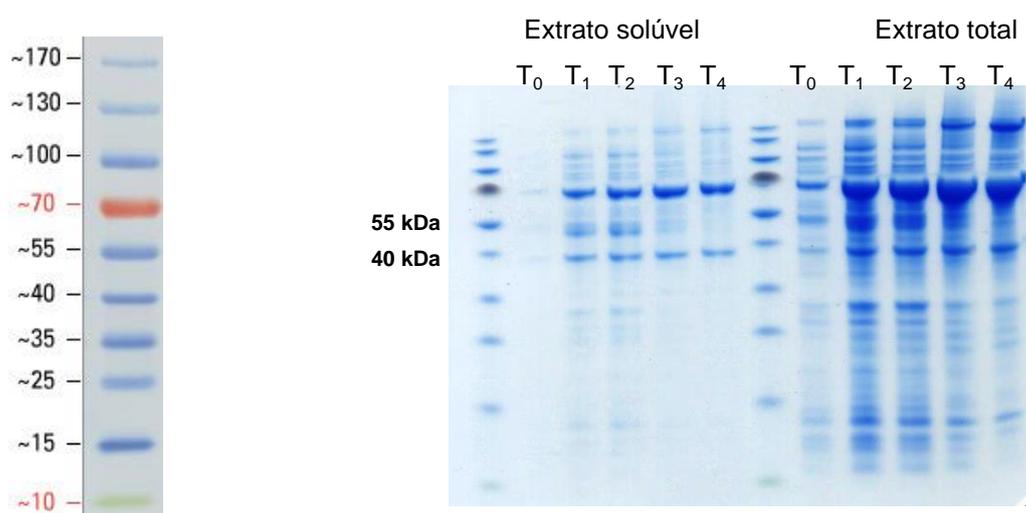


FIGURA 15.5 - Análise por SDS-PAGE das amostras dos extratos solúvel e total de cultura de células *E. coli ArcticExpress* (DE3) induzidas com 0,4 mmol L⁻¹ de IPTG para expressão da forma longa de SmCD1.

É possível perceber o aparecimento de bandas entre 40 e 55 kDa principalmente nos períodos de indução T₁ e T₂, 3 e 6 horas, respectivamente. Essas bandas também aparecem no extrato total, ou seja, podem estar presentes de forma insolúvel.

Para que se confirmasse a presença da proteína foi realizado outro gel pela detecção por *immunoblots*. Conforme evidenciado na FIGURA 15.6 as mesmas bandas que aparecem no gel SDS-PAGE também são reveladas no *immunoblot* indicando que a forma longa de SmCD1 pode ter sido expressa tanto no extrato solúvel como no extrato total.

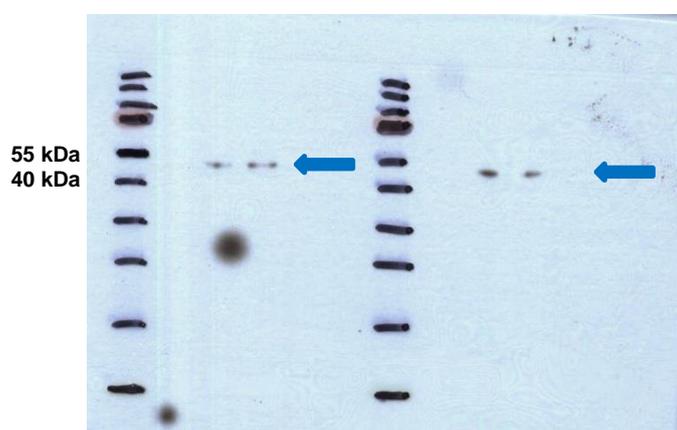


FIGURA 15.6 - Análise por SDS-PAGE-western blot das amostras dos extratos solúvel e total de cultura de células *E. coli ArcticExpress* (DE3) induzidas com 0,4 mmol L⁻¹ de IPTG para expressão da forma longa de SmCD1.

Esses resultados mostram que a expressão da forma longa de proSmCD1 foi realizada com sucesso, porém, testes preliminares com os extratos obtidos mostraram que a enzima não estava ativa. Com estes resultados não se pode concluir que a SmCD1 é definitivamente expressa na sua forma inativa em *E. coli "ArcticExpress (DE3) Competent Cells"*, pois aspectos como temperatura, tempo e concentração, envolvidos no procedimento de expressão, ainda podem e precisam ser otimizados. Porém, como a enzima não foi obtida ativa neste teste preliminar, não foi possível realizar ensaios de inibição.

15.2 Trans-ativação da enzima recombinante CB1 de *S. mansoni*

A catepsina B, principalmente a SmCB1, é a mais abundante cisteíno protease das papaínas detectada no lúmen do intestino dos esquistossomos e é utilizada como um marcador de diagnóstico sorológico de esquistossomose (CAFFREY & RUPPEL, 1997, RUPPEL et al., 1987). Como também possui papel essencial na degradação da hemoglobina ingerida de seus hospedeiros torna-se um alvo atrativo na busca de inibidores.

A enzima, que havia sido obtida de forma recombinante por meio de expressão em *Pichia pastoris* pelo laboratório do “Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases - CDIPD” da Universidade da Califórnia da UCSF encontrava-se na forma do seu zimogênio inativo, e esse fato impossibilitava a realização de ensaios para a busca de inibidores (SAJID et al., 2003).

O zimogênio de SmCB1 expresso em *P. pastoris* (41 kDa) foi incapaz de auto-remover o pró-domínio completo, como relatado com outras cisteíno peptidases, e obter sua forma madura com 31 kDa (TURK et al., 2001).

Com o estudo e otimização de protocolos que utilizavam a enzima legumaína, também expressa em *P. pastoris* (CAFFREY et al., 2000), foi possível trans-ativar a SmCB1. O processo de clivagem, que converte o zimogênio de SmCB1 (41 kDa) em sua proteína madura (31 kDa) ocorreu na parte carboxílica do resíduo Asn⁸⁶ do pró-peptídeo (SAJID et al., 2003), consistente com a seletividade conhecida das asparaginil endopeptidases para os sítios P1 dos resíduos de Asn (MATHIEU et al., 2002).

Conforme descrito, o protocolo para ativação da SmCB1 foi iniciado com a enzima legumaína sendo ativada em tampão CPS (50 mmol L⁻¹ ácido cítrico, 10 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 100 mmol L⁻¹ NaCl, pH4,5) com DTT (4 mmol L⁻¹) “overnight”. Após esse período essa solução foi adicionada na solução concentrada e purificada de SmCB1 diluída em tampão 50 mmol L⁻¹ NaOAc, pH 5,5 com DTT (2 mmol L⁻¹) incubando-se por 4 horas.

O resultado do teste de atividade com substrato peptídico fluorogênico mostrou que a enzima SmCB1 teve sua atividade aumentada em 50 vezes quando incubada por 4 horas com a legumaína previamente ativada por aproximadamente 15 horas. Com esse procedimento foi possível obter a SmCB1 ativa para futuros ensaios de inibição.

15.3 Ensaio *in vitro* com vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni*

15.3.1 Esquistossômulos

Nos ensaios com esquistossômulos somente os compostos cedrelona (**24**) ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$), sesamina (**28**) ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), dictamina (**2**) ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), xantiletina (**21**) ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) (FIGURA 15.7), e os extratos de *Almeidea II* (A2CD - $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Spiranthera odoratissima* (SOF-Hex - $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram os que apresentaram graduações máximas nas análises visuais indicando a total mortalidade dos esquistossômulos em até 4 dias de análise.

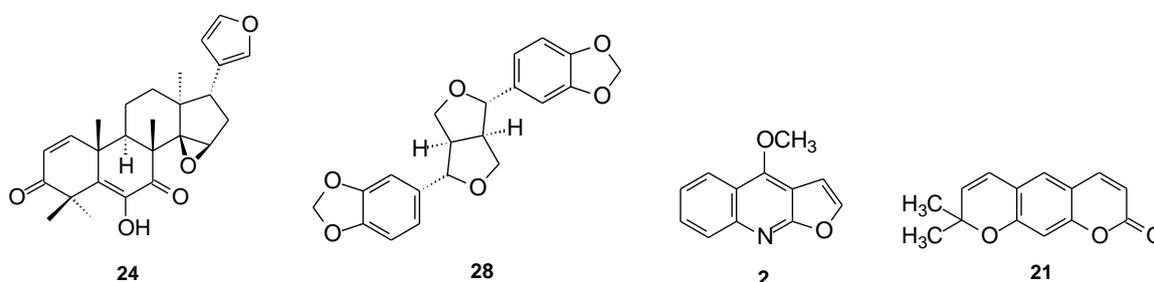


FIGURA 15.7 - Estrutura dos compostos que apresentaram bons resultados nos ensaios *in vitro* com esquistossômulos de *S. mansoni* em diferentes concentrações.

O processo de degeneração, visualizado em alguns casos como o do composto cedrelona em concentrações de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, era visivelmente identificado logo nas primeiras 24 horas de análise, como se pode ver na FIGURA 15.8B, em comparação com o controle da FIGURA 15.8A. Para outros compostos, como a dictamina ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), o processo de degeneração só é verificado a partir de 48 horas (FIGURA 15.8C e D). Pôde-se verificar, em ambos os casos, que os parasitas tornaram-se mais escuros e arredondados, às vezes com seus vacúolos inexistentes e com movimentos acelerados ou lentos demais.

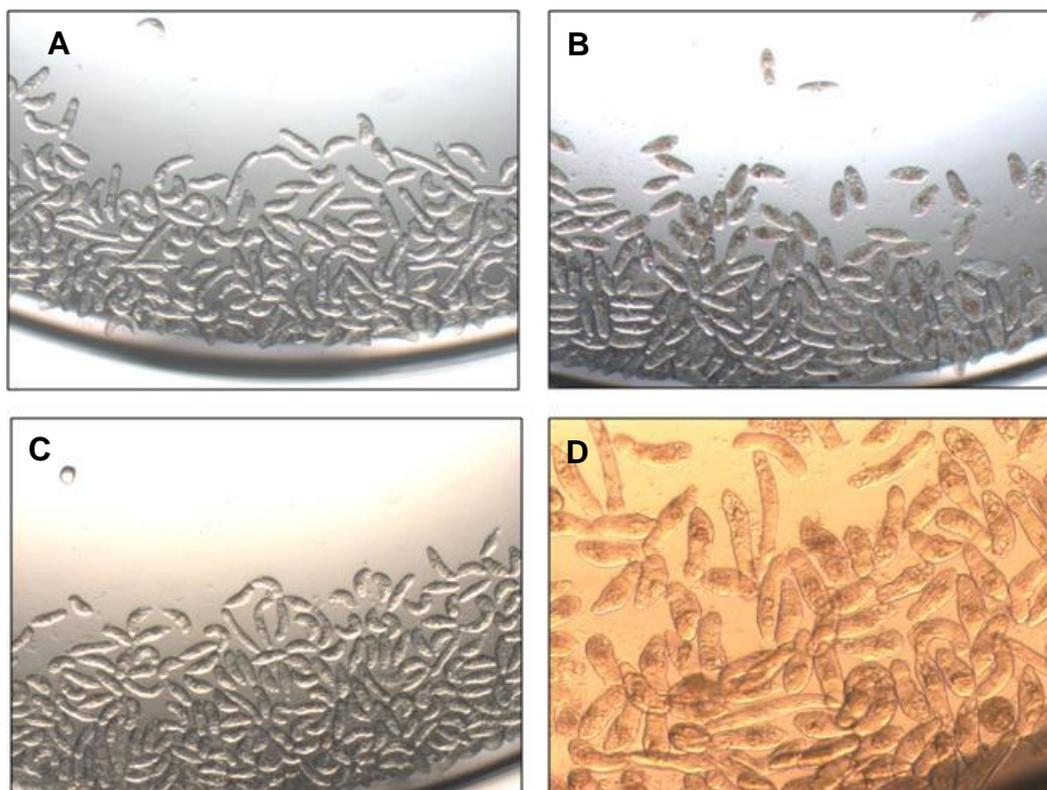


FIGURA 15.8 – Ensaio *in vitro* de esquistossômulos em placa de 96 poços. A) Controle negativo; B) Composto cedrelona ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$); C e D) Composto dictamina ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$).

O mesmo comportamento é observado com os extratos de *Almeidea II* (A2CD) e de *Spiranthera odoratissima* (SOF-Hex) (FIGURA 15.9A e B, respectivamente). Os esquistossômulos tornaram-se arredondados, sem movimentação e escuros com 48 horas de exposição aos extratos.

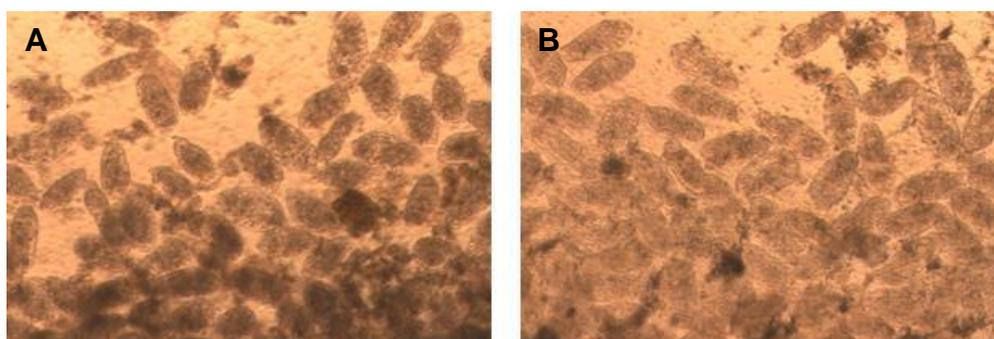


FIGURA 15.9 – Ensaio *in vitro* de esquistossômulos em placa de 96 poços. A) Extrato A2CD; B) Extrato SOF-Hex. Ambos a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os bons resultados obtidos com o limonoide cedrelona levaram a ensaios a fim de se avaliar a menor concentração na qual o esquistossômulo

apresentasse sinais de mudanças fenotípicas. Os ensaios indicaram que a concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou mortalidade dos esquistossômulos com 4 dias de análise. Os resultados com a cedrelona se mostraram promissores para futuros ensaios que investiguem de forma mais detalhada a atividade dessa substância frente à essa doença.

15.3.2 Vermes adultos

Nos ensaios com vermes adultos de *S. mansoni* foi possível verificar mortalidade ou degeneração dos parasitos somente com os compostos: ácido gálico (**26**), sesamina (**28**), cedrelona (**24**) e diosmina (**14**) (FIGURA 15.10), e com os dois extratos *Almeidea II* (A2CD) e de *Spiranthera odoratissima* (SOF-Hex). Os aspectos analisados nesse ensaio foram o escurecimento do parasita, movimentação (muito lenta, muito rápida e descoordenada ou imóvel), tamanho, com tegumento danificado e se estão aderidos ao fundo da placa.

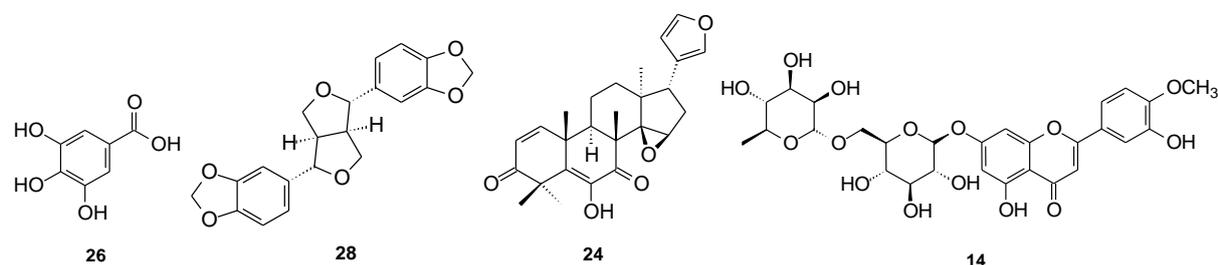


FIGURA 15.10 - Estrutura dos compostos que apresentaram bons resultados nos ensaios *in vitro* com vermes adultos de *S. mansoni* a uma concentração final de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Na FIGURA 15.11A, referente à observação após 24 h da administração do composto cedrelona, observa-se que o verme já não está mais aderido ao fundo da placa, como na letra B, no qual não há sinal de efeito em relação ao composto dictamina. Na FIGURA 15.11C, referente ao mesmo composto cedrelona, porém com observação após 42 h, o parasito, já morto, não possui sua forma e coloração original. O extrato *Almeidea II* (A2CD) também apresentou mortalidade do verme adulto, porém somente após 72 h depois da administração do extrato.

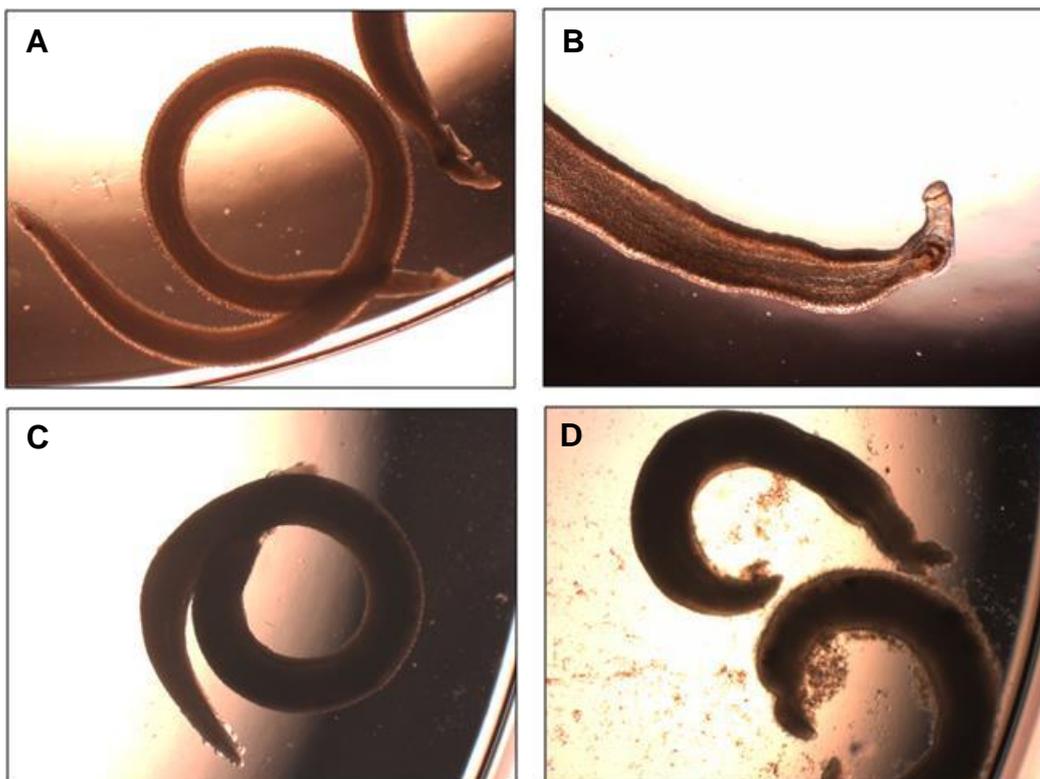


FIGURA 15.11 – Ensaio *in vitro* com adultos de vermes de *S. mansoni* em placa de 24 poços. A e C) Composto cedrelona $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ (24 horas e 48 horas, respectivamente); B) Composto dictamina $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ (24 horas) e D) Extrato A2CD $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (72 horas).

Os resultados dos ensaios com vermes adultos de *S. mansoni* confirmam novamente o limonoide cedrelona como um composto promissor.

Os dados mostram que os ensaios *in vitro*, utilizando vermes adultos e esquistossômulos como alvo, são uma forma eficaz na avaliação de compostos como candidatos a fármacos e podem complementar estudos realizados com enzimas desses parasitas.

PARTE III

Conclusões

16 CONCLUSÕES

A obtenção da enzima SmCD recombinante é reportada na literatura como um processo não trivial e fruto de muitos insucessos quando utilizados sistemas *E. coli* de clonagem e expressão.

Nesta terceira parte do trabalho mostra-se que a pro-forma longa da SmCD foi expressa, pela primeira vez, em sistema *E. coli* “*ArcticExpress Competent Cells*” (DE3), porém, inativa, e por esse motivo não pôde ser usada em estudos de inibição. O processo de clonagem e expressão adotado não foi otimizado, sendo realizado em condições de temperatura, concentrações e tempo pré-estabelecidos. Por esse motivo não se pode concluir que a SmCD é definitivamente expressa inativa no sistema *E. coli* “*ArcticExpress Competent Cells*” (DE3), pois mais experimentos devem ser realizados para se corroborar os resultados obtidos nesta parte do trabalho.

O estabelecimento de um protocolo de trans-ativação do pré-peptídeo inativo na forma madura da enzima SmCB1 por meio do uso da enzima legumina mostrou ser um sucesso, viabilizando a enzima para futuros ensaios de inibição.

Ensaio *in vitro* com vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni* avaliaram substâncias puras isoladas de produtos naturais e mostraram resultados promissores em relação ao limonoide cedrelona, indicando-o como um potencial composto para estudos mais detalhados relacionados ao tratamento dessa doença.

Conclusões gerais

17 CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho mostrou os estudos envolvendo a enzima catepsina D, relacionada a muitos processos patológicos e uma das responsáveis pela hidrólise da hemoglobina ingerida por parasitos causadores da esquistossomose. Por meio do desenvolvimento e aplicação de novas abordagens metodológicas relacionadas à CatD, foi possível avaliar 20 extratos de plantas e 31 compostos puros.

Com o biorreator CatD-IMER, acoplado a um sistema multidimensional, foi possível monitorar a atividade da enzima imobilizada diretamente por meio da quantificação do produto fluorescente formado, separado do seu substrato. Já na metodologia desenvolvida por meio da Microbalança de Cristal de Quartzo se avaliou a hidrólise do substrato hemoglobina humana pela catepsina D.

A metodologia que utiliza o CatD-IMER mostrou a vantagem da eficiência nos ensaios de compostos que fluorescem nos mesmos comprimentos de onda, pois estes podem ser separados do produto da clivagem na segunda dimensão. Porém, a desvantagem está na possível coeluição que pode existir entre os analitos. O método mostrou-se ser mais robusto e reprodutível do que os ensaios em solução, principalmente por ser automatizado. Além disso, a enzima imobilizada não está sujeita à autoproteólise, problema comum nos ensaios em solução com proteases, e pôde ser reutilizada por mais de 30 dias.

Foi possível identificar compostos com características irreversíveis ou com fortes interações logo nos primeiros ensaios, como pôde ser observado com os taninos e com a pepstatina A, fornecendo informações úteis que podem direcionar ensaios futuros. A vantagem dos ensaios em solução está no seu tempo de realização, que no geral é menor, porém este fato está relacionado à configuração adotada para o CatD-IMER, que pode ser otimizada com outros equipamentos e colunas.

A reação enzimática realizada na QCM mostrou a vantagem de ser monitorada em tempo real por meio da variação de massa na superfície do cristal de quartzo funcionalizada com a Hb imobilizada. Por não depender de fatores como fluorescência ou absorbância das moléculas envolvidas, a técnica mostrou ser uma excelente opção para realização de ensaios enzimáticos livre de interferências. Com a reação em tempo real, os parâmetros cinéticos obtidos refletem as reais constantes cinéticas, e não são fruto de aproximações matemáticas. A desvantagem

desta técnica está no custo elevado e no tempo de realização dos ensaios, que são maiores do que os ensaios com substratos fluorogênicos, porém, quando comparados com os ensaios com a Hb, mostram o mesmo tempo.

Mesmo não se observando inibição expressiva dos compostos e extratos testados contra a CatD, as metodologias provaram ser eficientes na triagem de ligantes de diversas classes e representam um avanço aos métodos em solução, pois resultam em análises mais confiáveis e livre de interferentes, problema comumente verificado nos métodos em solução.

Para finalizar, a catepsina D recombinante de *S. mansoni* foi clonada e expressa em sistema *E. coli*, e infelizmente encontrava-se inativa, não podendo ser utilizada nos ensaios de inibição. Porém, o sucesso na sua expressão merece destaque, devido às grandes dificuldades e insucessos relatados na literatura.

Os ensaios *in vitro*, utilizando vermes adultos e esquistossômulos como alvo, se mostraram uma forma eficaz na avaliação de compostos como candidatos a fármacos e apresentaram principalmente o composto cedrelona como uma substância promissora na investigação de novos compostos ativos para o tratamento dessa doença.

18 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLA, M.-H., RUELAS, D. S., WOLFF, B., SNEDECOR, J., LIM, K.-C., XU, F., RENSLO, A. R., WILLIAMS, J., MCKERROW, J. H., CAFFREY, C. R.; "Drug Discovery for Schistosomiasis: Hit and Lead Compounds Identified in a Library of Known Drugs by Medium-Throughput Phenotypic Screening". *Plos Neglected Tropical Diseases*, **3**: 2009.
- ACKER, M. G., AULD, D. S.; "Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-throughput screening applications". *Perspectives in Science*, **1**: 56-73, 2014.
- AFONSO, A. S., ZANETTI, B. F., SANTIAGO, A. C., HENRIQUE-SILVA, F., MATTOSO, L. H. C., FARIA, R. C.; "QCM immunoassay for recombinant cysteine peptidase: A potential protein biomarker for diagnosis of citrus canker". *Talanta*, **104**: 193-197, 2013.
- ALLARA, D. L.; "Critical issues in applications of self-assembled monolayers". *Biosensors and Bioelectronics*, **10**: 771-783, 1995.
- ANDRAU, D., DUMANCHIN-NJOCK, C., AYRAL, E., VIZZAVONA, J., FARZAN, M., BOISBRUN, M., FULCRAND, P., HERNANDEZ, J. F., MARTINEZ, J., LEFRANC-JULLIEN, S., CHECLER, F.; "BACE1- and BACE2-expressing human cells - Characterization of beta-amyloid precursor protein-derived catabolites, design of a novel fluorimetric assay, and identification of new in vitro inhibitors". *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 25859-25866, 2003.
- ANDREWS, P.; "Praziquantel - mechanisms of anti-schistosomal activity". *Pharmacology & Therapeutics*, **29**: 129-156, 1985.
- AOYAGI, T., KUNIMOTO, S., MORISHIM.H, TAKEUCHI, T., UMEZAWA, H.; "Effect of pepstatin on acid proteases". *J. Antibiot.*, **24**: 687-690, 1971.
- BABINE, R. E., BENDER, S. L.; "Molecular recognition of protein-ligand complexes: Applications to drug design". *Chemical Reviews*, **97**: 1359-1472, 1997.
- BAELL, J., WALTERS, M. A.; "Chemical con artists foil drug discovery". *Nature*, **513**: 481-483, 2014.
- BAIN, C. D., EVALL, J., WHITESIDES, G. M.; "Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold - variation in the head group, tail group, and solvent". *Journal of the American Chemical Society*, **111**: 7155-7164, 1989.
- BALDWIN, E. T., BHAT, T. N., GULNIK, S., HOSUR, M. V., SOWDER, R. C., CACHAU, R. E., COLLINS, J., SILVA, A. M., ERICKSON, J. W.; "Crystal-structures of Native and Inhibited Forms of Human Cathepsin D - Implications for lysosomal targeting and drug design". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**: 6796-6800, 1993.
- BASU, D., ZHANG, N., PANIGRAHI, A. K., HORTON, T. M., PATI, D.; "Development and validation of a fluorogenic assay to measure separase enzyme activity". *Analytical Biochemistry*, **392**: 133-138, 2009.
- BENES, P., VETVICKA, V., FUSEK, M.; "Cathepsin D - Many functions of one aspartic protease". *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **68**: 12-28, 2008.

- BERCHEM, G., GLONDU, M., GLEIZES, M., BROUILLET, J. P., VIGNON, F., GARCIA, M., LIAUDET-COOPMAN, E.; "Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis". *Oncogene*, **21**: 5951-5955, 2002.
- BICKETT, D. M., GREEN, M. D., BERMAN, J., DEZUBE, M., HOWE, A. S., BROWN, P. J., ROTH, J. T., MCGEEHAN, G. M.; "A high-throughput fluorogenic substrate for interstitial collagenase (MMP-1) and gelatinase (MMP-9)". *Analytical Biochemistry*, **212**: 58-64, 1993.
- BILITEWSKI, U.; "Protein-sensing assay formats and devices". *Analytica Chimica Acta*, **568**: 232-247, 2006.
- BRADFORD, M. M.; "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254, 1976.
- BREDDAM, K., MELDAL, M.; "Substrate preferences of glutamic-acid-specific endopeptidases assessed by synthetic peptide-substrates based on intramolecular fluorescence quenching". *Eur. J. Biochem.*, **206**: 103-107, 1992.
- BRINDLEY, P. J., KALINNA, B. H., DALTON, J. P., DAY, S. R., WONG, J. Y. M., SMYTHE, M. L., MCMANUS, D. P.; "Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes". *Molecular and Biochemical Parasitology*, **89**: 1-9, 1997.
- BRINDLEY, P. J., KALINNA, B. H., WONG, J. Y. M., BOGITSH, B. J., KING, L. T., SMYTH, D. J., VERITY, C. K., ABBENANTE, G., BRINKWORTH, R. I., FAIRLIE, D. P., SMYTHE, M. L., MILBURN, P. J., BIELEFELDT-OHMANN, H., ZHENG, Y., MCMANUS, D. P.; "Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D". *Molecular and Biochemical Parasitology*, **112**: 103-112, 2001.
- BRINKWORTH, R. I., PROCIV, P., LOUKAS, A., BRINDLEY, P. J.; "Hemoglobin-degrading, Aspartic Proteases of Blood-feeding Parasites: Substrate Specificity Revealed by Homology Models". *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 38844-38851, 2001.
- BUNDE, R. L., JARVI, E. J., ROSENTERER, J. J.; "Piezoelectric quartz crystal biosensors". *Talanta*, **46**: 1223-1236, 1998.
- BURSAVICH, M. G., RICH, D. H.; "Designing non-peptide peptidomimetics in the 21st century: Inhibitors targeting conformational ensembles". *Journal of Medicinal Chemistry*, **45**: 541-558, 2002.
- BUTLER, M. S., ROBERTSON, A. A. B., COOPER, M. A.; "Natural product and natural product derived drugs in clinical trials". *Nat. Prod. Rep.*, **31**: 1612-1661, 2014.
- CAFFREY, C. R., ENGEL, A., GSELL, C., GOHRING, K., RUPPEL, A.; "*Schistosoma japonicum* and *S. mansoni*: effect of cyclosporin A on aspartic and cysteine hemoglobinolytic activities". *Parasitology International*, **47**: 11-19, 1998.
- CAFFREY, C. R., MATHIEU, M. A., GAFFNEY, A. M., SALTER, J. P., SAJID, M., LUCAS, K. D., FRANKLIN, C., BOGYO, M., MCKERROW, J. H.; "Identification of a cDNA encoding an active asparaginyl endopeptidase of *Schistosoma mansoni* and its expression in *Pichia pastoris*". *Febs Letters*, **466**: 244-248, 2000.
- CAFFREY, C. R., MCKERROW, J. H., SALTER, J. P., SAJID, M.; "Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases". *Trends in Parasitology*, **20**: 241-248, 2004.

- CAFFREY, C. R., PLACHA, L., BARINKA, C., HRADILEK, M., DOSTAL, J., SAJID, M., MCKERROW, J. H., MAJER, P., KONVALINKA, J., VONDRASEK, J.; "Homology modeling and SAR analysis of *Schistosoma japonicum* cathepsin D (SjCD). with statin inhibitors identify a unique active site steric barrier with potential for the design of specific inhibitors". *Biological Chemistry*, **386**: 339-349, 2005.
- CAFFREY, C. R., RUPPEL, A.; "Cathepsin B-like activity predominates over cathepsin L-like activity in adult *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*". *Parasitology Research*, **83**: 632-635, 1997.
- CALLERI, E. T., C.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G.; "Target-Based Drug Discovery: the Emerging Success of Frontal Affinity Chromatography Coupled to Mass Spectrometry". *ChemMedChem*, **4**: 905-916, 2009.
- CARDOSO, C. L., LIMA, V. V., ZOTTIS, A., OLIVA, G., ANDRICOPULO, A., WAINER, I. W., MOADDEL, R., CASS, Q. B.; "Development and characterization of an immobilized enzyme reactor (IMER) based on human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies". *Journal of Chromatography A*, **1120**: 151-157, 2006.
- CARDOSO, C. L., MORAES, M. C. D., CASS, Q. B.; "Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas". *Química Nova*, **32**: 175-187, 2009.
- CARPINELLA, M. C., GIORDA, L. M., FERRAYOLI, C. G., PALACIOS, S. M.; "Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 2506-2511, 2003.
- CASSIANO, N. M., BARREIRO, J. C., ROCHA MARTINS, L. R., OLIVEIRA, R. V., CASS, Q. B.; "Chromatographic methods validation for analysis of small molecules in biological matrices". *Química Nova*, **32**: 1021-1030, 2009.
- CEZARI, M. H. S., PUZER, L., JULIANO, M. A., CARMONA, A. K., JULIANO, L.; "Cathepsin B carboxydipeptidase specificity analysis using internally quenched fluorescent peptides". *Biochem. J.*, **368**: 365-369, 2002.
- CHAIKEN, I. M. "Anal. Affinity Chromatogr", ed. Series. Boca Raton: CRC Press, 1987.
- CHANG, S. W. K., K.H.; CHOI, S.U.; RYU, S.Y.; LEE, K.R.; "Phytochemical Constituents of *Bistorta manshuriensis*". *Natural Product Sciences*, **15**: 234-240, 2009.
- CHWIERALSKI, C. E., WELTE, T., BUHLING, F.; "Cathepsin-regulated apoptosis". *Apoptosis*, **11**: 143-149, 2006.
- CINGÖZ, A., HUGON-CHAPUIS, F., PICHON, V.; "Evaluation of various immobilized enzymatic microreactors coupled on-line with liquid chromatography and mass spectrometry detection for quantitative analysis of cytochrome c". *Journal of Chromatography A*, **1209**: 95, 2008.
- COATES, L., ERSKINE, P. T., MALL, S., GILL, R., WOOD, S. P., MYLES, D. A. A., COOPER, J. B.; "X-ray, neutron and NMR studies of the catalytic mechanism of aspartic proteinases". *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, **35**: 559-566, 2006.

- COPELAND, R. A. "Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists", ed. Series. New York: Wiley, 2005.
- DAMOS, F. S., MENDES, R. K., KUBOTA, L. T.; "Aplicações De Qcm, Eis E Spr Na Investigação De Superfícies E Interfaces Para O Desenvolvimento De (Bio)Sensores". *Quim. Nova*, **27**: 970-979, 2004.
- DAVIES, D. R.; "The structure and function of the aspartic proteinases". *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **19**: 189-215, 1990.
- DE MORAES, M. C., DUCATI, R. G., DONATO, A. J., BASSO, L. A., SANTOS, D. S., CARDOSO, C. L., CASS, Q. B.; "Capillary bioreactors based on human purine nucleoside phosphorylase: A new approach for ligands identification and characterization". *Journal of Chromatography A*, **1232**: 110-115, 2012.
- DE MORAES, M. C., TEMPORINI, C., CALLERI, E., BRUNI, G., DUCATI, R. G., SANTOS, D. S., CARDOSO, C. L., CASS, Q. B., MASSOLINI, G.; "Evaluation of capillary chromatographic supports for immobilized human purine nucleoside phosphorylase in frontal affinity chromatography studies". *Journal of Chromatography A*, **1338**: 77-84, 2014.
- DE OLIVEIRA, D. M., SIQUEIRA, E. P., NUNES, Y. R. F., COTA, B. B.; "Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa*". *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **23**: 614-620, 2013.
- DUNN, B. M.; "Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases". *Chemical Reviews*, **102**: 4431-4458, 2002.
- DUNN, B. M., CHAIKEN, I. M.; "Quantitative Affinity Chromatography - Determination Of Binding Constants By Elution With Competitive Inhibitors ". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**: 2382-2385, 1974.
- FLORENTIN, D., SASSI, A., ROQUES, B. P.; "A highly sensitive fluorometric assay for enkephalinase, a neutral metalloendopeptidase that releases tyrosine-glycine-glycine from enkephalins". *Analytical Biochemistry*, **141**: 62-69, 1984.
- FORSTER, T.; "10th Spiers Memorial Lecture - Transfer Mechanisms Of Electronic Excitation". *Discussions of the Faraday Society*, 7-17, 1959.
- FOUNDLING, S. I., COOPER, J., WATSON, F. E., CLEASBY, A., PEARL, L. H., SIBANDA, B. L., HEMMINGS, A., WOOD, S. P., BLUNDELL, T. L., VALLER, M. J., NOREY, C. G., KAY, J., BOGER, J., DUNN, B. M., LECKIE, B. J., JONES, D. M., ATRASH, B., HALLETT, A., SZELKE, M.; "High-resolution x-ray analyses of renin inhibitor-aspartic proteinase complexes". *Nature*, **327**: 349-352, 1987.
- FRANCO, G. R., ADAMS, M. D., SOARES, M. B., SIMPSON, A. J. G., VENTER, J. C., PENA, S. D. J.; "Identification of new schistosoma-mansonii genes by the est strategy using a directional cDNA library". *Gene*, **152**: 141-147, 1995.
- FRANCO, G. R., VALADAO, A. F., AZEVEDO, V., RABELO, E. M. L.; "The Schistosoma gene discovery program: state of the art". *International Journal for Parasitology*, **30**: 453-463, 2000.
- FURUSAWA, H., TAKANO, H., OKAHATA, Y.; "Transient kinetic studies of protein hydrolyses by endo- and exo-proteases on a 27 MHz quartz-crystal microbalance". *Organic & Biomolecular Chemistry*, **6**: 727-731, 2008.

- GACKO, M., MINAROWSKA, A., KARWOWSKA, A., MINAROWSKI, L.; "Cathepsin D inhibitors". *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, **45**: 291-313, 2007.
- GARCIA, M., PLATET, N., LIAUDET, E., LAURENT, V., DEROCQ, D., BROUILLET, J. P., ROCHEFORT, H.; "Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis". *Stem Cells*, **14**: 642-650, 1996.
- GOODING, J. J., MEARNS, F., YANG, W. R., LIU, J. Q.; "Self-assembled monolayers into the 21(st) century: Recent advances and applications". *Electroanalysis*, **15**: 81-96, 2003.
- GRIBBON, P., SEWING, A.; "Fluorescence readouts in HTS: no gain without pain?". *Drug Discovery Today*, **8**: 1035-1043, 2003.
- GRUNINGER-LEITCH, F., SCHLATTER, D., KUNG, E., NELBOCK, P., DOBELI, H.; "Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases". *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 4687-4693, 2002.
- HAAS, E., WILCHEK, M., KATCHALSKIKATZIR, E., STEINBERG, I. Z.; "Distribution of end-to-end distances of oligopeptides in solution as estimated by energy-transfer". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**: 1807-1811, 1975.
- HAGE, D. S., RUHN, P. F. "Handbook of Affinity Chromatography", ed. Series. Boca Raton: CEC Press, 2005.
- HAMAZAKI, H.; "Cathepsin D is involved in the clearance of Alzheimer's beta-amyloid protein". *Febs Letters*, **396**: 139-142, 1996.
- HAQUE, A., BANIK, N. L., RAY, S. K.; "New Insights into the Roles of Endolysosomal Cathepsins in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Cathepsin Inhibitors as Potential Therapeutics". *CNS Neurol. Disord.-Drug Targets*, **7**: 270-277, 2008.
- HARBONE, J. B. "The Flavonoids: Advances in Research", ed. Series. London: Chapman & Hall, 1994.
- HUENERBEIN, A., SCHMELZER, C. E. H., NEUBERT, R. H. H.; "Real-time monitoring of peptic and tryptic digestions of bovine beta-casein using quartz crystal microbalance". *Analytica Chimica Acta*, **584**: 72-77, 2007.
- JAMES, M. N. G., SIELECKI, A. R.; "Molecular-structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution". *Nature*, **319**: 33-38, 1986.
- JANSHOFF, A., GALLA, H. J., STEINEM, C.; "Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors?". *Angewandte Chemie-International Edition*, **39**: 4004-4032, 2000.
- JILKOVA, A., REZACOVA, P., LEPSIK, M., HORN, M., VACHOVA, J., FANFRLIK, J., BRYNDA, J., MCKERROW, J. H., CAFFREY, C. R., MARES, M.; "Structural Basis for Inhibition of Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, *Schistosoma mansoni*". *Journal of Biological Chemistry*, **286**: 35770-35781, 2011.
- KASSCHAU, M. R., ROBINSON, D. C., DREDEN, M. H.; "*Schistosoma mansoni*: Activation of hemolytic activity in homogenates from live adult worms". *Experimental Parasitology*, **62**: 442-449, 1986.

- KESERU, G. M., MAKARA, G. M.; "Hit discovery and hit-to-lead approaches". Drug Discovery Today, **11**: 2006.
- KICK, E. K., ROE, D. C., SKILLMAN, A. G., LIU, G. C., EWING, T. J. A., SUN, Y. X., KUNTZ, I. D., ELLMAN, J. A.; "Structure-based design and combinatorial chemistry yield low nanomolar inhibitors of cathepsin D". Chemistry & Biology, **4**: 297-307, 1997.
- KNIGHT, C. G., BARRETT, A. J.; "Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin". Biochem. J., **155**: 117-125, 1976.
- KNIGHT, V., SANGLIER, J. J., DITULLIO, D., BRACCILI, S., BONNER, P., WATERS, J., HUGHES, D., ZHANG, L.; "Diversifying microbial natural products for drug discovery". Appl. Microbiol. Biotechnol., **62**: 446-458, 2003.
- KOEHLER, J. W., MORALES, M. E., SHELBY, B. D., BRINDLEY, P. J.; "Aspartic protease activities of schistosomes cleave mammalian hemoglobins in a host-specific manner". Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, **102**: 83-85, 2007.
- LAEMMLI, U. K.; "Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4". Nature, **227**: 680-8, 1970.
- LAZERGES, M., PERROT, H., RABEHAGASOA, N., COMPERE, C., DREANNO, C., MUCIO PEDROSO, M., FARIA, R. C., BUENO, P. R.; "DNA hybridization mechanism in an interfacial environment: What hides beneath first order $k(s(-1))$ kinetic constant?". Sensors and Actuators B-Chemical, **171**: 522-527, 2012.
- LEUNG, D., ABBENANTE, G., FAIRLIE, D. P.; "Protease inhibitors: Current status and future prospects". Journal of Medicinal Chemistry, **43**: 305-341, 2000.
- LIAUDET-COOPMAN, E., BEAUJOUIN, M., DEROCQ, D., GARCIA, M., GLONDU-LASSIS, M., LAURENT-MATHA, V., PRÉBOIS, C., ROCHEFORT, H., VIGNON, F.; "Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis". Cancer Letters, **237**: 167-179, 2006.
- LOJOU, É., BIANCO, P.; "Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices". J. Electroceram, **16**: 79-91, 2006.
- LOVE, J. C., ESTROFF, L. A., KRIEBEL, J. K., NUZZO, R. G., WHITESIDES, G. M.; "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology". Chemical Reviews, **105**: 1103-1170, 2005.
- MARCINISZYN, J., HARTSUCK, J. A., TANG, J.; "Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin". Journal of Biological Chemistry, **251**: 7088-7094, 1976.
- MARKOGLOU, N., WAINER, I. W., Immobilized enzyme reactors in liquid chromatography: On-line bioreactors for use in synthesis and drug discovery, in *Handbook of Analytical Separations*, Wilson, I.D., Editor 2003, Elsevier Science Ltd: Oxford, UK. p. 215.
- MATAYOSHI, E. D., WANG, G. T., KRAFFT, G. A., ERICKSON, J.; "Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy-transfer". Science, **247**: 954-958, 1990.
- MATHIEU, M. A., BOGYO, M., CAFFREY, C. R., CHOE, Y., LEE, J., CHAPMAN, H., SAJID, M., CRAIK, C. S., MCKERROW, J. H.; "Substrate specificity of schistosome versus human legumain determined by P1-P3 peptide libraries". Molecular and Biochemical Parasitology, **121**: 99-105, 2002.

- MAYNADIER, M., VEZENKOV, L. L., AMBLARD, M., MARTIN, V., GANDREUIL, C., VAILLANT, O., GARY-BOBO, M., BASILE, I., HERNANDEZ, J.-F., GARCIA, M., MARTINEZ, J.; "Dipeptide mimic oligomer transporter mediates intracellular delivery of Cathepsin D inhibitors: A potential target for cancer therapy". *Journal of Controlled Release*, **171**: 251-257, 2013.
- MCCONNELL, R., GODWIN, W., STEFAN, A., NEWTON, C., MYERS, N., HATFIELD, S.; "Synthesis and cathepsin D inhibition of peptide-hydroxyethyl amine isosteres with cyclic tertiary amines". *Letters in Peptide Science*, **10**: 69-78, 2003.
- MERCADO-MARIN, E. V., GARCIA-REYNAGA, P., ROMMINGER, S., PIMENTA, E. F., ROMNEY, D. K., LODEWYK, M. W., WILLIAMS, D. E., ANDERSEN, R. J., MILLER, S. J., TANTILLO, D. J., BERLINCK, R. G. S., SARPONG, R.; "Total synthesis and isolation of citrinalin and cyclopiamine congeners". *Nature*, **509**: 318-324, 2014.
- MERRICK, J. M., OSMAN, A., TSAI, J., QUACKENBUSH, J., LOVERDE, P. T., LEE, N. H.; "The *Schistosoma mansoni* gene index: Gene discovery and biology by reconstruction and analysis of expressed gene sequences". *Journal of Parasitology*, **89**: 261-269, 2003.
- MOADDEL, R., WAINER, I. W.; "Conformational mobility of immobilized proteins". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43**: 399-406, 2007.
- MONZO, A., SPERLING, E., GUTTMAN, A. S.; "Proteolytic enzyme-immobilization techniques for MS-based protein analysis". *Trends in Analytical Chemistry*, **28**: 2009.
- MORI, T., SHIBATA, M., NIHIRA, T., MIKAMI, B., OKAHATA, Y.; "Kinetic monitoring of site-directed mutational beta-amylase catalysis on a 27-MHz QCM". *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **82**: 121-126, 2012.
- NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M.; "Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010". *Journal of Natural Products*, **75**: 311-335, 2012.
- NG, W., DAI, J.-R., SLON-USAKIEWICZ, J. J., REDDEN, P. R., PASTERNAK, A., REID, N.; "Automated Multiple Ligand Screening by Frontal Affinity Chromatography–Mass Spectrometry (FAC-MS)". *Journal of Biomolecular Screening*, **12**: 167-174, 2007.
- NIHIRA, T., MORI, T., ASAKURA, M., OKAHATA, Y.; "Kinetic Studies of Dextranucrase Enzyme Reactions on a Substrate- or Enzyme-Immobilized 27 MHz Quartz Crystal Microbalance". *Langmuir*, **27**: 2107-2111, 2011.
- NISHINO, H., NIHIRA, T., MORI, T., OKAHATA, Y.; "Direct monitoring of enzymatic glucan hydrolysis on a 27-MHz quartz-crystal microbalance". *Journal of the American Chemical Society*, **126**: 2264-2265, 2004.
- PEARCE, E. J., MACDONALD, A. S.; "The immunobiology of schistosomiasis". *Nature Reviews Immunology*, **2**: 499-511, 2002.
- PEARL, L. H.; "The catalytic mechanism of aspartic proteinases". *Febs Letters*, **214**: 8-12, 1987.
- PENG, X. F., ZHENG, Z. P., CHENG, K. W., SHAN, F., REN, G. X., CHEN, F., WANG, M. F.; "Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts". *Food Chemistry*, **106**: 475-481, 2008.

- PESQUERO, N. C., PEDROSO, M. M., WATANABE, A. M., GOLDMAN, M. H. S., FARIA, R. C., ROQUE-BARREIRA, M. C., BUENO, P. R.; "Real-time monitoring and kinetic parameter estimation of the affinity interaction of jArtinM and rArtinM with peroxidase glycoprotein by the electrogravimetric technique". *Biosensors & Bioelectronics*, **26**: 36-42, 2010.
- PUSSET, J., LOPEZ, J. L., PAIS, M., ALNEIRABEYEH, M., VEILLON, J. M.; "Plants of new-caledonia. Isolation and 2D NMR-studies of alkaloids from *Comptonella sessilifoliola*". *Planta Medica*, **57**: 153-155, 1991.
- RAO, S. V., ANDERSON, K. W., BACHAS, L. G.; "Oriented immobilization of proteins". *Microchimica Acta*, **128**: 127-143, 1998.
- RAWLINGS, N. D., BARRETT, A. J.; "Evolutionary families of peptidases". *Biochem. J.*, **290**: 205-218, 1993.
- RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C.; "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos". *Química Nova*, **27**: 771-780, 2004.
- ROCHEFORT, H., GARCIA, M., GLONDU, M., LAURENT, V., LIAUDET, E., REY, J. M., ROGER, P.; "Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview". *Clinica Chimica Acta*, **291**: 157-170, 2000.
- ROGERS, K. R.; "Principles of affinity-based biosensors". *Mol. Biotech.*, **14**: 109-129, 2000.
- RUPPEL, A., SHI, Y. E., WEI, D. X., DIESFELD, H. J.; "Sera of *Schistosoma-japonicum*-infected patients cross-react with diagnostic 31/32 kd proteins of *Schistosoma-mansoni*". *Clinical and Experimental Immunology*, **69**: 291-298, 1987.
- SAJID, M., MCKERROW, J. H., HANSELL, E., MATHIEU, M. A., LUCAS, K. D., HSIEH, I., GREENBAUM, D., BOGYO, M., SALTER, J. P., LIM, K. C., FRANKLIN, C., KIM, J. H., CAFFREY, C. R.; "Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase". *Molecular and Biochemical Parasitology*, **131**: 65-75, 2003.
- SAUERBREY, G.; "Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung". *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, **155**: 206-222, 1959.
- SCHAGGER, H.; "Tricine-SDS-PAGE". *Nature Protocols*, **1**: 16-22, 2006.
- SCHECHTER, I., BERGER, A.; "On the size of the active site in proteases. I. Papain". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **27**: 157-162, 1967.
- SEMASHKO, T. A., VOROTNIKOVA, E. A., SHARIKOVA, V. F., VINOKUROV, K. S., SMIRNOVA, Y. A., DUNAEVSKY, Y. E., BELOZERSKY, M. A., OPPERT, B., ELPIDINA, E. N., FILIPPOVA, I. Y.; "Selective chromogenic and fluorogenic peptide substrates for the assay of cysteine peptidases in complex mixtures". *Analytical Biochemistry*, **449**: 179-187, 2014.
- SILVA JR, F. P., RIBEIRO, F., KATZ, N., GIOVANNI-DE-SIMONE, S.; "Exploring the subsite specificity of *Schistosoma mansoni* aspartyl hemoglobinase through comparative molecular modelling". *FEBS Letters*, **514**: 141-148, 2002.

- SIMIONATO, A. V. C., DA SILVA, D. S., LAMBAIS, M. R., CARRILHO, E.; "Characterization of a putative *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor by HRGC-EI-MS". *Journal of Mass Spectrometry*, **42**: 490-496, 2007.
- SIMON, D. I., EZRATTY, A. M., LOSCALZO, J.; "THE FIBRIN(OGEN)OLYTIC PROPERTIES OF CATHEPSIN-D". *Biochemistry*, **33**: 6555-6563, 1994.
- SLON-USAKIEWICZ, J. J., NG, W., FOSTER, J. E., DAI, J.-R., DERETAY, E., TOLEDOSH-SHERMAN, L., REDDEN, P. R., PASTERNAK, A., REID, N.; "Frontal Affinity Chromatography with MS Detection of EphB2 Tyrosine Kinase Receptor. 1. Comparison with Conventional ELISA". *J. Med. Chem*, **47**: 5094-5100, 2004.
- SRIVASTAVA, V., SAXENA, H. O., SHANKER, K., KUMAR, J. K., LUQMAN, S., GUPTA, M. M., KHANUJA, S. P. S., NEGI, A. S.; "Synthesis of gallic acid based naphthophenone fatty acid amides as cathepsin D inhibitors". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **16**: 4603-4608, 2006.
- STEFANIC, S., DVORAK, J., HORN, M., BRASCHI, S., SOJKA, D., RUELAS, D. S., SUZUKI, B., LIM, K.-C., HOPKINS, S. D., MCKERROW, J. H., CAFFREY, C. R.; "RNA Interference in *Schistosoma mansoni* Schistosomula: Selectivity, Sensitivity and Operation for Larger-Scale Screening". *Plos Neglected Tropical Diseases*, **4**: 2010.
- STOYTICHEVA, M., ZLATEV, R., COSNIER, S., ARREDONDO, M., VALDEZ, B.; "High sensitive trypsin activity evaluation applying a nanostructured QCM-sensor". *Biosensors & Bioelectronics*, **41**: 862-866, 2013.
- STROBEL, G., DAISY, B.; "Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**: 491-+, 2003.
- STROBEL, G. A.; "Endophytes as sources of bioactive products". *Microbes Infect.*, **5**: 535-544, 2003.
- THÉVENOT, D. R., TOTH, K., DURST, R. A., WILSON, S. G.; "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification". *Biosens. Bioelectron.* , **16**: 121-131, 2001.
- TLILI, A., ABDELGHANI, A., HLELI, S., MAAREF, M. A.; "Electrical characterization of a thiol SAM on gold as a first step for the fabrication of immunosensors based on a quartz crystal microbalance". *Sensors*, **4**: 105-114, 2004.
- TOTH, M. V., MARSHALL, G. R.; "A simple, continuous fluorometric assay for HIV protease". *Int. J. Pept. Protein Res.*, **36**: 544-550, 1990.
- TURK, V., TURK, B., TURK, D.; "Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities". *Embo Journal*, **20**: 4629-4633, 2001.
- TWEED, S. A., LOUN, B., HAGE, D. S.; "Effects of Ligand Heterogeneity in the Characterization of Affinity Columns by Frontal Analysis". *Anal. Chem.*, **69**: 4790-4798, 1997.
- UMEZAWA, H., AOYAGI, T., MORISHIM.H, MATSUZAK.M, HAMADA, M., TAKEUCHI, T.; "Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes". *J. Antibiot.*, **23**: 259-&, 1970.

- VANDERSTAPPEN, J. W. J., WILLIAMS, A. C., MACIEWICZ, R. A., PARASKEVA, C.; "Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D". *Int. J. Cancer*, **67**: 547-554, 1996.
- VEDVIK, K. L., ELIASON, H. C., HOFFMAN, R. L., GIBSON, J. R., KUPCHO, K. R., SOMBERG, R. L., VOGEL, K. W.; "Overcoming compound interference in fluorescence polarization-based kinase assays using far-red tracers". *Assay and Drug Development Technologies*, **2**: 193-203, 2004.
- VEERAPANDIAN, B., COOPER, J. B., SALI, A., BLUNDELL, T. L., ROSATI, R. L., DOMINY, B. W., DAMON, D. B., HOOVER, D. J.; "Direct observation by X-ray analysis of the tetrahedral "intermediate" of aspartic proteinases". *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, **1**: 322-328, 1992.
- WALTERS, R. R.; "Affinity-Chromatography". *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **57**: 1099, 1985.
- WHITESITT, C. A., SIMON, R. L., REEL, J. K., SIGMUND, S. K., PHILLIPS, M. L., SHADLE, J. K., HEINZ, L. J., KOPPEL, G. A., HUNDEN, D. C., LIFER, S. L., BERRY, D., RAY, J., LITTLE, S. P., LIU, X. D., MARSHALL, W. S., PANETTA, J. A.; "Synthesis and structure-activity relationships of benzophenones as inhibitors of cathepsin D". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **6**: 2157-2162, 1996.
- WILLIAMS, S. A., JOHNSTON, D. A., FILARIAL GENOME, P., SCHISTOSOME GENOME, P.; "Helminth genome analysis: the current status of the filarial and schistosome genome projects". *Parasitology*, **118**: S19-S38, 1999.
- WINK, T., VANZUILEN, S. J., BULT, A., VANBENNEKOM, W. P.; "Self-assembled monolayers for biosensors". *Analyst*, **122**: R43-R50, 1997.
- WONG, J. Y. M., HARROP, S. A., DAY, S. R., BRINDLEY, P. J.; "Schistosomes express two forms of cathepsin D". *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1338**: 156-160, 1997.
- YANG, Z., GONZALEZ-CORTES, A., JOURQUIN, G., VIRÉ, J. C., KAUFFMANN, J. M.; "Analytical application of self-assembled monolayers on gold electrodes: critical importance of surface pretreatment". *Biosens. Bioelectron.*, **10**: 789-795, 1995.
- YASUDA, Y., KAGEYAMA, T., AKAMINE, A., SHIBATA, M., KOMINAMI, E., UCHIYAMA, Y., YAMAMOTO, K.; "Characterization of new fluorogenic substrates for the rapid and sensitive assay of cathepsin E and cathepsin D". *J. Biochem.*, **125**: 1137-1143, 1999.
- ZHOU, X., PENG, J. Y., FAN, G. R., WU, Y. T.; "Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase". *Journal of Chromatography A*, **1092**: 216-221, 2005.