

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

**ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA 1:
PURIFICAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E BIOCONJUGAÇÃO**

Fernando Gonçalves de Almeida*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração QUÍMICA ORGÂNICA

Orientador: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass

***Bolsista FAPESP (Processo 2011/00398-9)**

São Carlos – SP
2015

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

A447ec Almeida, Fernando Gonçalves de.
Enzima conversora de angiotensina 1 : purificação,
imobilização e bioconjugação / Fernando Gonçalves de
Almeida. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
87 f.

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

1. Enzimas. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3.
Espectrometria de massa. 4. Atividade enzimática. I. Título.

CDD: 547.758 (20^a)



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Fernando Gonçalves de Almeida, realizada em 22/05/2015:

Prof. Dra. Quezia Bezerra Cass
UFSCar

Prof. Dr. Carlos Bloch Junior
EMBRAPA

Prof. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona
UNIFESP

Prof. Dra. Carmen Lúcia Cardoso
FFCLRP/USP

Prof. Dr. Glaucius Oliva
IFSC/USP

*Dedico esta tese aos meus excepcionais pais, **Herta e José Edson**, amigos do peito, companheiros de luta, camaradas de classe e doutores na vida, que sempre me incentivaram, me orientaram e me apoiaram em todas as decisões da minha vida.*

*A minha eterna esposa, **Claudia**, batalhadora, vencedora, meu alento, fonte de minha alegria e força vital.*

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass**, por sua orientação, dedicação e amizade. Agradeço pela oportunidade de trabalhar em seu grupo e por ter acreditado na minha capacidade que com certeza me proporcionou uma excelente formação profissional.

À **Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza**, pela sua colaboração e ensinamentos em purificação e química de proteínas.

À **Profa. Dra. Regina Vincenzi de Oliveira**, pela sua disposição em me ajudar, pela sua amizade e incentivo.

À **todo corpo técnico e administrativo** do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar.

À **todos os professores** do Departamento de Química da UFSCar.

Aos meus amigos do Laboratório Antonio Pinto Loureiro – Núcleo SEPARARE – Núcleo de Pesquisa em Cromatografia: **Adriana Sales, Amanda Jordano Aquino, Bianca Rebelo Lopes Simões, Gabriel dos Santos Scatena, Juliana Cristina Barreiro, Kenia Lourenço Vanzolini, Marili Villa Nova Rodrigues, Marina Denadai, Neila Maria Cassiano, Paulo Roberto Adalberto e Ricardo da Fontoura Sprengher**. Agradeço a todos pela amizade, incentivo, colaboração e momentos descontraídos durante todos esses anos de convívio.

Ao **Paulo Roberto Adalberto**, pelos conselhos e discussões científicas.

Ao **Alexandre Augusto Cruz**, pela disponibilidade em ajudar com os equipamentos, e pela amizade.

Aos amigos do CEFAP, **Matheus Bonatto, Susan lenne e Tiago Antonio de Souza**, pela amizade, paciência e discussões político-filosófico-científicas.

Ao casal **Alice Beatriz Lopes e Tiago de Campos Lourenço (Zozí)**, pela amizade e companheirismo.

À **Marina Denadai (Marinão) e ao Ricardo Tranquilin (Ricas)**, pela amizade, conselhos e momentos de descontração.

A **Kenia Lourenço Vanzolini**, por sua disposição em ajudar no desenvolvimento do trabalho, e pela amizade.

Aos meus eternos amigos da turma de Química 2002-UFSCar: **Alexandre da Cruz Valeta, Allan Taguchi da Silva, Beatriz da Cruz Gonzalez, Bruno Campos Janegitz, Fernando Campanha Vicentini, Gabriel Cruz de Souza, Inara de Aguiar e Juliana Shiki**, por todos os momentos descontraídos, apoio e alegria, que foram muito importantes para ter conseguido continuar em frente.

Ao adorável casal **Rafael e Gabriela**, por todo o apoio, amizade e dedicação a nós no Brasil e na Suíça.

Aos meus amigos, **Henrique Finocchio, Bruno Perlatti e Gezimar Souza**, pelas boas tardes de futebol e posterior confraternização.

Aos meus cunhados, **Murilo e Rafael**, pelas descontraídas discussões políticas e futebolísticas.

Às minhas queridas cunhadas, **Fernanda e Paula**, pelos momentos tristes que superamos e felizes que comemoramos.

Aos meus sogros, **Luiz Antonio e Meire Aparecida**, pelos ótimos finais de semana de descontração.

À **toda família Rodrigues**, por sempre me ter acolhido no conforto de seu lar.

Aos meus queridos tios **José Luiz e Teresa**, pelo suporte, carinho e proteção.

Aos meus queridos primos **Gabriel e Heloísa**, pela energia contagiante.

Aos meus queridos tios, **Dina e Ricardo**, por todo o apoio, carinho e preocupação.

Aos meus primos-irmãos **Renata e Ricardo**, pelo carinho, amizade, conselhos e por compartilhar momentos importantes de nossas vidas.

Aos meus primos-sobrinhos **Ana Livia, Lucas e Manuela**, pela sua alegria e energia contagiantes.

Aos meus inigualáveis pais, **Herta e José Edson**, por toda a dedicação, apoio, amor e carinho, os quais sempre me fortalecem para encarar todos os obstáculos da vida.

À minha esposa **Claudia Rodrigues**, por sempre estar ao meu lado, me incentivando, apoiando e compartilhando os momentos importantes e decisivos da minha vida.

Ao **CNPq e FAPESP** pelas bolsas fornecidas e apoio financeiro.

Lista de símbolos e abreviaturas

Å	Unidade de Distância (angstrom)
ACE-c	ACE comercial
ACE-p	ACE purificada
ACE1	Enzima Conversora de Angiotensina 1 (<i>Angiotensin Converting Enzyme 1</i>)
ACE2	<i>Angiotensin Converting Enzyme 2</i>
AG I	Angiotensina I
AG II	Angiotensina II
AnCE	ACE homóloga ao domínio C-terminal da ACE
ANPEP	Aminopeptidase N
APTS	3-aminopropil trietoxisilano
AT1	Receptor de angiotensina II tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina II tipo 2
AT3	Receptor de angiotensina II tipo 3
AT4	Receptor de angiotensina II tipo 4
au	Unidades Arbitrarias
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CMA 1	<i>Chymase</i>
ConA	Concanavalina-A
CPA 3	Carboxipeptidase A3
CTS A	Catepsina A
CTS G	Catepsina G
DDA	<i>Data Dependent Acquisition</i>
DEAE	<i>Diethylaminoethyl</i>
DIEA	<i>Diisopropylethylamine</i>
DMF	Dimetilformamida
DTT	Ditiotreitol
ENPEP	Glutamil aminopeptidase
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
eV	Unidade de energia (elétron-volt)
FA	Ácido fórmico

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FET	Filtro de Exclusão por Tamanho
FOSHU	<i>Food for Specified Health Use</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
HA	Ácido hipúrico
HBTU	<i>N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate</i>
HHL	Hippuril – Histidil – Leucina
HOBt	<i>1-hydroxybenzotriazole</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>
IAA	Iodoacetamida
IC ₅₀	<i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i>
IMER	<i>Immobilized Enzyme Reactors</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry</i>
LNPEP	Cistinil aminopeptidase
m/v	Massa/volume
m/z	Massa/carga
mA	Unidade de Corrente (miliampere)
MAS 1	<i>MAS 1 oncogene</i>
MME	Neprilisina
mmol	Unidade de medida
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
mRNA	messenger RNA (<i>Ribonucleic Acid</i>)
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
NCBI _{nr}	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NLN	Neurolisina
NMB	Nanopartículas magnéticas (<i>nanomagnetic beads</i>)
P.A.	Para Análise
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>

Q	Parâmetro de estabilidade de aprisionamento de íons
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TFA	Ácido trifluoracético
THOP 1	<i>Thimet oligopeptidase</i>
Tris	<i>2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol</i>
U.mg ⁻¹	Unidade enzimática
UPLC-MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>
UV	espectrofotometria de ultravioleta
UV-Vís	Ultravioleta Visível
v/v	Volume/volume
V _{max}	Velocidade máxima de reação
K _M	Constante de Michaelis-Mentem

Lista de tabelas

TABELA 1.1 - Estrutura e classes de inibidores da ACE1	9
TABELA 3.1 - Protocolo para gel de resolução	23
TABELA 3.2 - Protocolo para gel de empilhamento	23
TABELA 3.3 - Soluções utilizadas para a revelação por prata	24
TABELA 3.4 - Condições cromatográficas para separação da HA e HHL	25
TABELA 3.5 - Condições cromatográficas	35
TABELA 3.6 - Transições dos compostos utilizados para o ensaio de <i>fishing</i>	36
TABELA 4.1 - Precisão intra-dia (n=3).	42
TABELA 4.2 - Precisão e exatidão intra-dia	43
TABELA 4.3 - Precisão e exatidão inter-dia	43
TABELA 4.4 - Composição das soluções de incubação para teste de atividade .	45
TABELA 4.5 - Soluções utilizadas para o ensaio de atividade	58
TABELA 4.6 - Purificação da ACE1 de 900 g de pulmão bovino	59
TABELA 4.7 - Resultado da identificação da ACE 1 por nanoLC-MS/MS com busca em banco de dados de proteínas	61
TABELA 4.8 - Tabela com as melhores parâmetros encontrados por Cushman e Cheung ⁵⁰ para a atividade da ACE1	62
TABELA 4.9 - Valores de atividade da ACE1 em solução ao longo do tempo e suas respectivas porcentagens	63
TABELA 4.10 - Avaliação da estabilidade dos reatores de ACE1	65
TABELA 4.11 - Valores de K_M encontrados na literatura para ACE1 em solução extraída de diversos organismos.....	69
TABELA 4.12 - Ensaio de inibição em NMB-ACE	70
TABELA 4.13 - Valores de área obtidos para os ensaios de bioconjugação (A1 e A2) e branco (B2)	76

Lista de figuras

FIGURA 1.1 - Esquema do sistema renina-angiotensina, modificada de KEGG PATHWAY Database ¹⁹ . Abreviações: AG I, Angiotensina; AG II, Angiotensina II; AG-(1-7), Angiotensina (1-7); AG-(1-5), Angiotensina (1-5); AG III, Angiotensina III; AG IV, Angiotensina IV; CPA3, Carboxipeptidase A3; ACE2, Enzima conversora de angiotensina 2; CTS A, Catepsina A; CMA 1, <i>Chymase</i> ; CTS G, Catepsina G; ACE, Enzima conversora de angiotensina; NLN, Neurolisina; THOP 1, <i>Thimet oligopeptidase</i> ; MME, Neprilisina; ENPEP, Glutamil aminopeptidase; ANPEP, Aminopeptidase N; LNPEP, Cistinil Aminopeptidase; AT1, Receptor de angiotensina II tipo 1; AT2, Receptor de angiotensina II tipo 2; MAS 1, <i>MAS 1 oncogene</i>	4
FIGURA 1.2 - Ilustração do mecanismo comparativo de carboxipeptidase A e ACE1 ²³	6
FIGURA 1.3 - Mecanismo catalítico para a hidrólise de HHL proposto por Zhang et al ¹⁴	7
FIGURA 1.4 - Entorno cristalográfico da interação do captopril com a AnCE ²⁴	8
FIGURA 1.5 - Modelo de inibição da ACE1 pelo peptídeo TPTQQS proposto por Ni et al ³¹	10
FIGURA 4.1 - Reação catalisada pela ACE1.	39
FIGURA 4.2 - Cromatograma de separação de HA e HHL na coluna C ₈ (15 x 0,46 cm, Hypersil, 5 µm, 100 Å), vazão 0,8 mL.min ⁻¹ e λ = 230 nm. Condições de análise: 0 – 6 min 7 % CH ₃ OH/CH ₃ CN (1:1) (isocrático); 6 – 8 min 85 % CH ₃ OH/CH ₃ CN (1:1) (gradiente); 8 – 12 min 85 % CH ₃ OH/CH ₃ CN (1:1) (isocrático); 12 – 14 min 7 % (gradiente); 14 – 19 min 7 % (isocrático).	40
FIGURA 4.3 - Cromatograma comparativo para a precipitação da mistura de incubação da ACE1 com diferentes solventes — Isopropanol, — CH ₃ OH e — CH ₃ CN.....	41
FIGURA 4.4 - Procedimento de extração de ACE1 a partir de pulmão bovino. ...	44
FIGURA 4.5 - Cromatograma comparativo da análise da atividade de três diferentes alíquotas do processo de extração da ACE1.....	45
FIGURA 4.6- Cromatograma de purificação de uma amostra de 1 mg.mL ⁻¹ de extrato de ACE1 em uma coluna DEAE e o perfil de atividade das frações coletadas.....	46

FIGURA 4.7 - Cromatograma de purificação de uma amostra de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de extrato de ACE1.....	47
FIGURA 4.8- SDS-PAGE após a purificação pela coluna DEAE.....	48
FIGURA 4.9 - SDS-PAGE para três diferentes concentrações de extrato de ACE1 pós filtração com filtros de <i>cutoff</i> de 100 kDa.....	49
FIGURA 4.10 - Cromatogramas obtidos para a determinação da concentração do extrato ACE1 para filtração. a) Cromatogramas comparativos de HA formado a partir de diferentes concentrações de extrato ACE1. b) Cromatogramas comparativos da formação de HA antes e depois da filtração.....	50
FIGURA 4.11 - Cromatograma de purificação de 500 mg de extrato de ACE1 na coluna de ConA.....	51
FIGURA 4.12 - Cromatograma da atividade das frações eluídas da coluna de ConA.....	52
FIGURA 4.13 - Gel de SDS-PAGE de uma solução de 1 mL.min^{-1} de ACE1 pós coluna de ConA.....	53
FIGURA 4.14 – Cromatogramas da atividade de diferentes etapas de purificação da ACE1.....	53
FIGURA 4.15 - Cromatogramas das atividades das frações eluídas a partir da coluna de Sepharose-Lisinopril.....	55
FIGURA 4.16 - SDS-PAGE com revelação por prata das frações eluídas da coluna Sepharose-Lisinopril.....	55
FIGURA 4.17 - Cromatogramas das atividades das frações eluídas a partir da coluna de Sepharose-lisinopril após limpeza com FET.....	56
FIGURA 4.18 - Gel de SDS-PAGE com revelação por prata das fração 9 e 10 eluídas da coluna Sepharose-lisinopril.....	57
FIGURA 4.19 - Cromatogramas para as diferentes ensaios de atividade.....	58
FIGURA 4.20 – Cromatogramas ilustrando a formação de HA para os ensaios de atividade em cada etapa de purificação.....	59
FIGURA 4.21 - Cromatogramas da atividade da ACE1 ao longo de 24 horas em tampão fosfato 100 mmol.L^{-1} , pH 8,3.....	63
FIGURA 4.22 - Funcionalização das partículas nanomagnéticas.....	64
FIGURA 4.23 - Formação de HA (nmol.L^{-1}) em relação ao tempo de incubação para os reatores enzimáticos ACE-p e ACE-c.....	65

FIGURA 4.24 - Curvas de K_M para os reatores com a) ACE1 Purificada e b) ACE1 Comercial.	67
FIGURA 4.25 - Curva de K_M para o reator NMB-ACE-ConA.....	68
FIGURA 4.26 - Gráfico de IC_{50} para NMB-ACE-ConA.	71
FIGURA 4.27 - Cromatograma de íons extraídos para a) angiotensina II e b) angiotensina I.....	72
FIGURA 4.28 - Cromatograma de íons extraídos para o lisinopril.	74
FIGURA 4.29 - Cromatogramas extraídos para os íons monitorados para os peptídeos AEFVEVTK, YLYEIAR e LVNELTEFAK.	76

RESUMO

“ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA 1: PURIFICAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E BIOCONJUGAÇÃO”

Enzima conversora de angiotensina 1 (*angiotensin converting enzyme 1*, ACE1) é uma dipeptidil carboxipeptidase que catalisa a reação para conversão da angiotensina I, um decapeptídeo inativo, para angiotensina II, um octapeptídeo vasoconstritor. Assim, a ACE1 exerce um papel essencial na regulação da pressão arterial e tratamento de hipertensão. Existem diversos inibidores de ACE1 sintéticos disponíveis comercialmente, como captopril, lisinopril e enalapril. No entanto, o uso contínuo desses fármacos pode causar diversos efeitos adversos como falência renal, hipotensão e hipercalemia. Devido a isso, inibidores de ACE1 de origem natural tem sido prospectados. Com o objetivo de contribuir para esse campo de pesquisa, neste trabalho foi desenvolvido uma ferramenta para a busca de ligantes de ACE1. Para isso, a ACE1 foi extraída de pulmão bovino e subseqüentemente purificada com o auxílio de filtros de exclusão por tamanho e mais duas etapas de cromatografia de afinidade. Para acompanhar o processo de purificação, ensaios de atividade utilizando o substrato sintético hipuril-histidil-leucina (HHL) foram estabelecidos, e foi desenvolvido um método cromatográfico para suas análises, através do monitoramento do ácido hipúrico (HA), produto da reação catalisada. Após a sua purificação, a ACE foi quimicamente imobilizada em partículas nanomagnéticas (NMB-ACE), que permitiu a realização de ensaios enzimáticos para a sua caracterização, obtendo-se um comportamento michaeliano para o substrato HHL. Além disso, a especificidade do reator enzimático foi testado frente a seu substrato natural e testes de inibição com o lisinopril foram realizados, obtendo um valor de IC_{50} próximo ao encontrado para a enzima livre. Por fim, a seletividade do reator enzimático foi avaliada pelo ensaio de bioconjugação, resultando na pesca de 3 peptídeos presente em uma mistura de mais de 100 peptídeos. Sendo assim, os estudos apresentados nesse trabalho confirmam o estabelecimento do NMB-ACE como uma ferramenta para a busca de ligantes de ACE em misturas complexas.

ABSTRACT

“ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME 1: PURIFICATION, IMMOBILIZATION AND BIOCONJUGATION”

Angiotensin converting enzyme 1 (ACE1) is a dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I (decapeptide) to a vasoconstrictor octapeptide angiotensin II. Thus, ACE presents an important role in blood pressure regulation. There are many synthetic commercially available ACE inhibitors such as captopril, lisinopril and enalapril. Due to their side effects, naturally occurring inhibitors have been prospected. In order to endorse this research field we have developed a new tool for ACE ligand screening. To this end, ACE was extracted from bovine lung, purified and chemically immobilized in modified ferrite magnetic beads (ACE-MBs). The ACE-MBs have shown a Michaelian kinetic behavior towards hippuryl-histidyl-leucine (HHL) and was also able to catalyze the conversion of angiotensin I to angiotensin II. Moreover, as proof of concept, the ACE-MBs was inhibited by lisinopril with an IC₅₀ of 10 nM. At the fishing assay, ACE-MBs were able not only to fish out the reference inhibitor, but also three peptides from a pool of tryptic digested BSA. ACE-MBs emerge as new straightforward tool for ACE kinetics determination, inhibition and binder screening.

Sumário

1	Introdução.....	1
1.1	- Enzima conversora de angiotensina 1	1
1.2	- ACE1 e sua importância biológica.....	3
1.3	- ACE e sua inibição	5
1.4	- Obtenção da ACE1	11
1.4.1	- Extração/Purificação da ACE1.....	12
1.5	- Ensaios de atividade/inibição da ACE1 e métodos analíticos	14
1.6	- Imobilização de enzimas	15
2	- Objetivos.....	19
3	- Procedimento Experimental.....	20
3.1	- Equipamentos e Reagentes	20
3.2	- Extração e purificação da ACE1 a partir de pulmão bovino	21
3.3	- Avaliação da quantidade proteica do extrato	22
3.4	- Monitoramento da purificação por SDS-PAGE.....	22
3.4.1	- Revelação do SDS-PAGE por coloração com prata	23
3.5	- Desenvolvimento do método analítico para avaliação da atividade da ACE1.....	25
3.6	- Ensaio enzimático em solução com o extrato de ACE1	25
3.7	Purificação da ACE1 por cromatografia de troca aniônica (DEAE)	26
3.8	- Purificação do extrato de ACE1 por filtros de exclusão por tamanho (FET)	26
3.9	- Purificação do extrato de ACE1 por cromatografia de afinidade por glicosilação	27
3.10	- Purificação da enzima ACE1 por cromatografia de afinidade com resina Sepharose-lisinopril.....	27
3.10.1	- Síntese da resina Sepharose-lisinopril.....	27
3.10.2	- Cromatografia de afinidade por Sepharose-lisinopril	28
3.11	- Identificação da ACE1 por LC-MS/MS	29

3.11.1	- Digestão da ACE1	29
3.11.2	- Análise por LC-MS/MS para a identificação da ACE1	29
3.12	- Síntese de nanopartículas magnéticas (NMB) e imobilização da ACE1 30	
3.12.1	- Síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	30
3.12.2	- Recobrimento da superfície da NMB e Imobilização da ACE1	31
3.13	- Ensaio de atividade da ACE1 imobilizada em NMB (NMB-ACE1)	32
3.14	- Ensaio de inibição em NMB-ACE	33
3.15	- Ensaio de <i>fishing</i> e ensaio de atividade com substrato natural da ACE1 utilizando NMB-ACE	33
3.15.1	- Ensaio de bioconjugação (<i>Fishing</i>)	33
3.15.2	- Ensaio de atividade do NMB-ACE frente ao seu substrato natural	34
3.15.3	- Análise por LC-MS/MS para o ensaio de atividade e <i>fishing</i> da NMB-ACE	34
4	- Resultados e Discussão	39
4.1	- Desenvolvimento e validação do método analítico para avaliação da atividade da ACE1	39
4.2	- Obtenção da ACE1 e avaliação de sua atividade	43
4.2.1	- Extração e precipitação com sulfato de amônio.....	43
4.2.2	- Purificação da ACE1 por cromatografia de troca aniônica (DEAE)..	46
4.2.3	- Purificação do extrato de ACE1 utilizando filtros de exclusão por tamanho (FET).....	49
4.2.4	- Purificação por cromatografia de afinidade por sítios de glicosilação na resina de Concanavalina-A (ConA)	51
4.2.5	- Purificação da fração pós-Con A por cromatografia de afinidade na resina de Sepharose-Lisinopril	54
4.3	- Identificação da ACE1 por nanoLC-MS/MS	60
4.4	- Avaliação da estabilidade da enzima em possíveis condições de imobilização	62
4.5	- Imobilização da ACE1 em partículas nanomagnéticas e sua atividade .	64

4.6 - Avaliação da atividade dos reatores NMB-ACE e determinação de suas propriedades cinéticas	66
4.7 - Ensaio de inibição utilizando NMB-ACE.....	70
4.8 - Ensaio de atividade utilizando substrato natural da ACE1	72
4.9 - Ensaio de bioconjugação (<i>fishing</i>) utilizando NMB-ACE	73
5 – Conclusão.....	78
6 Referências Bibliográficas	80

1 Introdução

1.1 - Enzima conversora de angiotensina 1

A enzima conversora de angiotensina 1 (EC 3.4.15.1, ACE1, do inglês *Angiotensin Converting Enzyme*) foi isolada, pela primeira vez, em 1956 por Skeggs et al¹ com o nome de “*hypertensin converting enzyme*”. Ela é classificada com sendo uma peptidase, assim denominada pela sua capacidade de clivagem de peptídeos nas suas ligações peptídicas. As proteases são divididas em cinco grandes grupos de acordo com a natureza química dos grupos responsáveis pela sua atividade catalítica, sendo: serina proteases, cisteína proteases, ácido aspártico proteases, metaloproteases, e proteases com mecanismos de catálise desconhecidos². Desta maneira, a ACE1 pertence a família das metaloprotease, mais especificamente sendo uma zinco-metaloprotease, devido a presença de um átomo de zinco no seu sítio ativo sendo complexado pelo motivo proteico HEXXH, pela atuação de duas histidinas e um glutamato³. Além disso, ela é classificada como uma ecto-enzima (exoenzima), pois apresenta a maior parte de sua sequência, incluindo os seus sítios ativos, localizados na parte externa na superfície celular.

Desta forma, apenas uma pequena fração da sua região C-terminal encontra-se tanto na parte interna da célula, como na sua membrana⁴. Por outro lado, a sua região N-terminal extracelular dispõe de dois grandes domínios, denominados de domínio C e domínio N. Esses domínios apresentam os seus próprios sítios catalíticos ativos^{5,6} e também um alto grau de similaridade interna (aproximadamente 55% para a sACE humana), sugerindo que a ACE1, em termos evolutivos, é resultado de uma duplicação gênica⁶.

O gene da ACE1 codifica duas isozimas, sendo somática e testicular, com massa molecular de 150 kDa e 84 kDa, respectivamente. Na literatura, ainda não há um consenso com relação a origem das duas, no entanto Howard et al⁷ afirma que é devido a ação de dois promotores distintos enquanto que Sen et al⁸ atribuem ao *splicing alternativo*. A ACE1 somática é largamente distribuída e é produzida, majoritariamente, nos pulmões e rins por diversas células somáticas, incluindo endotélio vascular, epitélio de túbulo renal, epitélio intestinal⁹ e células neurais¹⁰. A ACE1 testicular é produzida apenas pelas células

testiculares e são encontradas nos espermatozoides, apresentando um papel essencial para a fertilidade¹¹.

A isoforma mais conhecida e estudada é a somática, devido a sua maior abundância por toda e extensão do organismo de estudo. Ela está presente em diversos organismos eucariotos e principalmente entre mamíferos nos quais a sua semelhança, na sequência de aminoácidos, chega a ser maior que 83%⁹, como é no caso entre humanos, camundongos, ratos e coelhos.

Mais do que diferença entre aminoácidos, a diferença nas modificações pós traducionais, se apresenta como um fator determinante para atividade da enzima. Modificação pós-traducional é o processo de maturação de uma proteína para que ela possa exercer a sua função. Este processo ocorre após a tradução do mRNA em uma cadeia polipeptídica pelo ribossomo. A transformação de uma cadeia polipeptídica em uma estrutura tridimensional inicia no retículo endoplasmático, mas é no complexo de Golgi que a maioria das modificações químicas são realizadas. Glicosilação, fosforilação e acetilação são apenas algumas das modificações que podem ocorrer. As modificações pós-traducionais são mecanismos essenciais utilizados por células eucarióticas para diversificar as estruturas de suas proteínas, bem como as suas funções. Neste contexto, a ACE1 é uma proteína que apresenta como sua principal modificação pós-traducional a glicosilação e sua forma pode ser variável de acordo com o organismo, por exemplo a ACE1 humana apresenta 17 possíveis sítios de N-glicosilação, enquanto que sua homóloga em coelho, ratos, e camundongo apresentam, 11, 14 e 13, respectivamente.

Em um estudo realizado por Hooper et al¹², foi isolado a ACE1 de porco de diferentes órgãos, rim e cérebro e foi observado uma diferença nas suas massas moleculares 180 kDa e 170 kDa, respectivamente. Após a sua deglicosilação, foi observado que ambas as ACEs apresentaram a migração em um gel de SDS-PAGE de forma semelhante tendo uma proteína de massa molecular aparente de 150 kDa. Neste estudo, foi observado, pela primeira vez, um padrão diferente de glicosilação para a “mesma” ACE1.

Ainda não se sabe ao certo o papel exercido da glicosilação na ACE1, no entanto, um estudo realizado por Baudin et al¹³ demonstrou que a solubilidade da ACE1 é maior quando glicosilada. Além disso, não se pode

descartar a relevância do seu papel, uma vez que a sua de-glicosilação causou uma diminuição da sua atividade catalítica em 30%.

Mais recentemente, através de simulações computacionais, Zhang et al¹⁴ demonstraram a importância do íon cloreto na atividade da ACE1, apesar de não observarem nenhuma alteração no padrão de interação entre a enzima e o substrato.

Desta forma, a ACE1, assim como todas as ecto-enzimas, aparecem como importantes alvos biológicos para o tratamento de diversas patologias, pois devido a sua localização celular, participam de diversos processos para a regulação celular.

1.2 – ACE1 e sua importância biológica

Fisiologicamente, a ACE1 atua no sistema renina-angiotensina-aldosterona e exerce um papel essencial na regulação da pressão sanguínea e dá uma resposta vascular a traumas físicos ao organismo. Este sistema complexo de interações neuroendócrinas protege o coração, endotélio, encéfalo e rins fora das condições fisiológicas normais. No entanto, a ativação crônica desse sistema leva à hipertensão e promove efeitos associados à inflamação, trombose e aterosclerose. Portanto, o sistema renina-angiotensina-aldosterona é um importante alvo terapêutico para o controle da hipertensão¹⁵.

A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona se dá quando o volume de sangue do organismo é baixo e os rins começam a liberar renina, enzima que catalisa a clivagem de angiotensinogenênio (proteína que é liberada pelo fígado e cai na corrente sanguínea), convertendo-a em angiotensina I (AG I). Esta por sua vez é catalisada pela ACE1 sendo convertida em angiotensina II (AG II). A Ang II age via receptores específicos dos quais 4 (AT1-4) foram identificados até o momento. Os efeitos patológicos são mediados principalmente via receptor AT1 tendo como resultado a retenção de sódio, liberação de aldosterona, fibrose, proliferação celular, formação de superóxidos, inflamação, trombose e vaso constrição. A ativação do receptor AT2, em contrapartida, tem um efeito benéfico de vaso dilatação e diminui a proliferação celular, apesar de promover apoptose. Os efeitos associados a ativação do receptor AT3 ainda permanecem desconhecidos e a ativação do receptor AT4 mede a liberação de inibidor de ativação de plasmina-1 (PAI-1, do inglês

plasminogen activator inhibitor-1), o principal mediador de trombose, sugerindo que a ativação desse receptor leve a uma condição pró trombótica¹⁶. O funcionamento do sistema se torna ainda mais complexo com a atuação da enzima conversora de angiotensina-2 (ACE2, do inglês *angiotensin converting enzyme 2*) que hidrolisa a AG II para formar a angiotensina 1-7¹⁷ e converte a Ang I em angiotensina 1-9¹⁸. A FIGURA 1.1 ilustra o sistema renina-angiotensina-aldosterona e seus componentes.

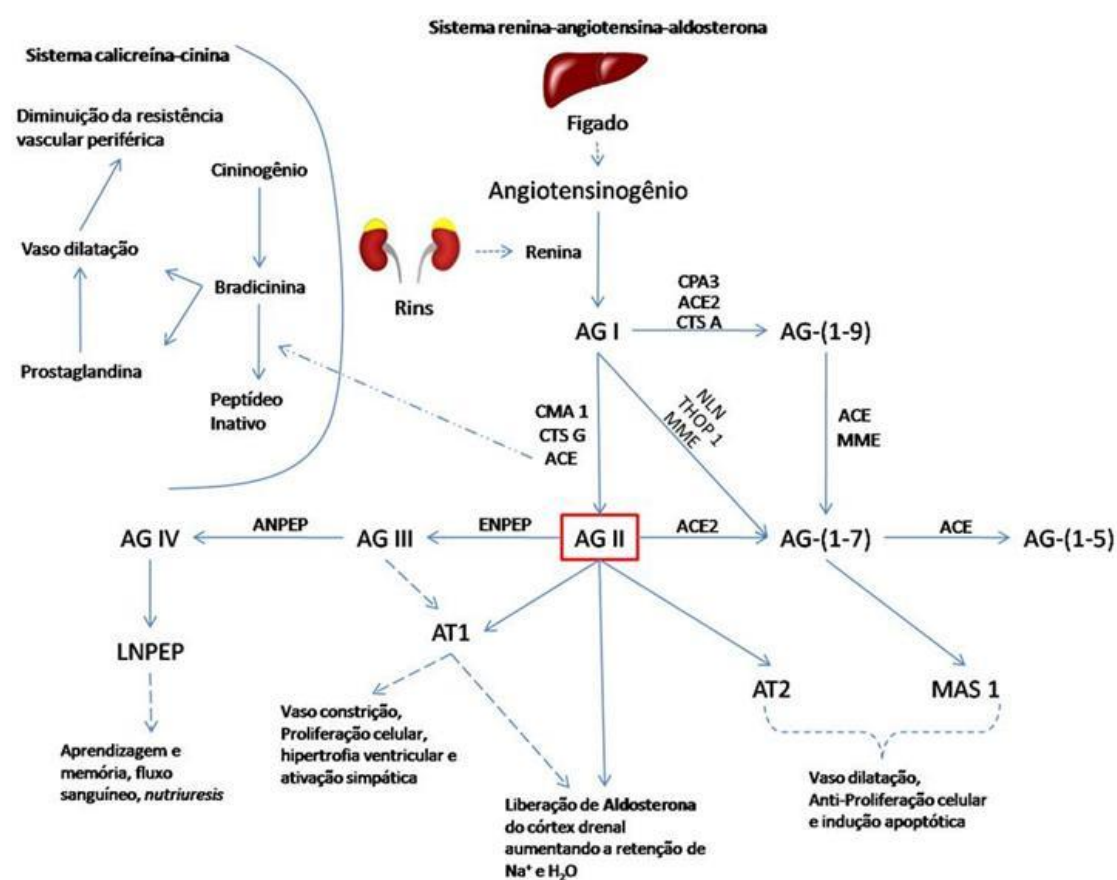


FIGURA 1.1 - Esquema do sistema renina-angiotensina, modificada de KEGG PATHWAY Database¹⁹. Abreviações: AG I, Angiotensina; AG II, Angiotensina II; AG-(1-7), Angiotensina (1-7); AG-(1-5), Angiotensina (1-5); AG III, Angiotensina III; AG IV, Angiotensina IV; CPA3, Carboxipeptidase A3; ACE2, Enzima conversora de angiotensina 2; CTS A, Catepsina A; CMA 1, *Chymase*; CTS G, Catepsina G; ACE, Enzima conversora de angiotensina; NLN, Neurolisina; THOP 1, *Thimet oligopeptidase*; MME, Neprilisina; ENPEP, Glutamil aminopeptidase; ANPEP, Aminopeptidase N; LNPEP, Cistilil Aminopeptidase; AT1, Receptor de angiotensina II tipo 1; AT2, Receptor de angiotensina II tipo 2; MAS 1, *MAS 1 oncogene*.

O principal responsável pela vaso constrição e aumento da pressão arterial é a AG II uma vez que, agindo via receptor AT1 estimula a liberação de aldosterona a partir do córtex adrenal provocando a retenção de Na⁺ e água. Além da AG II, a ACE também tem uma contribuição indireta sobre o aumento da pressão sanguínea, pois além de responsável pela conversão da AG I em AG II, participa do sistema caliceína-cinina convertendo a bradicinina, que ajuda na vaso dilatação, em um peptídeo inativo²⁰.

Neste sentido, a inibição da ACE1 tem sido alvo de diversos fármacos, pois promove uma série de efeitos cascata, como o aumento de bradicinina e prostaglandinas no sistema caliceína-cinina, resultando na diminuição do efeito vaso constritivo da AG II.

1.3 - ACE e sua inibição

Em meados dos anos 60, o farmacologista britânico John Vane estava investigando a fundo a causa da hipertensão. Na mesma época, o brasileiro Sergio H. Ferreira, na época um aluno de pós doutorado, juntou-se ao grupo de pesquisa de Vane trazendo consigo extratos peptídicos de veneno de *Bothrops jararaca* que ele já provara ter um efeito potencializador na atividade da bradicinina²¹. Com isso em mente, Vane solicitou ao seu aluno que testasse esses peptídeos na ACE1 e assim acabaram descobrindo o efeito inibidor desses peptídeos sobre a ACE1, levando a Vane demonstrar seu interesse pelo tratamento da hipertensão através da inibição da ACE1. Vane era professor de farmacologia experimental no *Institute of Basic Medical Sciences* no *Royal College of Surgeons*, na Inglaterra e consultor na área de pesquisa e desenvolvimento da empresa farmacêutica americana Squibb & Sons (atualmente, Bristol-Myers Squibb). Vane apresentou ao vice presidente da empresa (Charles G. Smith) e aos seus pesquisadores (David Cushman e Miguel Ondetti) a ideia de inibição da ACE para o controle da hipertensão e finalmente em 1975, o captopril, primeiro inibidor via oral de ACE, foi produzido para o tratamento de hipertensão, deixando a sua marca na história como sendo o primeiro medicamento de 1 bilhão de dólares produzido pela Bristol-Myers Squibb²².

molécula de água. A molécula de água interage, por uma ligação de hidrogênio, com outro resíduo de ácido glutâmico. A presença do motivo proteico HEXXH é essencial para que haja a complexação do átomo de zinco e conseqüentemente a sua atividade catalítica. A FIGURA 1.3 mostra o mecanismo de hidrólise do substrato HHL.

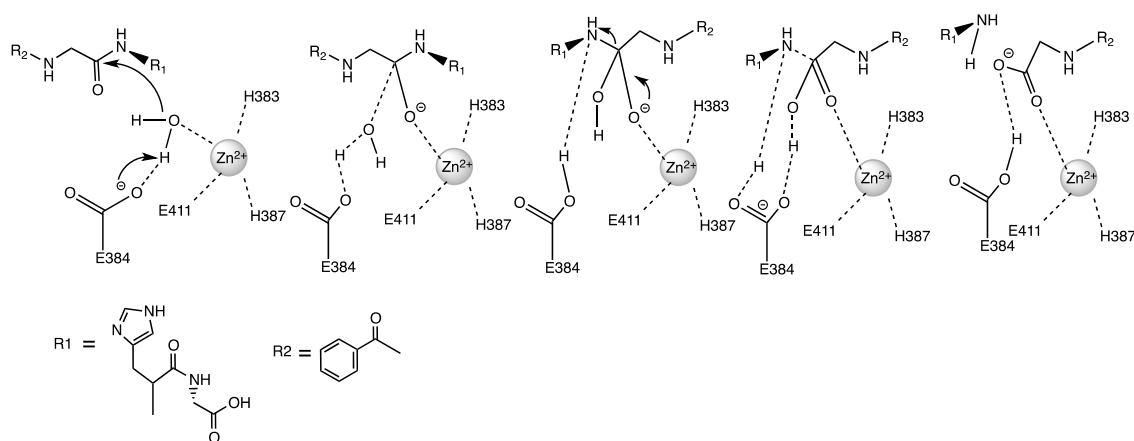


FIGURA 1.3 - Mecanismo catalítico para a hidrólise de HHL proposto por Zhang et al¹⁴.

Com o avanço tecnológico das técnicas de cristalografia por difração de raios X foi possível ter uma ideia melhor da conformação do sítio ativo da ACE1 e como seus diferentes inibidores se encaixam na sua cavidade. Akif et al²⁴ determinaram as estruturas cristalográficas do sítio ativo da AnCE, uma ACE1 homóloga ao domínio C-terminal da ACE1, com diferentes inibidores. Neste trabalho foi possível confirmar algumas das interações no mecanismo de inibição do captopril proposto por Cushman et al²³, como a interação entre o grupo tiol com o átomo de zinco e a interação de um resíduo positivamente carregado da ACE1 (um resíduo de lisina) com a extremidade C-terminal do inibidor. FIGURA 1.4 mostra o entorno cristalográfico da interação da ACE1 com o captopril. Além dessas interações, o átomo de oxigênio do grupo carbonila, interage fortemente por ligação de hidrogênio com dois resíduos distintos de histidina. Ainda, a interação da região C-terminal do captopril é mediada por uma molécula de água com um resíduo de ácido glutâmico e outro de asparagina.

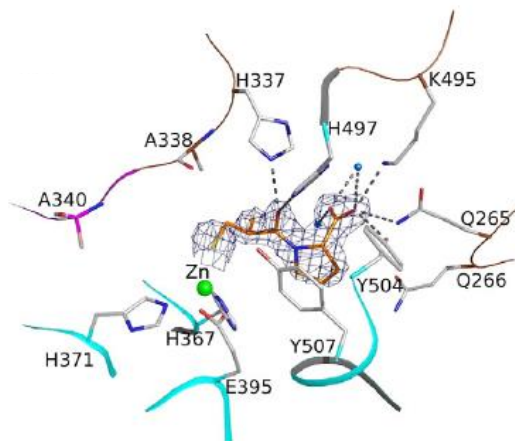


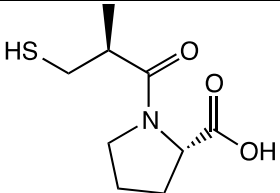
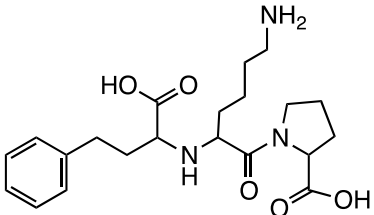
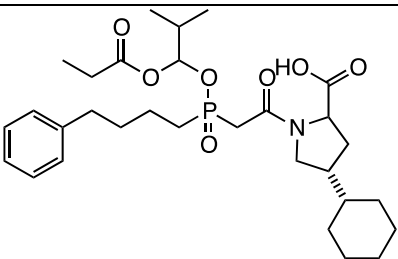
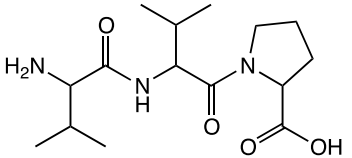
FIGURA 1.4 - Entorno cristalográfico da interação do captopril com a AnCE²⁴.

Apesar da aprovação do captopril para o tratamento de hipertensão pelo FDA (Food and Drug Administration, USA) em 1981, ele apresentava algumas adversidades. O captopril é administrado via oral e cerca de 70% do medicamento é rapidamente absorvido e sua biodisponibilidade é ainda menor na presença de alimentos no trato gastrointestinal. Devido a presença do grupo tiol em sua estrutura, no sangue ele se liga rapidamente a albumina e outras proteínas plasmáticas e com outros compostos endógenos que tenham grupos tiol (cisteína e glutatona) formando ligações dissulfeto, resultando em um tempo de meia vida relativamente curto²⁵.

Devido ao baixo perfil farmacocinético, o captopril deve ser administrado duas ou três vezes ao dia e seu uso contínuo pode resultar no acúmulo do fármaco no organismo pela formação de ligações dissulfetos causando reações cutâneas e alterações no paladar²⁶.

Na tentativa de criar inibidores da ACE1 que apresentassem menos efeitos colaterais, novas classes de inibidores foram desenvolvidas²⁷. Sendo assim, atualmente contamos com quatro principais categorias de inibidores da ACE1: inibidores contendo grupos tiois (-SH); inibidores contendo grupos dicarboxilatos (-COOH); inibidores contendo grupos fosfitos (PO₂R₂); inibidores naturais (di e tripeptídeos). Na TABELA 1.1, um medicamento de cada classe de inibidor de ACE1 é apresentada.

TABELA 1.1 - Estrutura e classes de inibidores da ACE1

Nome	Estrutura	Classe	Descrição/Característica
Captopril ²⁵		Tiol	Foi o primeiro inibidor de ACE1 sintético produzido. Baixa biodisponibilidade.
Lisinopril ²⁸		Carboxílico	Começou a ser utilizado no início da década de 90. Possui maior tempo de meia vida que o captopril.
Fosinopril ²⁹		Fosfito	Começou a ser utilizado no final na década de 90. É um pró-fármaco e possui grupos hidrofóbicos que resultam em uma maior biodisponibilidade.
VPP ³⁰		Peptídeo Natural	Um inibidor natural de ACE1 produzido por organismos próbióticos.

A substituição do grupo tiol pelo grupo carboxílico, para interagir com o átomo de zinco na cavidade da ACE1, fez com que o lisinopril, e outros compostos da mesma classe, apresentassem uma melhor farmacocinética com uma maior biodisponibilidade. Da mesma forma, através do desenvolvimento racional, surgiu o pró-fármaco fosinopril. No entanto, até o momento, todos os inibidores da ACE1, comercialmente disponíveis, apresentam efeitos colaterais conhecidos.

Paralelamente ao desenvolvimento de novos inibidores de ACE1 sintéticos, a busca por inibidores de ACE1 de origem natural sempre ocorreu. Motivada pela ideia de que o primeiro inibidor de ACE é de origem natural (veneno de *Bothrops jararaca*) e que estes poderiam causar menos efeitos adversos, diversos trabalhos tem sido desenvolvidos nesse sentido.

Em um trabalho recente, Ni et al³¹ purificaram um hexapeptídeo (Thr-Pro-Thr-Gln-Gln-Ser/TPTQQS) de *Saccharomyces cerevisiae* e após confirmarem a sua capacidade inibidora de ACE1, fizeram estudos para determinar o mecanismo de inibição desse peptídeo. O mecanismo proposto pelos autores está apresentado na FIGURA 1.5.

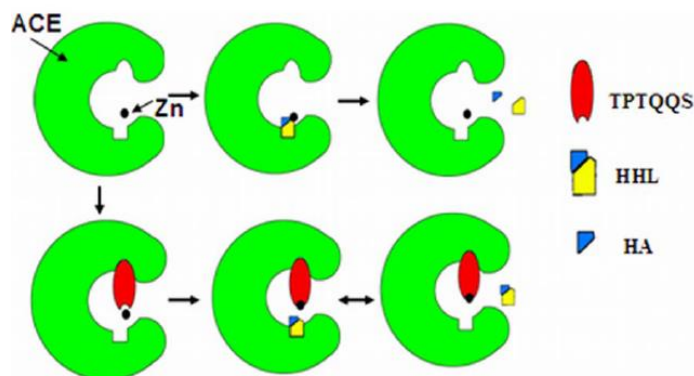


FIGURA 1.5 - Modelo de inibição da ACE1 pelo peptídeo TPTQQS proposto por Ni et al³¹.

O modelo proposto de inibição é baseado na remoção do átomo de zinco do sítio ativo, fazendo com que o substrato não se encaixe perfeitamente na cavidade do sítio ativo para ser clivado, resultando em um mecanismo de inibição não-competitivo. Mais estudos deverão ser realizados para a comprovação desse mecanismo proposto, no entanto, se tomarmos como um mecanismo geral para inibição de ACE1 por peptídeos, podemos explicar o grande interesse pela busca desses inibidores naturais para a ACE1.

Apesar de proteínas e peptídeos serem consideradas apenas fontes de nutrientes, fornecedores de aminoácidos, Gardner³² postulou que peptídeos produzidos durante a digestão de um alimento podem entrar na circulação na sua forma intacta e atingir tecidos periféricos nos quais eles poderiam exercer atividades biológicas, como estimulação do sistema imunológico³³, atividades antimicrobianas, regulação do trato gastro-intestinal, crescimento celular³⁴ e atividade anti-hipertensiva³⁵.

Peptídeos que estão presentes na sequência de uma proteína que quando liberados pela ação de proteases exerce algum tipo de função biológica são chamados de peptídeos bioativos encriptados^{36,37}.

Cogumelos³⁸, soja³⁹, peixes^{40,41}, derivados de queijo⁴² e derivados de leite^{43,44,45} tem sido reportados por apresentarem peptídeos inibidores de ACE1.

O alimento que mais se destaca por apresentar uma grande quantidade de peptídeos hipotensivos é o leite. Em termos proteicos o leite bovino é composto de 80% de caseínas e 20% de *whey proteins* (proteínas do soro do leite). As principais caseínas encontradas são α S1-, α S2- β - e κ -caseína. As principais *whey proteins* encontradas são β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina serica bovina, imunoglobulinas e peptona de proteose⁴⁶.

Em sua revisão, Saito⁴⁷ mostra uma grande lista de peptídeos hipotensivos e inibidores de ACE1 que são liberados através de diferentes processos como fermentação e/ou proteólise utilizando uma ou mais proteases. Como destaque, os peptídeos ND, VPPIPP, FFVAPFEVFGK já estão sendo incorporados a alimentos em diversos países como Japão, EUA, Holanda, França e Finlândia. Estes alimentos enriquecidos com substâncias bioativas são conhecidos como FOSHU (do inglês, *Food for Specified Health Use*).

Há uma grande discussão na literatura sobre a biodisponibilidade desses peptídeos^{48,49}, após serem ingeridos, para serem absorvidos pelo organismo e exercer a função biológica desejada. No entanto, por hora vale mencionar que a busca por inibidores de ACE1 em alimentos, bem como a sua funcionalização (enriquecimento) é um campo a ser explorado para que haja uma alternativa complementar ao tratamento da hipertensão. Deve ficar claro, que uma alimentação saudável, rica em peptídeos obtidos naturalmente pela ingestão de alimento, deva se somar ao tratamento convencional. Enquanto isso, uma dieta balanceada pode ajudar a controlar a pressão arterial e talvez até prevenir o desenvolvimento da doença.

1.4 - Obtenção da ACE1

Devido ao alto valor agregado da ACE1, em torno de U\$ 2000 por unidade de enzima (30 μ g de proteína), muitos pesquisadores desenvolvem as próprias maneiras para obtenção da ACE1. As duas maneiras mais convencionais são a extração/purificação a partir de um tecido e a outra seria a expressão dessa proteína. Para ambas maneiras de adquirir a proteína de interesse existem vantagens e desvantagens.

A expressão pode demandar mais tempo devido ao ajuste das condições de extração do mRNA e replicação, além do que, muitas vezes é difícil fazer a proteína ser secretada da célula, o que levaria a realização de uma etapa adicional de extração/purificação. Além disso, a ACE apresenta diversos sítios de glicosilação que podem contribuir para a sua estrutura secundária ou terciária, sem isso a sua expressão resultaria em apenas proteína sem atividade enzimática.

A extração/purificação pode demandar menos tempo e a proteína pode ser obtida em grandes quantidades, na escala de miligrama. Por outro lado, durante o processo essa proteína pode ser facilmente denaturada e sua estrutura quaternária e terciária alterada, comprometendo a sua atividade.

1.4.1 - Extração/Purificação da ACE1

O primeiro trabalho envolvendo a extração da ACE1 foi reportado em 1971, por Cushman e Cheung⁵⁰. Os autores utilizaram o extrato do pulmão de coelho, após a extração com acetona, como fonte de ACE1 e desenvolveram um ensaio espectrofotométrico para avaliação de sua atividade.

Em 1972, Dorer et al⁵¹ extraíram a ACE1 a partir de pulmão suíno. O procedimento consistiu em duas etapas de precipitação com sulfato de amônio e mais três etapas cromatográficas. Após o extenso procedimento, os autores obtiveram apenas 0,4 mg de ACE1, um baixo rendimento, uma vez que eles partiram de 1 kg de pulmão.

Em 1978, Hayakari et al⁵² utilizaram 250 – 300 g de pulmão de rato para a extração da ACE1. O procedimento consistiu na adição de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ ao pulmão previamente homogeneizado. O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante coletado, servindo como fonte de ACE1 para o desenvolvimento de um método espectrofotométrico, com auxílio de um reagente colorimétrico, para, medir a atividade enzimática. Um ano depois, Chiknas fez a extração de ACE a partir de plasma humano⁵³.

Em 1982 Hara et al⁵⁴ fizeram a extração de ACE1 a partir das peles de camundongo e humana utilizando Triton X-100 e deoxicolato de sódio como detergentes e obteve não só uma melhor solubilização da ACE1, bem como uma maior atividade para o detergente Triton X-100. Foi observado que deoxicolato de sódio diminuía a atividade enzimática.

Pantoliano et al⁵⁵ extraíram ACE1 de pulmão de coelho e em seguida fizeram a sua purificação em apenas três etapas: solubilização com detergente, fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade. Para a última etapa de purificação, os autores modificaram a superfície da resina Sepharose com um inibidor de ACE1, N-[1(S)-carboxi-5-aminopentil]-L-Phe-Gly. Foi observado um aumento significativo na atividade específica em relação a etapa anterior.

Takeuchi et al⁵⁶ obtiveram a ACE1 a partir de pulmão humano. 180 g de pulmão humano foram utilizados para a extração da ACE1. O tecido foi suspenso em 3 volumes de tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,4, homogeneizado e centrifugado. O sobrenadante foi retirado e o precipitado coletado. O precipitado foi resuspenso no mesmo tampão contendo 0.5% de Nonidet P-40 (detergente não iônico). Em seguida, três etapas cromatográficas foram realizadas. A quantidade final de ACE1 extraída foi de 0,3 mg, um rendimento maior do que o procedimento proposto por Dorer et al⁵¹.

Em 1992, Polanco et al⁵⁷ fizeram a extração da ACE1 a partir do pulmão de galinha utilizando Nonidet P-40 e uma etapa de cromatografia de afinidade que continha captopril ligado covalentemente em sua resina.

Sánchez et al⁵⁸ utilizaram apenas duas etapas de purificação por afinidade para a obtenção da ACE1 de pulmão suíno. Após a extração, foi utilizado uma coluna de afinidade por glicosilação e em seguida afinidade por ACE1.

Em 2010, Chen et al⁵⁹ propuseram um procedimento para a extração da ACE1 a partir de pulmão suíno com um alto rendimento. O procedimento consistiu em duas etapas de purificação com sulfato de amônio e três etapas cromatográficas. Os autores partiram de 900 g de tecido e chegaram a aproximadamente 10 mg de ACE1 purificada.

Mais recentemente, Eisele et al⁶⁰ fizeram a purificação de um extrato de pulmão de porco em um sistema multi-colunas automatizado com válvulas para o acoplamento e desacoplamento de colunas, obtendo ACE1 purificada com uma atividade específica de 37 U.mg⁻¹ em menos de 8 horas.

Como é possível observar, houve uma grande evolução nas técnicas de extração e purificação de ACE1 ao longo dos últimos 40 anos, começando de uma forma mais rudimentar com Cushman e Cheung⁵⁰ que ainda utilizava

extratos de ACE1 para os ensaios de atividade, chegando a um sistema mais complexo e automatizado. É importante mencionar que a otimização desses processos não foi apenas assistida pelos avanços tecnológicos instrumentais, mais especificamente cromatográficos, mas sim pelo próprio conhecimento das propriedades físicas, químicas e bioquímicas da ACE1.

Por fim, para este projeto, a extração/purificação se demonstrou mais apropriada, uma vez que a quantidade de enzima necessária para a imobilização seria em torno de 1 a 2 mg. Portanto, de acordo com o procedimento desenvolvido por Chen et al⁵⁹, forneceria uma quantidade mais do que suficiente para a realização do trabalho. Inicialmente, foi considerada a possibilidade de expressão da ACE1, porém os procedimentos envolvendo clonagem molecular seriam mais complexos e tomariam mais tempo do que a extração. Além disso, ao expressar a proteína ela poderia não ser ativa, principalmente se fosse expressa em organismos eucariotos menos evoluídos como *Pichia pastoris* ou *Saccharomyces cerevisiae*, pela glicosilação ser algo de difícil controle. No trabalho realizado por Kasturi et al⁶¹ está demonstrado que a ACE1 não glicosilada apropriadamente é rapidamente degradada na célula.

1.5 - Ensaios de atividade/inibição da ACE1 e métodos analíticos

Um dos primeiros métodos realizados para a avaliação da atividade da ACE1 e seus inibidores foi desenvolvido por Cushman et al⁵⁰ em 1971, no qual foi utilizado espectroscopia de ultravioleta (UV) para a determinação da quantidade de ácido hipúrico (HA) formado a partir de HHL em solução.

Posteriormente, Hayakari et al⁵² fizeram algumas modificações em métodos anteriores baseados em espectrofotometria de UV utilizando um reagente colorimétrico 2,4,6-tricloro-s-triazina para a determinação do HA em solução.

Em 2000, Zhang et al⁶² descreveram um método utilizando eletroforese capilar acoplado a um detector de arranjo de diodo para a determinação da concentração de HA formado a partir de HHL. Este método teve como grande vantagem a separação do HA do seu substrato, permitindo que não fosse realizada nenhuma etapa de derivação para a sua detecção.

Em 2006, duas publicações envolvendo a determinação da atividade da ACE1 e na presença de inibidores merecem destaque. Sentandreu et al⁶³

fizeram a determinação da atividade enzimática da ACE1 através de um método fluorimétrico utilizando um tripeptídeo fluorescente *o*-aminobenzilglicil-*p*-nitrofenilalanilprolina como substrato enzimático e obtendo como produto, também fluorescente, a *o*-aminobenzoilglicina. Xiao et al⁶⁴ desenvolveram um método de separação do substrato HHL do produto HA por HPLC com detecção por MS utilizando ionização por electrospray (ESI) na presença do inibidor sintético benazapril. Os testes de atividade e inibição foram realizados em solução e a quantificação do produto HA foi realizada utilizando o padrão interno ácido ftálico obtendo-se boa precisão e exatidão além de uma redução significativa no tempo total para o teste de atividade/inibição.

Megías et al⁶⁵, com a intenção de facilitar a triagem de peptídeos inibidores de ACE1, fizeram a imobilização da ACE1 em glioxil-agarose obtendo-se uma estabilidade 60 vezes maior do que a enzima em solução com a vantagem de que ela pode ser reutilizada e sua estabilidade térmica aumentada. Foram testados diferentes tempos de imobilização da enzima 3h, 5h, 24h e 48h. Observou-se que, ao aumentar o tempo de imobilização a estabilidade da enzima também aumentou, porém junto a isso o número de ligações covalentes entre a enzima e o suporte levou a uma imobilização mais rígida, o que resultou numa perda da atividade da enzima.

Em 2010, Geng et al⁶⁶ desenvolveram um método por UHPLC-MS para quantificação do HA, produto sintetizado a partir do substrato, HHL, catalisada pela ACE1. Além disso, o método foi aplicado para avaliar a capacidade inibidora de ACE1 de substâncias exógenas extraídas de ervas medicinais.

Como é possível observar, a evolução nos ensaios de atividade, inibição (IC₅₀) e a busca por novos inibidores de ACE1 teve também um avanço significativo nos últimos anos devido ao avanço tecnológico instrumental de duas técnicas analíticas, cromatografia líquida e espectrometria de massa, através da combinação das suas principais características, a capacidade de separação de amostras complexas e um poder de elucidação estrutural com alta seletividade.

1.6 - Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas surgiu como uma tentativa de mimetizar o funcionamento de enzimas ancoradas em membranas biológicas nativas para

compreender e possivelmente elucidar os seus mecanismos de ação⁶⁷. Nesse trabalho, o pesquisador ucraniano Ephraim Katchalski-Katzir, pioneiro na área de imobilização de enzimas, imobilizou proteases como tripsina e pepsina em membrana artificiais afim de investigar a sua estabilidade e atividade catalítica como um catalisador heterogêneo⁶⁸. Devido ao aumento de sua estabilidade e pela possibilidade de se reutilizar a enzima, enzimas imobilizadas começaram a ser utilizadas industrialmente⁶⁹.

A imobilização é um processo no qual a enzima é fixada em suportes sólidos criando um sistema heterogêneo. Sendo assim, a forma imobilizada da enzima mimetiza a forma natural como as proteínas de membrana atuam na célula, as quais estão anexadas ao citoesqueleto celular, membrana ou alguma organela. De uma maneira geral o suporte estabiliza a estrutura da enzima e, como consequência, mantém a sua atividade. Assim, quando comparada às enzimas livres em solução, as enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes a mudanças no seu ambiente. Além disso, enzimas imobilizadas permitem uma melhor recuperação tanto da enzima como dos seus produtos, múltiplo reuso, podem operar continuamente em processos enzimáticos industriais, sua reação pode ser facilmente terminada e oferece uma grande variedade de biorreatores devido às diferentes estratégias de imobilização⁷⁰. E no caso de proteases, o processo de autólise pode ser dramaticamente reduzido com a imobilização⁷¹. Por outro lado, comparado às enzimas livres, a maioria das enzimas imobilizadas apresentam uma atividade menor, apresentando maiores valores para a constante de Michaelis-Menten devido à transferência de massa e possivelmente a uma maior dificuldade em acessar o substrato⁷².

De uma maneira geral, quatro métodos de imobilização podem ser utilizados: 1) adsorção e deposição não covalente; 2) aprisionamento físico; 3) ligação covalente; 4) bioconjugação.

Métodos não covalentes de imobilização de enzimas podem envolver a adsorção passiva da enzima em superfícies hidrofóbicas ou interações eletrostáticas com superfícies carregadas. A vantagem para esse tipo de imobilização é que não é necessário o uso de reagentes nem a modificação na estrutura da enzima para ser imobilizada. Por outro lado, a ligação/interação com o suporte é muito fraca e são reversíveis, o que pode causar a perda da proteína para o meio e consequentemente a perda da atividade do reator⁷⁰.

O aprisionamento físico da enzima nada mais é que um encapsulamento da enzima pelo processo sol-gel. Com isso, é possível evitar que a enzima seja atacada, por proteases, e/ou denaturada. Como desvantagem, durante o processo de encapsulamento, a enzima pode sofrer uma mudança conformacional, causando uma restrição estérica, podendo resultar na alteração de propriedades cinéticas e falta de especificidade ao substrato⁷⁰.

Diferentemente do método não covalente de imobilização, o método de ligação covalente evita a perda de enzima para o meio e tem uma maior estabilidade. Além disso, devido à grande diversidade de reagentes que podem ser utilizados para a imobilização este método apresenta uma grande versatilidade. Apesar disso, durante o processo de imobilização a enzima pode perder a sua atividade devido a variedade de reagentes que podem ser usados⁷³.

O último método de imobilização é o de bioconjugação ou método por afinidade. Este método explora a específica interação proteína-proteína ou proteína-ligante. Isso pode ser atingido de duas formas, o suporte pode ser modificado com um ligante que tenha interação específica com a enzima ou a enzima é conjugada com uma outra molécula que apresenta afinidade pelo suporte⁷⁴. Neste caso a reutilização e especificidade das interações se apresentam como vantagens, enquanto que como o método de ligação não covalente, ainda pode ocorrer perda da enzima.

Os materiais utilizados como suporte podem ser um polímero orgânico sintético, um biopolímero ou um sólido inorgânico.

A imobilização em suportes poliméricos orgânicos sintéticos pode ser realizado tanto via ligação covalente ou por simples adsorção em seu mesoporo⁷⁵. Para que não haja perda da enzima, resinas acrílicas funcionalizadas estão sendo usadas para imobilizações covalentes⁷⁶.

Devido à sua grande disponibilidade, polímeros naturais surgem como uma alternativa aos polímeros sintéticos. Quitina, quitosana e celulose são matrizes poliméricas que apresentam grupos funcionais que podem ser facilmente ativados para a imobilização covalente de enzimas⁷⁷.

No entanto, muitas vezes é preferível a utilização de suportes mais rígidos e estáveis. Sendo assim, uma variedade de suportes inorgânicos tem sido usados para a imobilização de enzimas. Alumina, sílica particulada, zeólitas e sílica monolítica⁷⁸ são apenas alguns desses suportes que tem se destacado na

indústria, por apresentarem maior resistência mecânica e estabilidade para suportar condições extremas, como altas pressões e variações de temperaturas⁷⁹.

Grande destaque tem sido dado aos suportes baseados em sílica devido à grande facilidade de modificação química de sua superfície permitindo que uma variedade de grupos funcionais possam ser facilmente ligados⁸⁰.

Com o progresso da nanotecnologia nos últimos anos, rapidamente outras áreas da ciência incorporaram os seus benefícios, utilizando-os de acordo com a sua área de interesse. A química de imobilização de enzimas não foi diferente. Devido à grande área superficial desses materiais, tem se como resultado a incorporação de uma maior quantidade de enzima em sua superfície. Além disso, materiais nanoestruturados podem apresentar outras características como condutividade elétrica e magnetismo⁸¹ que dá uma versatilidade ainda maior, em termos de aplicação, para reatores de enzimas imobilizadas (IMER, *Immobilized Enzyme Reactors*).

Combinando as melhores características da imobilização de enzima com a dos materiais nanoestruturados este trabalho visa o desenvolvimento de IMERs, não só capazes de medir a atividade/inibição da ACE1, mas que também atuem com um modelo de triagem de peptídeos em misturas complexas, valendo-se de LC-MS/MS para caracterização estrutural dos compostos bioconjugados.

2 – Objetivos

Objetivo geral: Desenvolver biorreatores com a enzima ACE1 para serem empregados na triagem de inibidores específicos utilizando coleções de peptídeo naturais encriptados.

Objetivos específicos:

- Purificar a ACE1 a partir de pulmão bovino.
- Estudar as condições ideais de imobilização para a enzima ACE1.
- Avaliar a atividade da ACE1 imobilizada em diferentes substratos (angiotensina I ou hippuril-L-histidil-L-leucina) a fim de determinar o que melhor se adapta ao método a ser desenvolvido.
- Separar cromatograficamente os substratos e produtos da reação catalisada pela ACE1, nas condições reacionais.
- Modular o ensaio enzimático para as condições cromatográficas.
- Realizar os estudos cinéticos para as enzimas imobilizadas.
- Validar o uso do reator enzimático na avaliação da atividade biológica de inibidores, empregando compostos conhecidamente ativos em solução.
- Desenvolver e validar o ensaio de *fishing* de ligantes (peptídeos).

3 - Procedimento Experimental

3.1 - Equipamentos e Reagentes

Empacotadora Haskel, utilizada para o empacotamento das colunas analíticas.

Cromatógrafo líquido com duas bombas SHIMADZU LC 10 AD VP, onde uma delas está acoplada a uma válvula seletora de solvente SHIMADZU FCV-10AL para gradiente de baixa pressão; um detector de arranjos de fotodiodos SHIMADZU SPD-M10 AVP; um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável SHIMADZU SPD-10AV; um auto-injetor SHIMADZU SIL 10 AD VP e uma válvula de seis caminhos VALCO NITRONIC 7000 utilizada para o sequenciamento de colunas. O equipamento está acoplado a uma interface SHIMADZU SCL 10 AVP e os cromatogramas são registrados através de um software SHIMADZU LC-Solution 2.1.

Um cromatógrafo líquido da marca SHIMADZU, composto por duas bombas LC 20-A, degaseificador de membrana DGU-2As, auto-injetor SIL 20A HT, detector UV-Vís SPD-20A, forno para colunas CTO-20A e uma interface CBM-20A.

Cromatógrafo líquido com uma bomba quaternária modelo Accela 600 da marca Thermo Scientific; um autoinjetor modelo Accela AS e um espectrômetro de massa TSQ Quantum Max com analisador triplo quadrupolo da marca Thermo Scientific.

Cromatógrafo líquido modelo EASY-nLC II da marca Thermo Scientific acoplado ao espectrômetro de massa híbrido LTQ-Orbitrap-Velos da marca Thermo Scientific.

Cromatógrafo líquido de baixa pressão para separação de proteínas (FPLC) ÄKTA FPLC, composto por um detector de UV UPC 900, uma bomba P-920, um coletor de fração FRAC-920, uma coluna de troca aniônica DEAE SFF (2,6 x 30 cm) e uma coluna de afinidade de concanavalina A (2,6 x 20 cm) sendo os cromatogramas registrados através de um software UNICORN na versão 3.2.

Para os testes de atividade foi utilizado um banho de Dubnoff da marca Nova Ética.

Termo bloco com controle de temperatura e timer da marca Eppendorf, modelo Thermomixer®.

Sistema para quantificação de proteína por fluorescência, QUBIT® 2.0 da marca Life Technology.

Um espectrofotômetro UV-Vis da marca JASCO modelo V-630.

Durante o processo de purificação da enzima e preparação de amostra dois modelos de centrífuga foram utilizadas sendo, a BR 4i da marca Jouan e a 5415 R da marca Eppendorf.

A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema MILLI-Q (MILLIPORE). Os solventes orgânicos grau HPLC foram filtrados a vácuo em um sistema MILLIPORE, utilizando membranas de nylon PHENOMENEX de 0,45 μm e posteriormente degaseificados em ultrassom COLE-PALMER 8852. A homogeneização das amostras foi efetuada em um vórtex PHOENIX AP56. Para a pesagem analítica dos reagentes foi utilizada uma balança analítica AND, modelo HR200, com precisão 0,0001 g. As medidas de pH foram realizadas em pH-metro Qualxtron 8010 com precisão 0,01.

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

3.2 - Extração e purificação da ACE1 a partir de pulmão bovino

O procedimento foi baseado no procedimento previamente descrito por Chen et al⁵⁹ para pulmão suíno.

Pulmões bovinos foram obtidos junto ao frigorífico Mondelli, Bauru-SP. Assim que os pulmões foram retirados do gado abatido, eles foram armazenados em tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,8 contendo 1 mmol.L⁻¹ do estabilizante PMSF em um cooler a 4 °C até a chegada no laboratório. Para a extração, eles foram cortados em pequenos pedaços com auxílio de tesouras cirúrgicas. Aproximadamente 900 g de tecido foram suspensos em 2 volumes de 1 mmol.L⁻¹ PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil), 20 mmol.L⁻¹ Tris-HCl, pH 7,8. O tecido foi homogeneizado utilizando-se Ultra-Turrax descendo as hélices 6 vezes e permanecendo por 60 s imersas na suspensão. Em seguida, cerca de 0,2 % (v/v) de Triton-X foi adicionado ao homogenato e agitou-se por 90 min a 4 °C. A suspensão foi centrifugada a 9000 x g durante 30 min e em seguida o sobrenadante foi coletado. Ao sobrenadante foi adicionado 30 % (m/v) de sulfato de amônio sólido e agitou-se essa solução por 1 hora e centrifugou-se a 10000 x

g por 20 min. Novamente o sobrenadante foi coletado e 70 % (m/v) de sulfato de amônio sólido adicionado permanecendo durante 1 hora sob agitação e centrifugado. O precipitado foi coletado e suspenso em tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,8 e dialisado 3 vezes contra 24 volumes do mesmo tampão Tris-HCl durante 48 horas a 4 °C. A solução dialisada foi liofilizada, obtendo-se aproximadamente 10 g, e armazenada até que a próxima etapa de purificação fosse realizada.

A amostra foi adicionalmente purificada por cromatografia de baixa pressão em uma coluna DEAE (2,6 cm x 30 cm) sendo equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,8. Previamente a injeção no sistema cromatográfico, a amostra foi suspensa no tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,8 e centrifugada a 14000 x g para remover partículas insolúveis. A coluna foi lavada com 6 volumes de tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,8 e a amostra eluída em um gradiente salino 0 – 30 % de uma solução de NaCl 1 mol.L⁻¹ preparada em Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,8 a uma vazão de 3 mL.min⁻¹.

3.3 - Avaliação da quantidade proteica do extrato

A solução de corante azul de Comassie foi preparada segundo o procedimento descrito por Bradford⁸²: em um béquer dissolveu-se 10 mg de Comassie-blue G-250, em 5,0 mL de etanol e a seguir acrescentou-se lentamente 10 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 85 % P.A. sob agitação. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água. A solução do corante foi estocada em um frasco de vidro âmbar. Para determinação das proteínas totais excluídas, foram preparadas duas amostras de referência com 900 µL da solução de Bradford e 100 µL de água (branco), e amostras testes de soluções com 900 µL da solução de Bradford, 95 µL de água e 5 µL da solução enzimática. Esta solução foi então transferida para uma cubeta de vidro e os valores de absorvância medidos no comprimento de onda de 595 nm, relativo ao máximo de absorção do complexo proteína-corante.

3.4 - Monitoramento da purificação por SDS-PAGE

A preparação do gel foi realizada baseada no procedimento descrito Laemmli⁸³ para uma concentração final de 10 % (v/v) de poliacrilamida. Para todas as amostras a serem aplicadas no gel a proporção entre o tampão da

amostra e a amostra foi de 2:1 e posteriormente fervidas por 5 minutos. Para os géis SDS-PAGE a corrente foi mantida constante a 200 mA do início ao fim da corrida. Ao término da corrida os géis foram corados com corante Comassie Blue, deixados sob agitação por 5 minutos e posteriormente descorados com ácido acético 7 %. O protocolo do gel de resolução (corrida) e de empilhamento estão descritos nas TABELA 3.1 e TABELA 3.2.

TABELA 3.1 - Protocolo para gel de resolução

Acrilamida Bis (30:0,8%)	10 mL
Tampão do gel (1.5 M Tris-Cl, pH 8.8)	7,5 mL
10 % SDS	0,3 mL
Água destilada	12,1 mL
10 % Persulfato de amônio	150 µL
TEMED	10 µL

TABELA 3.2 - Protocolo para gel de empilhamento

Acrilamida Bis (30:0,8%)	1,33 mL
Tampão do gel (0.5M Tris-Cl, pH6.8)	2,5 mL
10% SDS	0,1 mL
Água destilada	6,0 mL
10% Persulfato de amônio	50 µL
TEMED	5 µL

3.4.1 - Revelação do SDS-PAGE por coloração com prata

A revelação por prata foi realizada devido a sua maior sensibilidade resultando numa melhor visualização de proteínas presentes em baixas concentrações. As soluções utilizadas estão listadas na TABELA 3.3.

TABELA 3.3 - Soluções utilizadas para a revelação por prata

Solução	Composição
Fixadora	100 mL (50% metanol, 12% ácido acético, 50 µL formaldeído)
Tiosulfato de sódio	200 mL (40 mg de tiosulfato em 200 mL de água)
Nitrato de prata	100 mL (200 mg de AgNO ₃ em 100 mL de água 75 µL de formaldeído)
Reveladora	100 mL (6 g de Na ₂ CO ₃ , 50 µL de formaldeído, 2 mL da solução de tiosulfato de sódio e completar para 100 mL de água)
Stop	100 mL (50 mL de metanol, 12 mL de ácido acético completar para 100 mL com água)

O procedimento foi realizado em 8 etapas que estão descritas abaixo:

1º) O gel foi colocado em 100 mL de solução fixadora e levado ao microondas (potência máxima) durante 30 segundos. Em seguida, foi agitado à temperatura ambiente por 5 minutos.

2º) O gel foi lavado com 100 mL de uma solução de etanol 30% e depois levado ao microondas (potência máxima) por mais 30 segundos. Em seguida foi agitado à temperatura ambiente por 5 minutos.

3º) Juntou-se 100 mL de solução de tiosulfato de sódio. Colocou-se o gel no microondas durante 30 segundos e agitou-se durante 2 minutos à temperatura ambiente.

4º) Lavou-se o gel com água deionizada durante 30 segundos no microondas, e em seguida agitou-se por 2 minutos à temperatura ambiente.

5º) Lavou-se novamente com água, levou ao microondas e agitou-se por mais 2 minutos.

6º) O gel foi colocado em 100 mL de solução de prata durante 30 segundos no microondas e 5 minutos no agitador à temperatura ambiente.

7º) Lavou-se o gel com água deionizada durante 20 a 60 segundos. Adicionou-se 100 mL de solução reveladora e deixou-se durante 5-6 minutos à temperatura ambiente.

8º) Parou-se a reação com a solução STOP.

3.5 - Desenvolvimento do método analítico para avaliação da atividade da ACE1

No desenvolvimento do método analítico foram avaliadas condições cromatográficas de separação do HHL e HA. Para isso, foram preparadas soluções estoque de 1 mg.mL^{-1} de cada composto. A partir dessas soluções foram preparadas soluções mais diluídas com uma concentração final de $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e posteriormente analisadas no sistema cromatográfico. As condições cromatográficas utilizadas para a separação da mistura HHL e HA estão apresentadas na TABELA 3.4.

TABELA 3.4 - Condições cromatográficas para separação da HA e HHL

Tempo (min)	Vazão (mL.min^{-1})	%A - Tampão Fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3	%B - $\text{CH}_3\text{OH/CH}_3\text{CN (1:1)}$
0,00 – 6,00	0,800	93	7
6,01 – 8,00	0,800	20	80
8,01 – 12,0	0,800	20	80
12,01 – 14,0	0,800	93	7

A análise cromatográfica foi realizada no modo gradiente de eluição com tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3 na linha (A) e $\text{CH}_3\text{OH/CH}_3\text{CN (1:1)}$ na linha (B) no fluxo de $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$ utilizando uma coluna C_8 ($15 \times 0,46 \text{ cm}$, Hypersil, $5 \text{ }\mu\text{m}$, 100 \AA) com um tempo total de análise de 19 min.

3.6 - Ensaio enzimático em solução com o extrato de ACE1

Os ensaios de atividade foram realizados de acordo com os métodos previamente descritos e otimizados⁵⁰. Para este ensaio, foi preparada uma mistura contendo $25 \text{ }\mu\text{L}$ de solução $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de HHL no tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3, $25 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução 3 mol.L^{-1} de NaCl, $400 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3 e $50 \text{ }\mu\text{L}$ de extrato de ACE1. A mistura foi levemente agitada e colocada num banho térmico a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 50 min. A reação foi interrompida com a adição de $500 \text{ }\mu\text{L}$ de CH_3OH e centrifugada a $10000 \times g$ por 15 min. O sobrenadante foi coletado e analisado no sistema cromatográfico.

3.7 Purificação da ACE1 por cromatografia de troca aniônica (DEAE)

Como primeira etapa da purificação do extrato de ACE1, foi realizada a purificação por cromatografia de baixa pressão utilizando uma coluna DEAE Hitrap Fast Flow (1 mL) de troca aniônica com capacidade de troca de 120 mg de HSA (*Human Serum Albumin*). Uma solução do extrato liofilizado (E70) foi preparada com a solubilização de 1 mg de extrato em 1 mL de tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,8 para a injeção no sistema cromatográfico. Antes da injeção no sistema cromatográfico a amostra foi centrifugada para remover proteínas insolúveis que poderiam causar o entupimento da coluna. A coluna foi lavada com 3 volumes de tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,8 e a amostra eluída em um gradiente salino 0 – 30 % de uma solução de NaCl 1 mol.L⁻¹ preparada em Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,8 a uma vazão de 1 mL.min⁻¹ e frações de 1 mL foram coletadas durante todo o tempo de corrida, que foi de aproximadamente 25 min.

3.8 - Purificação do extrato de ACE1 por filtros de exclusão por tamanho (FET)

A purificação do extrato de ACE1 foi realizado utilizando filtros de celulose com tamanho de poro para eliminação de proteínas com peso molecular abaixo de 100 kDa. O procedimento foi realizado solubilizando-se 12 mg de extrato de ACE1 liofilizado em 12 mL de tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,8, e transferido para o filtro de celulose Amicon (Millipore). Em seguida, o filtro foi submetido a centrifugação por 8 minutos à 3000 rpm. Após a centrifugação, a solução passada pelo filtro foi descartada e à solução remanescente foi adicionado um volume do mesmo tampão para completar a capacidade máxima do filtro de 12 mL. O processo foi repetido até que 50 mL de tampão fosse passado pelo filtro. As soluções remanescentes foram liofilizadas e o sólido foi armazenado à temperatura de -20 °C.

3.9 - Purificação do extrato de ACE1 por cromatografia de afinidade por glicosilação

A cromatografia de afinidade por glicosilação foi realizada utilizando-se uma resina de concanavalina A, empacotada em uma coluna de tamanho de 20 x 2,6 cm com tampão 20 mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 7.4 contendo 200 mmol.L⁻¹ de NaCl. A resina foi previamente lavada com 5 volumes de uma solução de 1 mol.L⁻¹ NaCl, 5 mmol.L⁻¹ MgCl₂, 5 mmol.L⁻¹ MnCl₂ e 5 mmol.L⁻¹ CaCl₂.

As análises foram realizadas preparando-se uma solução do extrato liofilizado com a solubilização de 500 mg em 10 mL de tampão 20 mmol.L⁻¹ Tris - HCl, 0,2 mol.L⁻¹ NaCl e antes da injeção no sistema cromatográfico a amostra foi centrifugada para remover proteínas insolúveis que poderiam causar o entupimento da coluna. A coluna foi lavada com 5 volumes de tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,8 (tampão A) e a amostra foi eluída 10 volumes da coluna com o tampão 20 mmol.L⁻¹ Tris-HCl, 100 mmol.L⁻¹ metil- α -D-manopiranosídeo (tampão B) a uma vazão de 1 mL.min⁻¹ e frações de 15 mL foram coletadas resultando em um tempo de corrida de aproximadamente 24 horas.

As frações ativas foram misturadas e dialisadas contra o tampão 20 mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 7.4 e liofilizadas.

3.10- Purificação da enzima ACE1 por cromatografia de afinidade com resina Sepharose-lisinopril

Para a etapa final de purificação da ACE1, sintetizou-se uma resina contendo um inibidor sintético de ACE1, lisinopril, para a realização de uma cromatografia de afinidade.

3.10.1 - Síntese da resina Sepharose-lisinopril

384 mg de ácido *p*-aminobenzóico foi dissolvido em 12 mL de DMF e 0,5 mL de diisopropilamina foram misturados com 4 g da resina sepharose 6B epóxi-ativada suspensa em água. A reação foi realizada em um balão de fundo redondo sob leve agitação durante 15 horas à temperatura ambiente. Após a reação a resina foi filtrada e lavada com excesso de DMF e água. Os grupos epóxi residuais foram bloqueados através da reação com 20 mL de uma solução

1 mol.L⁻¹ de etanolamina por 1 hora. Em seguida, a resina foi lavada com água e extensivamente com DMF.

A resina de Sepharose modificada foi ativada reagindo-a, por 2,5 horas, com 1,1 g de HBTU (*2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate* - 2,8 mmol) e 378 mg de HOBt (*1-hydroxybenzotriazole* - 2,8 mmol) que foram dissolvidos em 12 mL de DMF e 0,2 mL de DIEA (*diisopropylethylamine*), respectivamente.

A solução foi filtrada e uma segunda reação foi realizada adicionando-se 551 mg de ácido aminocapróico dissolvido em 12 mL de uma solução 0,1 mol.L⁻¹ de Na₂CO₃ (pH 11,8) por 24 horas à temperatura ambiente. A resina foi lavada com água e em seguida com DMF.

Finalmente, reagiu-se a resina com 486 mg de lisinopril (1,2 mmol) que foram dissolvidos em 12 mL de uma solução 0,1 mol.L⁻¹ de K₂CO₃ (pH 11,8) durante 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os grupos residuais que não reagiram foram bloqueados com uma solução de glicina 1 mol.L⁻¹ (pH 10) e a resina de Sepharose-lisinopril foi lavada extensivamente com água, seguida das soluções 0,5 mol.L⁻¹ NaCl, tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ (pH 8,5), tampão acetato de sódio (pH 4,5) contendo 0,5 mol.L⁻¹ de NaCl e por fim o tampão de equilíbrio Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,3 com 0,3 mol.L⁻¹ de NaCl e 100 µmol.L⁻¹ ZnCl₂.

3.10.2 - Cromatografia de afinidade por Sepharose-lisinopril

A resina sintetizada Sepharose-lisinopril foi empacotada em uma coluna 1,5 x 5,0 cm e equilibrada com Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,3 com 0,3 mol.L⁻¹ de NaCl e 100 µmol.L⁻¹ ZnCl₂. Inicialmente 6 frações de 5 mL foram coletadas em tubos de ensaio e eluidas com o mesmo tampão de equilíbrio. Em seguida, mais 6 frações de 5 mL foram coletadas em tubos de ensaio previamente preenchidos com 0,5 mL de uma solução 1 mol.L⁻¹ Tris-HCl (pH 7,2) e 3 mol.L⁻¹ NaCl e eluidas com tampão Na₂B₄O₇, 50 mmol.L⁻¹, pH 9,5. Após a coleta das frações as suas atividades foram avaliadas.

3.11 - Identificação da ACE1 por LC-MS/MS

3.11.1 - Digestão da ACE1

Para a digestão da ACE1, uma solução de ACE1 pós-conA foi quantificada utilizando o sistema QUBIT 2.0 (Life Technologies) com detecção por fluorescência, seguindo o protocolo de preparação do fabricante do kit Quant-iT Protein Assay (Life Technologies), no qual consistiu na mistura de 1 μL do reagente fluorescente com 199 μL do tampão de preparo. Em seguida, a amostra foi misturada com 199 μL da solução preparada. A solução final foi mantida, por 15 minutos no escuro para que a reação ocorresse. Por fim a solução foi levada ao sistema para realizar a leitura.

Após a quantificação da solução proteica, um volume equivalente a aproximadamente 3 μg em massa de proteína foi seco em uma centrifuga a vácuo e ressuspendido em 20 μL de 8 mol.L^{-1} de ureia e em seguida foi adicionado 1 μL de 1 mol.L^{-1} ditioneitol (DTT) e essa solução foi incubada durante 30 min a 37 °C sob uma agitação de 100 rpm em banho seco. Após a solução resfriada, foram adicionados 5 μL de uma solução 200 mmol.L^{-1} iodoacetamida (IAA) e a solução foi incubada por mais 30 min a temperatura ambiente no escuro. Adicionou-se 90 μL de 50 mmol.L^{-1} de $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ (90:10, v/v). Em seguida, foi adicionado uma solução de tripsina (Trypsin Sequencing Grade, Promega) na relação de 1:50 (tripsina/proteína). A reação foi realizada por 16 h a 37 °C e interrompida pela adição de 10 μL de uma solução aquosa de 10% ácido fórmico (FA), em seguida a solução foi seca e ressuspendida em ácido FA 0,1 % e dessalinizada utilizando ZipTip®.

3.11.2 - Análise por LC-MS/MS para a identificação da ACE1

Os peptídeos tripticos foram analisados no sistema nano EASY-nLC II (Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) com interface da fonte Proxeon *nanoelectrospray ion source*. Os peptídeos foram separados na coluna analítica EASY-Column (10 cm, ID75 μm , 3 μm , C18 - Thermo Scientific), previamente retidos em uma pré-coluna EASY-Column (2 cm, ID100 μm , 5 μm , C18 - Thermo Scientific). Para a separação foi realizado um gradiente linear de 60 min de 0 – 60 % fase móvel B (CH_3CN com 0,1 % de FA) a uma vazão de 300 nL.min^{-1} .

O espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap foi operado com polaridade positiva usando o modo aquisição dependente de dados no qual em um espectro de varredura foram considerados os 20 íons mais intensos para a realização de um segundo experimento de espectrometria de massa sequencial a serem fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *Collision Induced Dissociation*).

Os *fullscans* foram adquiridos com resolução de 60000 e o intervalo de m/z foi de 400 – 1200. A energia de colisão foi normalizada em 35 eV para um íon precursor duplamente carregado com intervalo de isolamento de 2 m/z, Q de ativação de 0,250 e tempo de ativação de 10 ms. A intensidade de mínima para a seleção dos íons precursores foi de 15000 e para a exclusão dinâmica foi considerado um *repeat count* com duração de 30 s. O sistema de discriminação de carga foi habilitado e apenas os íons com carga 2, 3 e 4 foram considerados, os íons com cargas desconhecida e carga 1 foram rejeitados.

3.12- Síntese de nanopartículas magnéticas (NMB) e imobilização da ACE1

3.12.1 - Síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

As partículas de óxido de ferro magnéticas foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, utilizando a metodologia descrita por Dresco et al⁸⁴. O método utiliza a coprecipitação dos íons metálicos Fe²⁺ e Fe³⁺ em meio alcalino.

Para isso, preparou-se uma solução 0,15 mol.L⁻¹ de íons ferro com proporção de 1:2 em mols de Fe²⁺: Fe³⁺, com 0,05 mol.L⁻¹ de Fe²⁺ e 0,10 mol.L⁻¹ de Fe³⁺, utilizando (FeSO₄.7H₂O) e [Fe₂(SO₄)₃.4H₂O] e adicionou-se como agente precipitante uma solução de NH₄OH com concentração de 1,5 mol.L⁻¹ sob velocidade de agitação mecânica de 300 rpm.

Os sais de Fe²⁺ e Fe³⁺ foram solubilizados em 500,0 mL de água destilada previamente degaseificada em banho de ultrassom. Após a solubilização, foram adicionados 170,0 mL dos respectivos agentes precipitantes à solução. Ao se adicionar a solução alcalina à solução contendo os íons Fe²⁺ e Fe³⁺ tiveram-se início os processos de nucleação e crescimento dos cristais.

Após a etapa da precipitação, o material foi deixado em repouso até sua decantação à temperatura ambiente. O precipitado de coloração preta foi isolado do sobrenadante por decantação utilizando um magneto colocado sob o béquer e posteriormente foi feita uma purificação com a lavagem do precipitado com água degaseificada até o filtrado atingir pH próximo à 7,0.

Após a purificação o precipitado foi isolado por filtração e seco em estufa à vácuo sob pressão reduzida a 40°C. Após sua secagem, o material foi triturado em almofariz de ágata, obtendo-se assim um sólido homogêneo.

3.12.2 - Recobrimento da superfície da NMB e Imobilização da ACE1

Para o recobrimento, a 30 mg de NMBs foram adicionados 20 mL de HCl 2 mol.L⁻¹ e a suspensão foi levada ao banho de ultrassom durante 15 min. A solução foi retirada com o auxílio de uma rack magnética e foi adicionado mais 20 mL de HCl 2 mol.L⁻¹ e a suspensão foi levada novamente ao banho de ultrassom. Em seguida, a solução de HCl 2 mol.L⁻¹ foi descartada e foi adicionado 20 mL de isopropanol e a solução foi levada ao banho de ultrassom por 30 min. Em seguida, as partículas foram lavadas, duas vezes, com 20 mL de isopropanol. Após o descarte do isopropanol, foi adicionado mais 5 mL de isopropanol, 200 µL de NH₄OH (25%) e 200 µL de 3-aminopropil trietoxisilano (APTS), agitou-se a suspensão por 20 h.

Após esse período, a suspensão foi transferida para um tubo de Falcon e centrifugada a 10000 x g por 10 min. Ao final, o sobrenadante foi descartado e as partículas foram lavadas com H₂O três vezes e centrifugada novamente, por fim, o sobrenadante foi descartado e as partículas foram secadas no dessecador.

Para a imobilização da ACE1 pesou-se 25 mg de NMB em um microtubo de 2,0 mL e em seguida adicionou-se 1 mL de 10 mmol.L⁻¹ tampão fosfato pH 8,3 e agitou-se para a limpeza das partículas. A solução foi removida com o auxílio de uma rack magnética. Esse procedimento foi repetido 2 vezes. Em seguida, 1 mL de uma solução 10 mmol.L⁻¹ tampão fosfato, pH 8,3/glurataldeído (95:5; v/v) foi adicionado ao tubo e essa mistura foi agitada a 4°C durante 3 horas. Nesse intervalo, para a ACE1 purificada (pós-lisinopril), 0,5 mg de enzima foi pesada e resuspendida em 1 mL e todo o material foi utilizado

para que no fim tivesse 0,5 mg de enzima imobilizada. Para a ACE1 comercial (ACE1 suína, Sigma), uma solução de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi preparada e 100 μL dessa solução foi diluída em 900 μL de tampão fosfato para a sua imobilização, no fim obtendo-se 1 μg de enzima imobilizada.

As enzimas ressuspendidas em 1 mL de 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ tampão fosfato, pH 8,3 foram agitadas por 16 horas a 4°C. Após 16 horas, as soluções foram removidas e as partículas foram lavadas e armazenadas com 1 mL de Tris-HCL 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,2 a 4°C até a sua utilização.

3.13- Ensaio de atividade da ACE1 imobilizada em NMB (NMB-ACE1)

Os ensaios de atividade foram realizados se baseando nos ensaios de atividade em solução. Ao tubo contendo a ACE1 imobilizada em NMB adicionou-se uma mistura contendo 50 μL de solução 2,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HHL em tampão fosfato 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,3, 50 μL de uma solução 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl e 400 μL de tampão fosfato 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,3. A mistura foi levemente agitada e colocada num banho térmico a 37 °C durante 50 min. O sobrenadante foi retirado com o auxílio da rack magnética. Em seguida, 200 μL do sobrenadante foram coletados e analisados no sistema cromatográfico.

Para os estudos cinéticos da ACE1 foi preparado uma solução estoque de HHL na concentração de 625 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em 200 μL de metanol. A partir da adição de metanol a alíquotas apropriadas para a solução estoque para o volume final de 100 μL , foram preparadas soluções de HHL nas seguintes concentrações: 6,25; 12,5; 18,75; 25; 31,25; 46,875; 62,5; 125; 187,5; 250; 350 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Em seguida, 50 μL de cada uma dessas soluções foram diluídas em tampão fosfato 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ para um volume final de 500 μL . Finalmente, para as incubações dos ensaios cinéticos foram utilizados 50 μL de cada solução, obtendo-se uma concentração final de 62,5; 125; 187,5; 250; 312,5; 468,75; 625; 1250; 1875; 2500; 3500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os parâmetros cinéticos foram determinados para o substrato HHL, medindo a atividade enzimática através da formação do produto HA utilizando o método cromatográfico desenvolvido e validado.

3.14- Ensaio de inibição em NMB-ACE

Para o ensaio de inibição da NMB-ACE foi utilizado um inibidor de ACE1 conhecido, Lisinopril. O ensaio consiste na medição da atividade enzimática sem o inibidor e na presença do inibidor. Para isso, primeiramente foi realizado um ensaio de atividade sem o inibidor para avaliar a atividade máxima da ACE1 (1). Em seguida, foi realizado o ensaio de atividade na presença do lisinopril (2). Por fim, novamente um ensaio de atividade sem o inibidor foi realizado (3).

Para os experimentos (1) e (3) utilizou-se uma mistura contendo 50 μL de solução 2,5 mmol.L^{-1} de HHL em tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3, 50 μL de uma solução 3 M de NaCl e 400 μL de tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3.

Para o experimento (2) utilizou-se uma mistura contendo 50 μL de solução 2,5 mmol.L^{-1} de HHL em tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3, 50 μL de uma solução 3 mol.L^{-1} de NaCl, 50 μL de uma solução 10 nmol.L^{-1} de lisinopril e 350 μL de tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3.

3.15- Ensaio de *fishing* e ensaio de atividade com substrato natural da ACE1 utilizando NMB-ACE

3.15.1 - Ensaio de bioconjugação (*Fishing*)

No primeiro ensaio de *fishing*, as NMB-ACEs foram incubadas com 50 μL de uma solução 3 mol.L^{-1} de NaCl, 50 μL de uma solução 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de lisinopril e 400 μL de tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3 para um volume final de 500 μL . As partículas foram incubadas por 50 min em banho seco a 37 °C. O sobrenadante (A1_S) foi coletado. Em seguida, as partículas foram incubadas por mais 50 min a 37 °C em 500 μL de uma solução tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3/CH₃CN (95:5; v/v). O sobrenadante (A2_E) foi coletado.

No segundo ensaio de *fishing*, as NMB-ACEs foram incubadas com 50 μL de uma solução 3 mol.L^{-1} de NaCl, 50 μL de uma solução 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de lisinopril, 25 μL de uma solução 1 $\text{pmol.}\mu\text{L}^{-1}$ de *Tryptic Digest of Bovine Serum Albumin* (Tryptic BSA) (Bruker) e 375 μL de tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3 para um volume final de 500 μL . As partículas foram incubadas por 50 min em banho seco a 37 °C. O sobrenadante (A2_S) foi coletado. Em seguida, as

partículas foram incubadas por mais 50 min a 37 °C em 500 µL de uma solução tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH 8,3/CH₃CN (95:5; v/v). O sobrenadante (A2_E) foi coletado.

Em seguida, as frações coletadas foram submetidas à extração em fase sólida (SPE C18-E Phenomenex) de acordo com as seguintes condições: ativação (600 µL metanol); condicionamento (3 mL - 0,1% ácido trifluoracético - TFA); aplicação (500 µL de amostra); lavagem (3 mL - 0,1% TFA); eluição (1 – 600 µL de 0,1% TFA/CH₃CN, 50:50, 2 – 600 µL de 0,1% TFA/CH₃CN, 30:70); regeneração (6 mL de CH₃CN/H₂O, 95:5).

Após a eluição, as amostras foram secas em um concentrador a vácuo e ressuspensas em 500 µL de 0,1% de FA para serem analisadas no sistema LC-MS/MS.

3.15.2 - Ensaio de atividade do NMB-ACE frente ao seu substrato natural

Para este ensaio de atividade, adicionou-se ao tubo contendo NMB-ACE, 50 µL de uma solução de 1 µg.mL⁻¹ de AG I; 50 µL de uma solução 3 mol.L⁻¹ de NaCl e 400 µL de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH 8,3. A mistura foi levemente agitada e colocada num banho térmico a 37 °C durante 50 min. O sobrenadante foi retirado com o auxílio da rack magnética. Para o sobrenadante coletado, foi realizado a extração em fase sólida, como descrito anteriormente. Por fim, as amostras secas foram ressuspensas em 500 µL de 0,1% de FA para serem analisadas no sistema LC-MS/MS.

3.15.3 - Análise por LC-MS/MS para o ensaio de atividade e *fishing* da NMB-ACE

Para as análises dos ensaios de atividade e *fishing*, foi necessário o desenvolvimento de um método de LC-MS/MS em um cromatógrafo líquido com uma bomba quaternária modelo Accela 600 da marca Thermo Scientific acoplado a um espectrômetro de massa TSQ Quantum Max com analisador triplo quadrupolo da marca Thermo Scientific.

As análises foram realizadas utilizando uma coluna cromatográfica Hypersil 1 x 150 mm (5 µm, 100 Å), com uma vazão de 50 µL.min⁻¹ e o volume de

injeção de 5 μ L. Como parâmetros de análise para o espectrômetro de massa, que fora operado na polaridade positiva, foram: *capillary temperature* 240 °C; *vaporizer temperature* 35 °C; *sheath gas pressure* 5,00 au; *spray voltage* 3555 V. Além disso, os compostos foram analisados no modo de varredura *multiple reaction monitoring* (MRM).

A TABELA 3.5 mostra as condições cromatográficas utilizadas, bem como as reações monitoradas para cada composto.

TABELA 3.5 - Condições cromatográficas

LC				
Tempo (min)	A (H ₂ O, FA 0,1 %)		B (CH ₃ CN, FA 0,1 %)	
0 – 2	90		10	
2 – 15	50		50	
15 – 20	20		80	
20 – 22	20		80	
MS/MS				
Composto	Carga	Transição		Energia de colisão (eV)
		m/z	m/z	
Angiotensina I	3+	433	109	32
Angiotensina I	3+	433	254	35
Angiotensina I	3+	433	647	17
Angiotensina II	2+	524	255	37
Angiotensina II	2+	524	263	20
Angiotensina II	2+	524	784	19

Adicionalmente, utilizando as mesmas condições cromatográficas, outras transições referentes a peptídeos trípticos presentes na mistura de BSA digerido foram determinadas e monitoradas. A TABELA 3.6 mostra todas as transições monitoradas com as suas respectivas energias de colisão.

TABELA 3.6 - Transições dos compostos utilizados para o ensaio de *fishing*

Composto	Transição		Energia de colisão (eV)
	m/z	m/z	
SHC*IAEVEK	536.76	225.09	30
SHC*IAEVEK	536.76	264.44	30
SHC*IAEVEK	536.76	519.06	30
YIC*DNQDTISSK	722.33	584.38	25
YIC*DNQDTISSK	722.33	1007.4	25
YIC*DNQDTISSK	722.33	1167.41	25
DLGEEHFK	487.73	201.11	25
DLGEEHFK	487.73	294.24	25
DLGEEHFK	487.73	478.93	25
Lisinopril	406	84	29
Lisinopril	406	246	23
Lisinopril	406	309	19
EYEATLEEC*C*AK	751.81	246.69	30
EYEATLEEC*C*AK	751.81	796.31	30
EYEATLEEC*C*AK	751.81	909.37	30
FKDLGEEHFK	417.21	129.45	25
FKDLGEEHFK	417.21	272.27	25
FKDLGEEHFK	417.21	329.06	25
AEFVEVTK	461.86	201.12	20
AEFVEVTK	461.86	230.79	20
AEFVEVTK	461.86	575.35	20
EC*C*HGDLLLEC*ADDR	583.89	197.34	20
EC*C*HGDLLLEC*ADDR	583.89	636.23	20
EC*C*HGDLLLEC*ADDR	583.89	765.28	20
YNGVFQEC*C*QAEDK	874.36	316.44	30
YNGVFQEC*C*QAEDK	874.36	518.82	30
YNGVFQEC*C*QAEDK	874.36	1314.44	30
DDPHAC*YSTVFDK	518.89	231.09	20
DDPHAC*YSTVFDK	518.89	281.83	20

DDPHAC*YSTVFDK	518.89	662.99	20
DDPHAC*YSTVFDK	777.83	662.99	25
DDPHAC*YSTVFDK	777.83	718.69	25
DDPHAC*YSTVFDK	777.83	1090.44	25
HLVDEPQNLIK	653.36	251.91	25
HLVDEPQNLIK	653.36	593.45	25
HLVDEPQNLIK	653.36	1055.52	25
YLYEIAR	464.25	249.22	20
YLYEIAR	464.25	277.23	20
YLYEIAR	464.25	651.34	20
KVPQVSTPTLVEVSR	547.32	262.22	20
KVPQVSTPTLVEVSR	547.32	361.47	20
KVPQVSTPTLVEVSR	547.32	535.46	20
RHPEYAVSVLLR	480.61	139.69	20
RHPEYAVSVLLR	480.61	233.79	20
RHPEYAVSVLLR	480.61	587.36	20
RPC*FSALTPDETYVPK	627.98	467.39	20
RPC*FSALTPDETYVPK	627.98	719.72	20
RPC*FSALTPDETYVPK	627.98	949.24	20
LVNELTEFAK	582.32	376.2	20
LVNELTEFAK	582.32	595.29	20
LVNELTEFAK	582.32	951.46	20
LFTFHADIC*TLPDTEK	636.98	244.18	35
LFTFHADIC*TLPDTEK	636.98	833.52	35
LFTFHADIC*TLPDTEK	636.98	976.41	35
LGEYGFQNALIVR	740.9	813.51	30
LGEYGFQNALIVR	740.9	960.07	30
LGEYGFQNALIVR	740.9	1017.55	30
HPYFYAPELLYYANK	630.65	555.89	20
HPYFYAPELLYYANK	630.65	616.43	20
HPYFYAPELLYYANK	630.65	820.72	20
DAFLGSFLYEYSR	784.38	717.35	25
DAFLGSFLYEYSR	784.38	830.42	25

DAFLGSFLYEYSR	784.38	1121.49	25
MPC*TEDYLSLILNR	862.92	715.44	35
MPC*TEDYLSLILNR	862.92	797.61	35
MPC*TEDYLSLILNR	862.92	828.54	35
GLVLIAFSQYLQQC*PFDEHVK	831.76	963.69	20
GLVLIAFSQYLQQC*PFDEHVK	831.76	999.2	20
GLVLIAFSQYLQQC*PFDEHVK	831.76	1055.75	20

*cisteína carbamidometilada.

4 - Resultados e Discussão

4.1 - Desenvolvimento e validação do método analítico para avaliação da atividade da ACE1

A reação catalisada pela ACE1 converte o substrato natural de AG I para AG II, porém, para este estudo, a avaliação da atividade da ACE1 foi realizada com o substrato sintético HHL que gera o produto HA, de acordo a reação ilustrada na FIGURA 4.1. Isto se deve ao fato de que AG I e AG II são peptídeos e absorvem muito pouco no espectro de UV. Diferentemente do substrato e produto sintéticos utilizados.

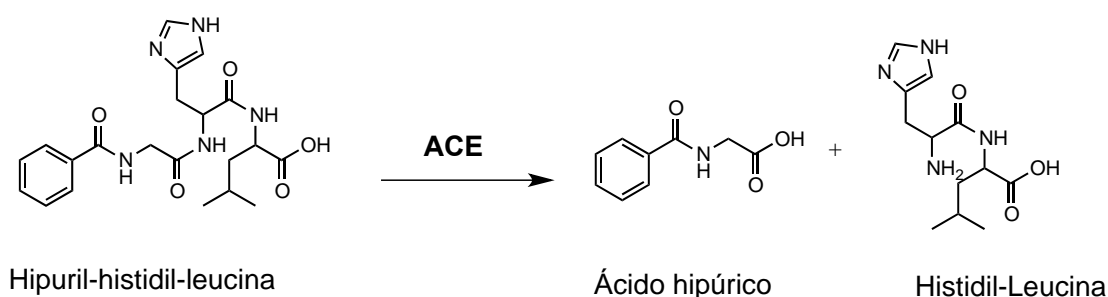


FIGURA 4.1 - Reação catalisada pela ACE1.

Para a avaliação da atividade da ACE1 seu substrato e produto foram separados cromatograficamente, pois do contrário, seria necessário fazer uma derivação do produto, uma vez que os compostos absorvem no mesmo comprimento de onda, como por exemplo no trabalho de Hayakari et al⁵². Portanto, os compostos foram separados em uma coluna C₈ (15 x 0,46 cm, Hypersil, 5 μm, 100 Å) no modo gradiente de eluição utilizando tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH 8,3 na bomba A e CH₃OH/CH₃CN (1:1 v/v) na bomba B. A separação cromatográfica de uma amostra padrão, na concentração de 200 μg.mL⁻¹, é apresentada na FIGURA 4.2.

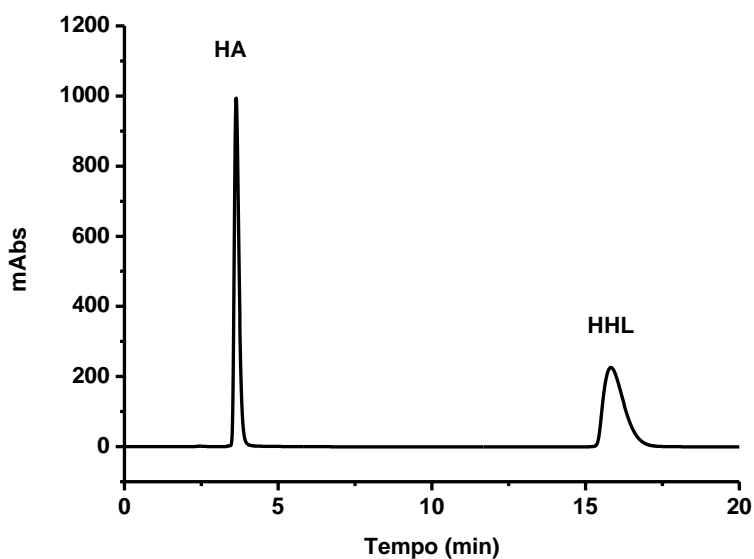


FIGURA 4.2 - Cromatograma de separação de HA e HHL na coluna C₈ (15 x 0,46 cm, Hypersil, 5 μm, 100 Å), vazão 0,8 mL.min⁻¹ e λ = 230 nm. Condições de análise: 0 – 6 min 7 % CH₃OH/CH₃CN (1:1) (isocrático); 6 – 8 min 85 % CH₃OH/CH₃CN (1:1) (gradiente); 8 – 12 min 85 % CH₃OH/CH₃CN (1:1) (isocrático); 12 – 14 min 7 % (gradiente); 14 – 19 min 7 % (isocrático).

Devido à grande diferença de polaridade entre os dois compostos foi necessário a análise no modo gradiente, pois se a análise fosse inteiramente no modo isocrático, o tempo de análise seria muito maior.

Uma vez determinadas as condições de separação de HA e HHL, foi possível avaliar a atividade da ACE1 através da área da banda do produto formado após a incubação do substrato com o extrato da enzima. Para terminar a reação enzimática, precipitar as macromoléculas e extrair o ácido hipúrico, três solventes orgânicos foram avaliados: CH₃OH; CH₃CN e isopropanol. Os cromatogramas para esta avaliação são apresentados na FIGURA 4.3.

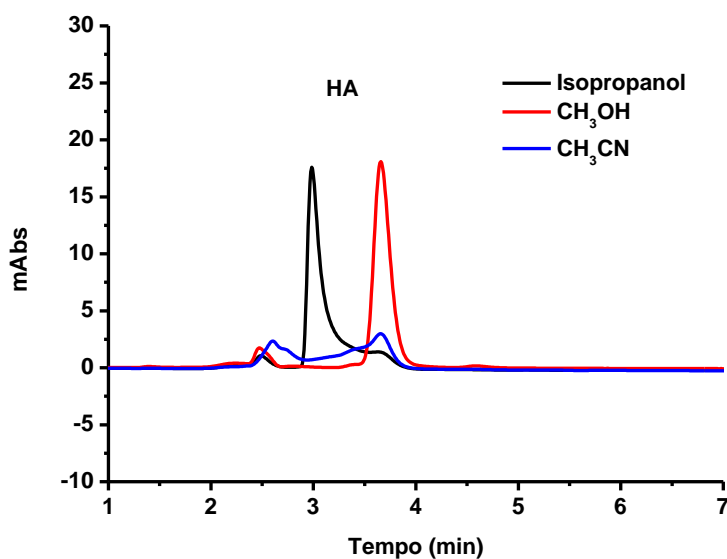


FIGURA 4.3 - Cromatograma comparativo para a precipitação da mistura de incubação da ACE1 com diferentes solventes — Isopropanol, — CH₃OH e — CH₃CN.

Ao compararmos a intensidade da banda do produto HA, para os três solventes utilizados, o cromatograma de extração com CH₃CN foi o que apresentou a banda de HA de menor intensidade e conseqüentemente, a acetonitrila foi o pior solvente para a extração. O isopropanol já apresentou uma melhor eficiência, mas afetou a eficiência cromatográfica não apresentou uma boa seletividade, pois a banda do HA sofreu um alargamento e teve o seu tempo de retenção diminuído. O CH₃OH foi o solvente que se demonstrou mais apropriado, entre os três avaliados, não só para a extração, mas também para a cromatografia, visto que a banda do HA além de boa intensidade é também simétrica. Portanto, o CH₃OH foi escolhido como solvente para precipitação.

A recuperação de extração foi avaliada pelo preparo de duas soluções contendo HA em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH 8,3 (amostras B e D) e outra contendo todos os outros componentes que poderiam interferir na extração do HA, como o NaCl, extrato de ACE1 (inativo) e HHL (amostras A e C). Sendo assim, a porcentagem de recuperação foi calculada a partir da razão da área da banda do HA das amostras A e C sobre as amostras B e D, respectivamente.

As amostras foram preparadas em triplicata para duas concentrações diferentes de HA, 5,0 e 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A TABELA 4.1 apresenta os resultados obtidos.

TABELA 4.1 - Precisão intra-dia (n=3).

Precisão		Recuperação	
Amostra	CV (%)	Amostra	Média (%)
A	3,58	A/B	52,3
B	1,08		
C	14,0	C/D	60,7
D	6,58		

A - HHL + tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3 + NaCl + HA (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + Extrato de ACE1 (Inativa). B - tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3 + HA (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). C - HHL + tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3 + NaCl + HA (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + Extrato de ACE1 (Inativa). D - tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3 + HA (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Os coeficiente de variação para as amostras analisadas foram abaixo de 15%. Os valores obtidos nas duas diferentes concentrações de HA foram 52% e 60% para 5,0 e 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Embora a recuperação de extração seja baixa, foram reprodutivos, o que permite o procedimento desenvolvido possa ser usado para quantificação de HA.

Para a quantificação do HA, o método cromatográfico foi validado no intervalo de linearidade de 100 a 9000 ng.mL^{-1} com o coeficiente de regressão linear $R^2 > 0,99$ e equação $y=17709,17801+215,32396x$. A precisão e exatidão intra e inter-dias foram avaliadas, obtendo-se coeficientes de variação que podem ser observados nas TABELA 4.2 e TABELA 4.3.

TABELA 4.2 - Precisão e exatidão intra-dia

Concentração (ng.mL ⁻¹)	CV %	Exatidão
100	14,5	83,6
500	4,30	88,0
750	4,44	102
1000	4,87	98,3
1500	5,05	92,5
3000	5,10	111
4000	3,91	99,7
5000	3,35	97,5
9000	3,65	99,8

TABELA 4.3 - Precisão e exatidão inter-dia

Concentração (ng.mL ⁻¹)	CV	Exatidão
300	4,69	89,6
8000	3,41	109

Com o preparo de amostra estabelecido e o método cromatográfico desenvolvido e validado, foi possível avaliar a atividade da ACE1 em diferentes etapas de sua obtenção.

4.2 - Obtenção da ACE1 e avaliação de sua atividade

4.2.1 - Extração e precipitação com sulfato de amônio

O processo de extração foi baseado no trabalho publicado por Chen et al⁵⁹, porém algumas adaptações foram feitas, uma vez que no trabalho original a extração é feita a partir de pulmão suíno utilizando, primeiramente, sulfato de amônio para extração de proteínas de membrana. Em seguida uma etapa de cromatografia de troca aniônica e duas etapas de cromatografia de afinidade foram realizadas, para a sua purificação.

Todas as etapas de manipulação do pulmão bovino foram realizadas a 4 °C para evitar degradação do material proteico. A FIGURA 4.4 ilustra o procedimento realizado, o procedimento detalhado é descrito na seção 3.2.

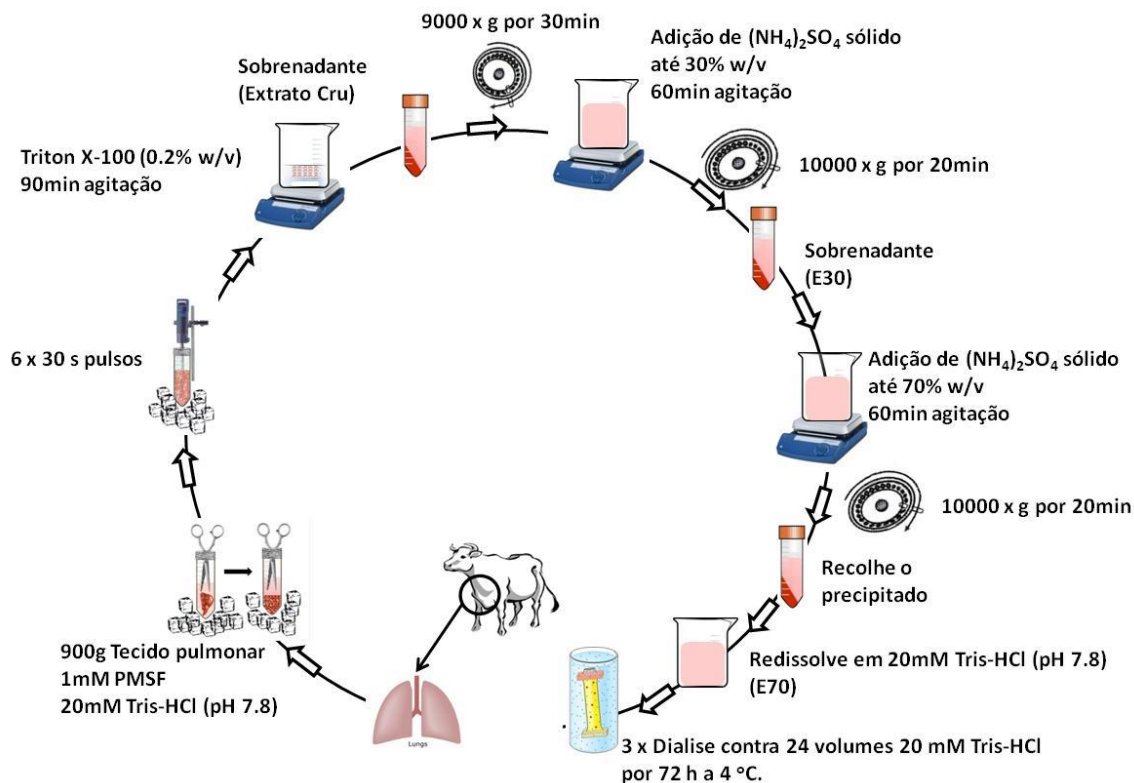


FIGURA 4.4 - Procedimento de extração de ACE1 a partir de pulmão bovino.

Após a diálise, as amostras foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C até a etapa seguinte de purificação.

Para monitorar o processo de extração e certificar-se de que a ACE1 estaria ativa durante o processo foram realizados testes de atividades com as alíquotas obtidas. A primeira alíquota foi obtida do extrato cru, ou seja, após a remoção de lipídeos, restos de tecidos e outras organelas, foi adicionado Triton-X para uma melhor solubilização de proteínas de membrana. A segunda alíquota obtida foi após a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido na proporção de 30% m/v (sobrenadante E30) que levou a precipitação de proteínas conforme a neutralização de suas cargas. A última alíquota retirada foi após a adição de sulfato de amônio sólido na proporção de 70% m/v (precipitado E70) no qual a proteína de interesse foi precipitada.

O teste de atividade foi desenvolvido baseado em trabalhos da literatura como Cushman et al⁵⁰, Hayakari et al⁵² e Chiknas⁵³. As soluções de incubação utilizadas estão descritas na seção 3.6 e as quantidades de tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH 8,3 e extrato de ACE1 (para uma concentração final de 10 mg.mL^{-1}) variaram de acordo com a quantidade de proteína total obtida no teste

de Bradford realizado para as alíquotas obtidas. A TABELA 4.4 mostra a composição das soluções de incubação para as alíquotas obtidas.

TABELA 4.4 - Composição das soluções de incubação para teste de atividade

Nome	Tampão (μL)	HHL (μL)	NaCl (μL)	Extrato ACE1 (μL)	Vol. Total (μL)	Conc. Total Proteína (mg.mL^{-1})
Extrato Cru	417	25	50	8	500	615
E30	404	25	50	21	500	241
E70	335	25	50	90	500	56

Após 50 min de incubação as amostras foram analisadas no sistema cromatográfico. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na FIGURA 4.5.

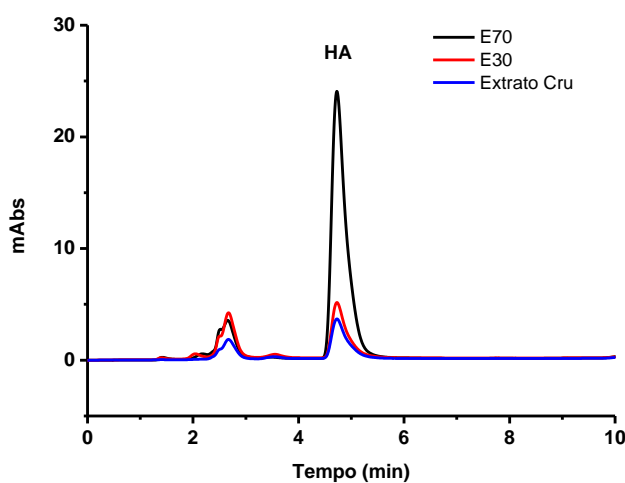


FIGURA 4.5 - Cromatograma comparativo da análise da atividade de três diferentes alíquotas do processo de extração da ACE1.

As três alíquotas analisadas apresentaram atividade, confirmando a presença da ACE1 em cada etapa do processo. Além disso, é possível notar um aumento na atividade enzimática conforme a sua purificação, uma vez que a quantidade de proteína total diminui, há uma maior produção de HA.

4.2.2 - Purificação da ACE1 por cromatografia de troca aniônica (DEAE)

Seguindo as etapas de purificação do método de Chen et al⁵⁹, foi realizado a purificação por cromatografia de baixa pressão de troca aniônica sob as condições experimentais mencionadas na seção 3.7. Primeiramente, o ensaio foi realizado em escala analítica para avaliar o perfil cromatográfico e determinar o tempo de retenção da ACE1 através dos ensaios enzimáticos, em solução, das frações coletadas. O resultado desse análise está ilustrada na FIGURA 4.6.

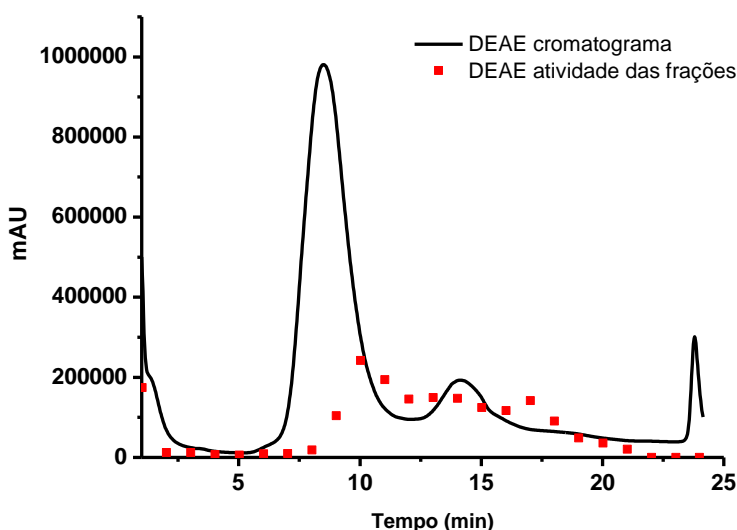


FIGURA 4.6- Cromatograma de purificação de uma amostra de 1 mg.mL⁻¹ de extrato de ACE1 em uma coluna DEAE e o perfil de atividade das frações coletadas.

Durante a análise, 23 frações foram coletadas e os testes de atividade foram realizados para determinar em qual fração a ACE1 estaria eluindo. Neste contexto, a fração 10 foi a que apresentou maior atividade. No entanto, a atividade da ACE1, e consequentemente a sua eluição, ocorre a partir da fração 9 (em torno de 10% do gradiente salino) e se estende até a fração 20. O objetivo dessa etapa de purificação por DEAE era eliminar a maior quantidade de proteína interferente possível, o que foi dificultado pelo perfil da banda cromatográfica. Apesar disso, essa análise preliminar em escala analítica forneceu uma ideia do tempo/volume no qual a enzima seria obtida. Assim, foi empacotada uma coluna com resina DEAE e volume interno de aproximadamente

160 mL (2,6 x 30 cm), o que em princípio, forneceria uma maior capacidade de troca podendo evitar o alargamento da banda. Desta forma, foi preparado uma solução de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pesando 500 mg de extrato de ACE1 e dissolvendo em 10 mL de tampão Tris-HCl $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,8. Todo o volume foi injetado no sistema cromatográfico. O cromatograma adquirido é mostrado na FIGURA 4.7.

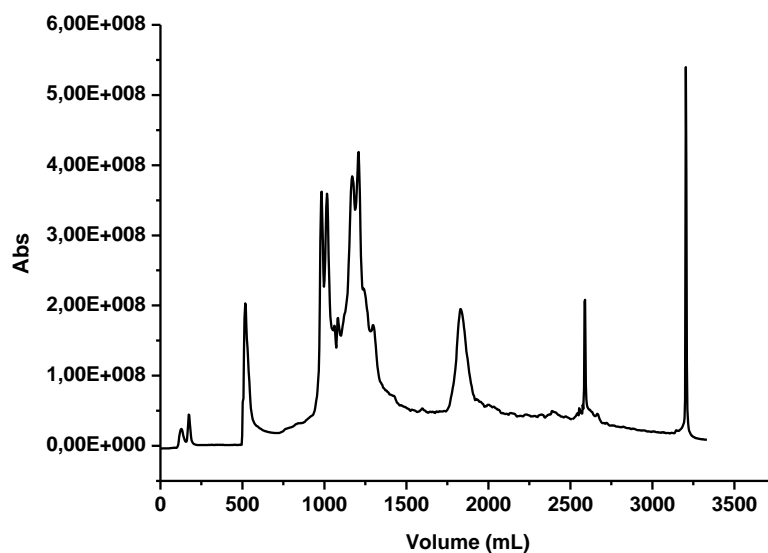


FIGURA 4.7 - Cromatograma de purificação de uma amostra de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extrato de ACE1.

Durante a análise, aproximadamente, 350 frações foram coletadas e os testes de atividade foram realizados entre as frações 180 a 213 (15 mL por fração), uma vez que já se conhecia em qual porcentagem do gradiente salino (em torno de 10 %) a proteína seria eluída.

Para confirmar a presença de ACE1, as frações foram misturadas e uma eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada como mostrado na FIGURA 4.8.

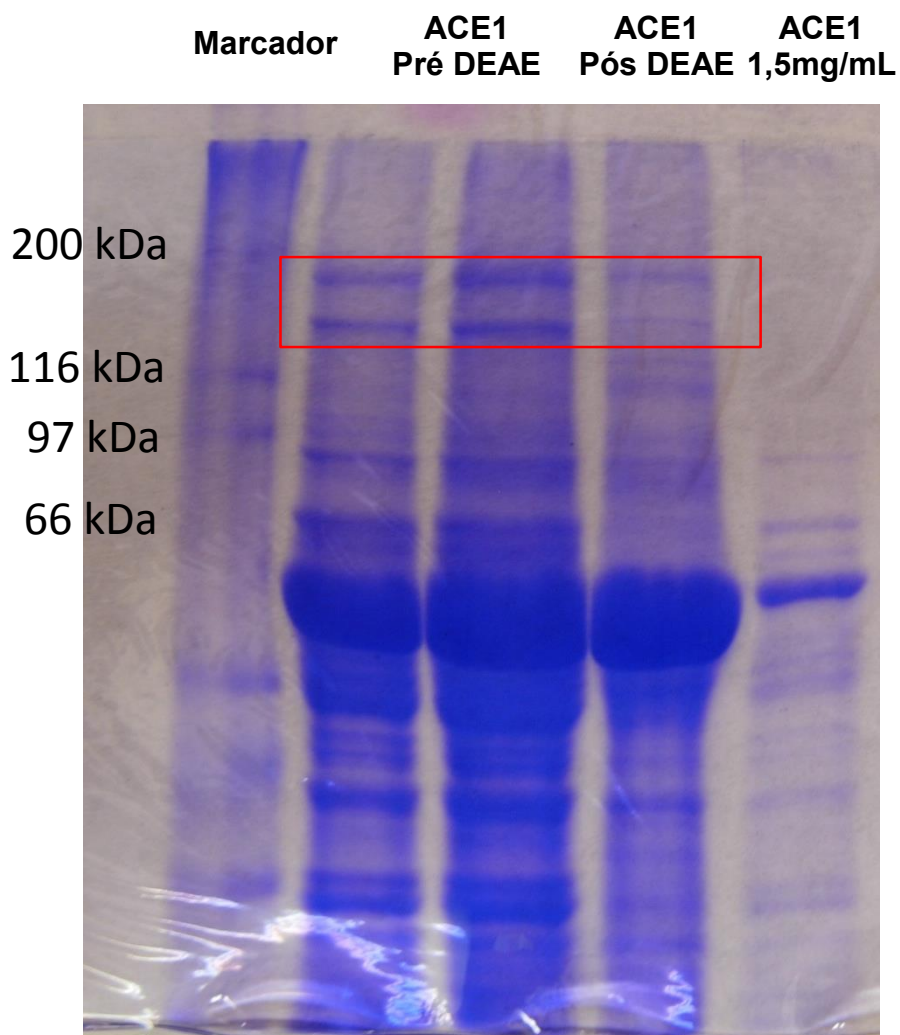


FIGURA 4.8- SDS-PAGE após a purificação pela coluna DEAE.

Como destacado no gel, em contorno vermelho, é possível observar a presença de uma banda na região entre 200 kDa e 116 kDa sugerindo a presença da ACE1 (150 kDa) tanto na amostra pré DEAE como na amostra pós DEAE. Outra observação importante a ser feita é que quando comparamos as amostras antes e depois de DEAE não existe uma significativa diferença quanto à presença de outras proteínas. Em outras palavras, a cromatografia por DEAE não foi eficiente em eliminar proteínas indesejáveis na amostra, como hemoglobina e albumina.

Desta maneira, foi necessário encontrar um processo de purificação que pudesse excluir proteínas mais abundantes e aumentar a concentração relativa da ACE1. Novas formas de purificação foram consideradas, como a cromatografia de exclusão por tamanho e membranas de filtração por peso molecular. Devido à grande quantidade em massa de extrato, em torno de 11 g, e

considerando o processo laborioso que seria a realização de diversas injeções cromatográficas de exclusão por tamanho, preferiu-se a purificação utilizando filtros de exclusão por tamanho, mais especificamente de 100 kDa.

4.2.3 - Purificação do extrato de ACE1 utilizando filtros de exclusão por tamanho (FET)

Neste sentido, estes filtros apareceram como uma alternativa devido a eficiência e rapidez do processo de exclusão de macromoléculas abaixo de 100 kDa.

Inicialmente, para avaliar a melhor concentração foram solubilizadas diferentes massas do extrato ACE1, sendo 12, 24 e 36 mg, resultando em concentrações de 1 mg.mL^{-1} , 2 mg.mL^{-1} e 3 mg.mL^{-1} , respectivamente. Desta maneira, os mesmos volumes de 50 mL foram passados pelos filtros para uma das três concentrações. Os resultados das filtrações foram avaliadas por SDS-PAGE (FIGURA 4.9).

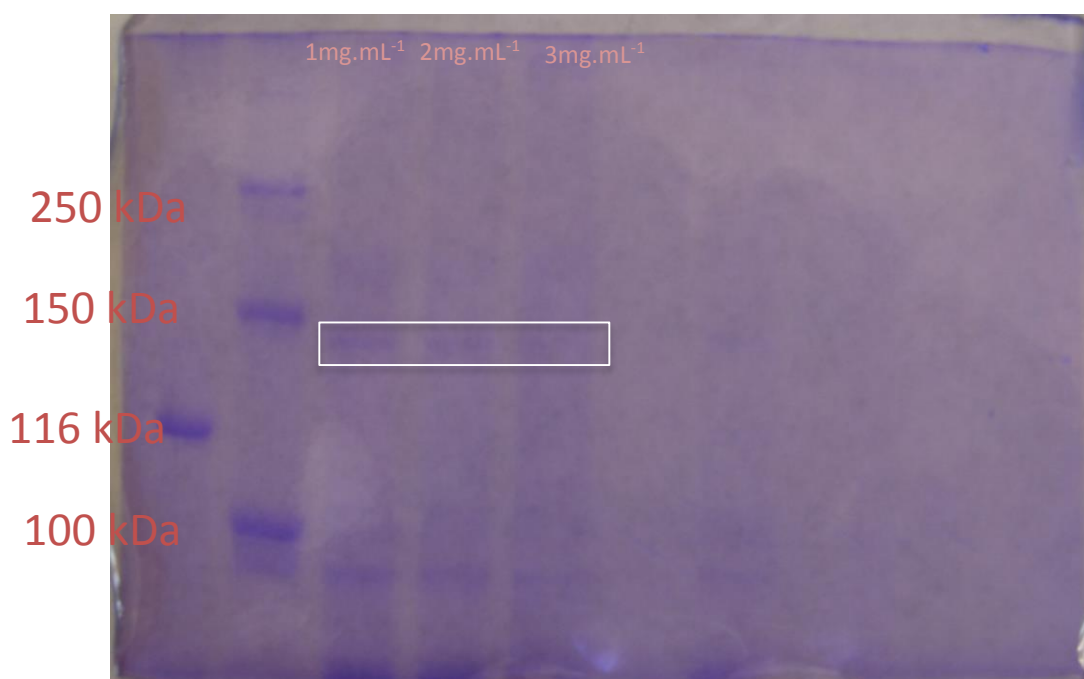


FIGURA 4.9 - SDS-PAGE para três diferentes concentrações de extrato de ACE1 pós filtração com filtros de *cutoff* de 100 kDa.

Apesar de o gel acima não apresenta uma diferença significativa na intensidade da banda, na faixa de peso molecular esperado para a ACE1, 150

kDa, para as três concentrações preparadas, experimentalmente, observou-se que a solução de 1 mg.mL^{-1} foi se tornando menos avermelhada mais rapidamente, conforme os ciclos de filtração, quando comparada as outras duas concentrações. Assumindo-se que a coloração avermelhada estivesse associada a presença de hemoglobina, a filtração da solução mais diluída estava sendo mais eficiente em excluir as demais proteínas.

Adicionalmente foi medida a atividade da enzima antes e após as filtrações para avaliar se não havia perda de atividade por conta de denaturação. Os cromatogramas comparativos estão mostrados na FIGURA 4.10.

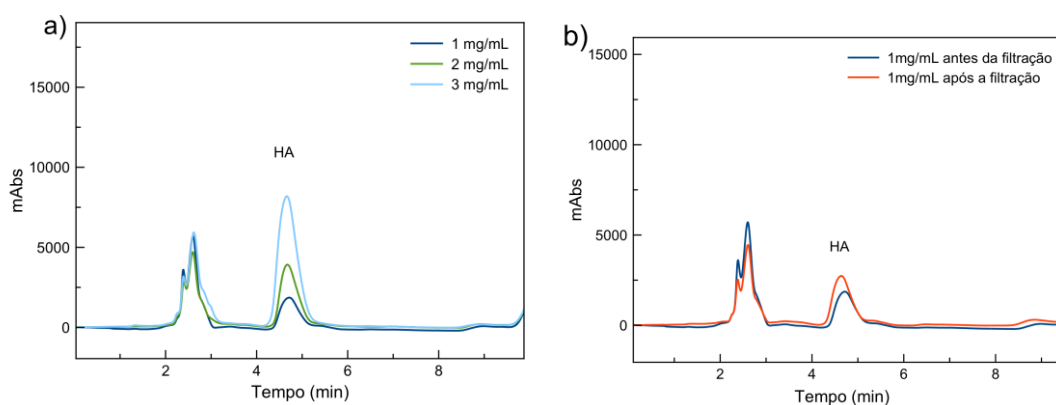


FIGURA 4.10 - Cromatogramas obtidos para a determinação da concentração do extrato ACE1 para filtração. a) Cromatogramas comparativos de HA formado a partir de diferentes concentrações de extrato ACE1. b) Cromatogramas comparativos da formação de HA antes e depois da filtração.

Ao observar a FIGURA 4.10 a), apesar de haver uma maior produção de HA em concentrações maiores de extrato de ACE1 a eficiência de exclusão das demais proteínas, observada pela diminuição da coloração avermelhada das soluções filtradas a concentração escolhida para se trabalhar foi a de 1 mg.mL^{-1} (dissolução de 12 mg em 12 mL de tampão).

Uma vez determinada a concentração da solução a ser filtrada, foi necessário avaliar a influência do processo de filtração na atividade da ACE1. Como pode ser observado no cromatograma da FIGURA 4.10 b) a atividade da enzima aumentou após o processo de filtração indicando que o processo foi eficiente em excluir outras proteínas e também que o mesmo processo não acarreta na denaturação da enzima. Desta maneira, esse processo foi repetido

exaustivamente até que todo o material liofilizado tivesse sido filtrado. Após a filtração as amostras foram congeladas e liofilizadas.

4.2.4 - Purificação por cromatografia de afinidade por sítios de glicosilação na resina de Concanavalina-A (ConA)

Após a purificação por filtração o extrato da ACE1 (liofilizado) ficou com uma coloração mais clara, menos avermelhada dando indícios de que a maior parte da hemoglobina teria sido removida. Em seguida, foi realizada a purificação por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de ConA (2,6 x 20 cm) com capacidade de ligação por afinidade de 20 a 45 mg tiroglobulina suína por mL de resina. O intuito dessa etapa foi a exclusão de proteínas não glicosiladas e o resultado dessa análise é ilustrado na FIGURA 4.11.

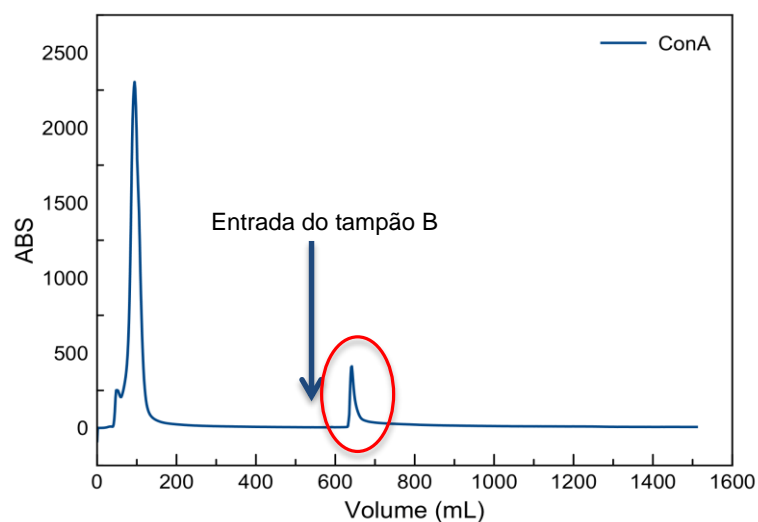


FIGURA 4.11 - Cromatograma de purificação de 500 mg de extrato de ACE1 na coluna de ConA.

Como é observado no cromatograma acima, há uma grande exclusão de proteínas não glicosiladas com eluição do tampão A e em seguida após, aproximadamente 1 volume da coluna, da entrada do tampão B as proteínas glicosiladas, que ficaram retidas na coluna durante a “limpeza” com o tampão A, são eluídas. 58 frações foram coletadas a partir da entrada do tampão B e para a medida de suas atividades as frações foram combinadas de 2 em 2 (ex. Fração 1 + 2 = 1 medida de atividade), concentradas e liofilizadas gerando 29

medidas de atividade em solução. Os cromatogramas comparativos resultados dessas atividades estão mostrados na FIGURA 4.12.

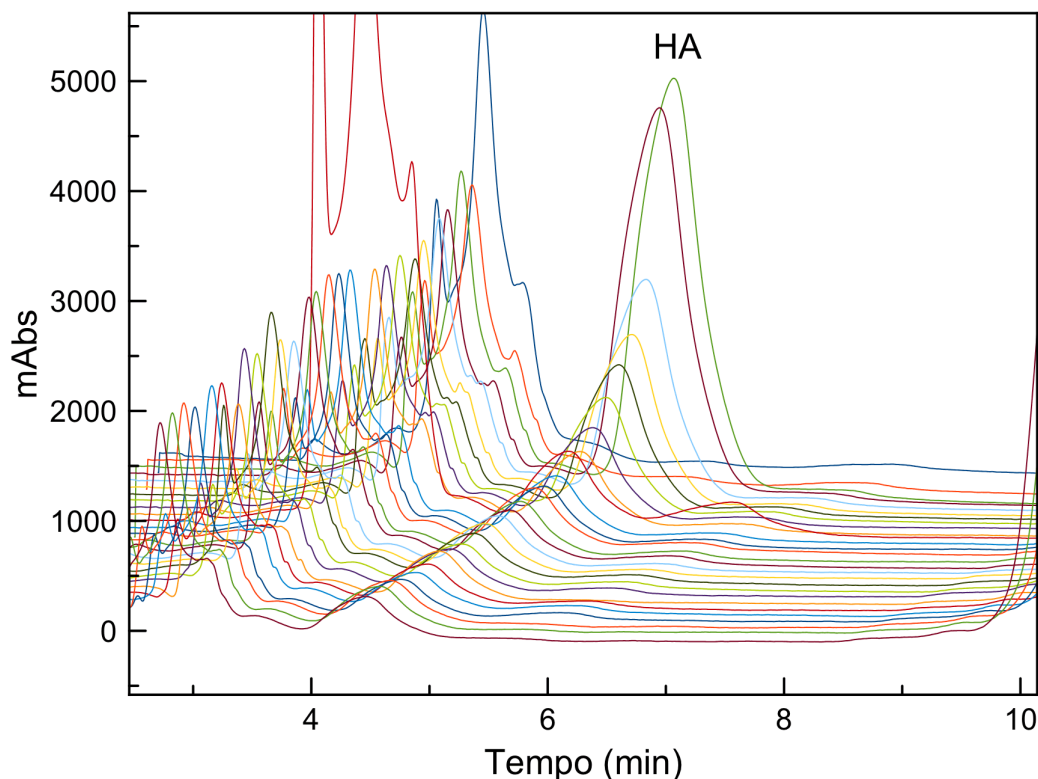


FIGURA 4.12 - Cromatograma da atividade das frações eluídas da coluna de ConA.

Nas duas primeiras medidas de atividade (frações 1+2 e 3+4) não foi apresentada nenhuma formação do produto HA, enquanto que a atividade começa a ser observada a partir da terceira medida (frações 5+6), sendo a maior atividade apresentada, e vai decrescendo até as últimas frações. A maior atividade apresentada coincide com o começo da banda cromatográfica destacada em vermelho na FIGURA 4.11. As frações 5 a 18 foram misturadas e dialisadas contra o tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,8 e em seguida transferida para um balão de fundo redondo para ser congelada e liofilizada. Após a liofilização, o aspecto do sólido era bem mais claro e límpido do que o aspecto apresentado anteriormente a essa etapa de purificação. Para avaliar a pureza, foi corrido um gel de SDS-PAGE com coração por prata de uma solução de 1 mg.mL⁻¹, como pode ser observado na FIGURA 4.13.

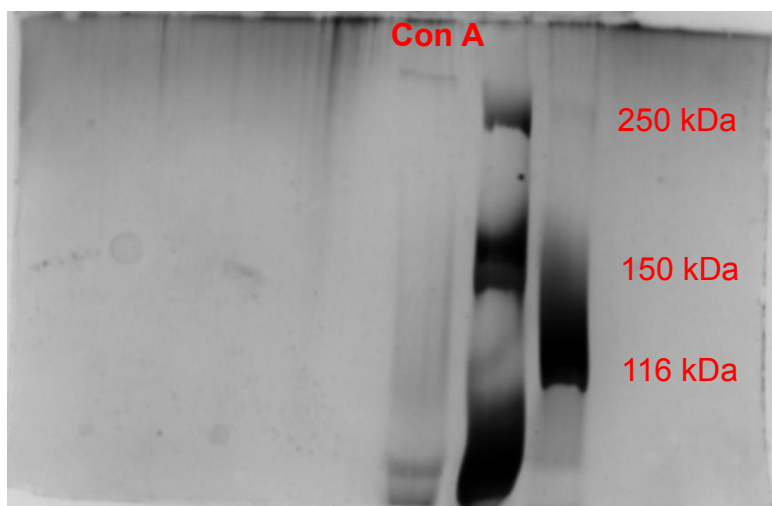


FIGURA 4.13 - Gel de SDS-PAGE de uma solução de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de ACE1 pós coluna de ConA.

Mas devido à baixa concentração da enzima não foi possível observar nenhuma banda em torno de 150 kDa que seria referente a ACE1. Mesmo assim, foi realizado o ensaio de atividade da amostra pós-ConA para verificar se haveria alguma perda de atividade quando comparado às outras frações mais impuras. Para isso foram preparadas soluções de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de cada fração (Extrato, pós-FET e pós-Con A) em 1 mL de tampão Tris-HCl $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,8 e as suas atividades foram medidas. Os cromatogramas estão mostrados na FIGURA 4.14.

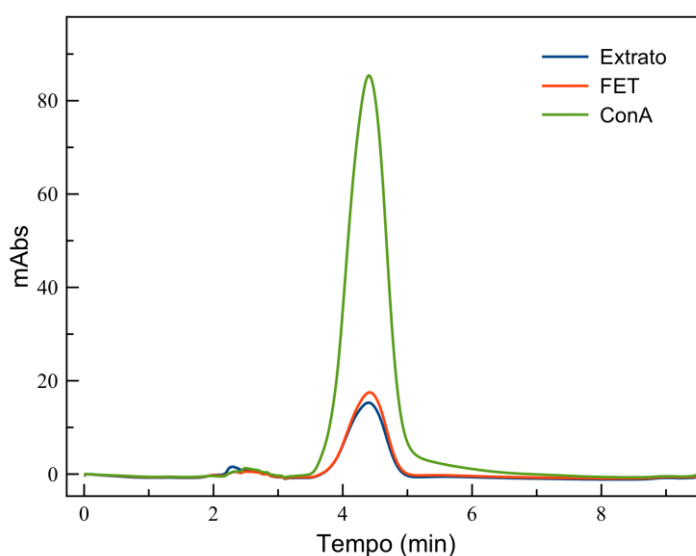


FIGURA 4.14 – Cromatogramas da atividade de diferentes etapas de purificação da ACE1.

Uma vez que a concentração das frações foram as mesmas era esperado ter um aumento da atividade conforme o avanço da purificação ACE1. Neste sentido, a FIGURA 4.14 confirma essa tendência demonstrando que o processo de purificação foi eficiente.

4.2.5 - Purificação da fração pós-Con A por cromatografia de afinidade na resina de Sepharose-Lisinopril

Para a última etapa de purificação da ACE1, foi sintetizada a resina Sepharose-Lisinopril como descrito na seção 3.10.1. Para a purificação, a ACE1 foi eluída seguindo as condições descritas na seção 3.10.2 e posteriormente as frações coletadas foram submetidas ao teste de atividade para identificar em qual fração a ACE1 estaria eluindo.

O resultado das atividades está mostrada na FIGURA 4.15. Como é observado, a fração que apresentou a maior atividade foi a primeira fração que foi eluída com o tampão de condicionamento da coluna, o que não era esperado, pois nas primeiras frações deveria sair apenas as proteínas que não tivessem afinidade com a resina e não a ACE1. Apesar disso, parte da ACE1 ficou retida na coluna e foi eluída apenas com a entrada da solução de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 50 mmol.L⁻¹, pH 9,5, na fração 7, e a atividade pode ser observada na fração 9.

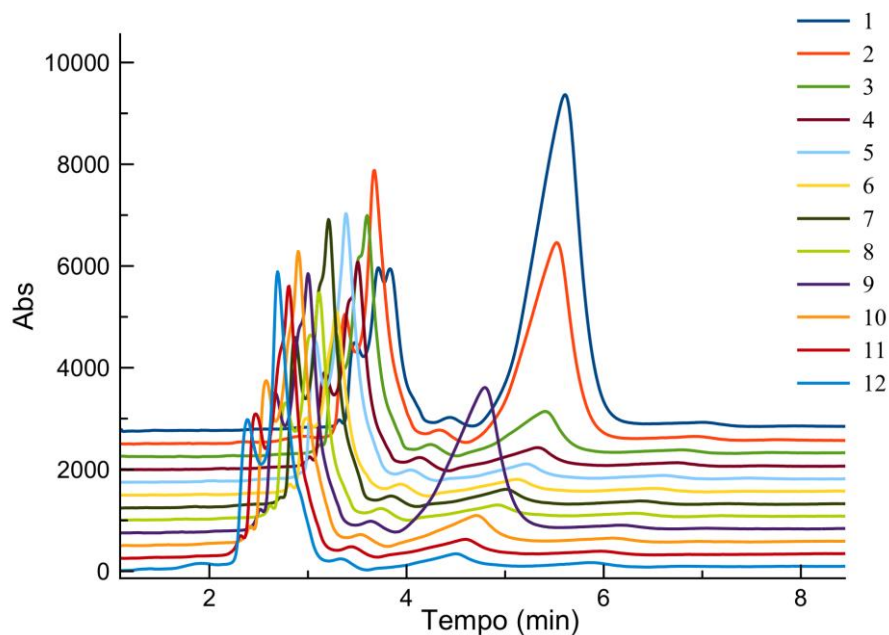


FIGURA 4.15 - Cromatogramas das atividades das frações eluídas a partir da coluna de Sepharose-Lisinopril.

A explicação para a grande perda de ACE1 nas duas primeiras frações é que pode ter acontecido devido à presença de artefatos que estivessem tendo algum tipo de interação inespecífica com a resina, ocupando os sítios de interação entre o Lisinopril e a ACE1, fazendo com que parte da ACE1 aplicada na coluna fosse eluída rapidamente. Para verificar a pureza das frações eluídas, foi realizado um gel de SDS-PAGE com coloração por prata apenas para as frações que apresentaram atividade (1, 2, 3, 9 e 10), como mostrado na FIGURA 4.16.

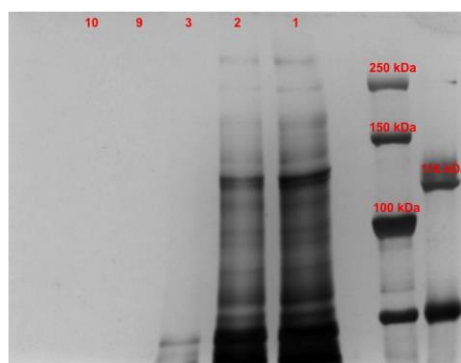


FIGURA 4.16 - SDS-PAGE com revelação por prata das frações eluídas da coluna Sepharose-Lisinopril.

Dentre as frações que apresentaram atividade, apenas para as duas primeiras foi possível visualizar bandas na região de 150 kDa e as frações que eluíram ainda com o tampão de lavagem continham outras proteínas além da ACE1. Enquanto que, não foi possível detectar nenhuma proteína nas frações 9 e 10, no SDS-PAGE, apesar de ter apresentado atividade.

Para contornar o problema da falta de retenção da ACE1 na coluna, após a suspensão da ACE1 (liofilizada) a solução foi filtrada utilizando-se os FETs para tentar excluir esses artefatos que de alguma forma estariam competindo com os sítios de afinidade entre lisinopril-ACE1, assumindo que eles tivessem massa molecular menor que 100 kDa. Além disso, foi colocado um filtro na parte superior da resina, pois quando houvesse a aplicação da amostra, se a resina não ressuspendesse, isso poderia comprometer a eluição da amostra causando a sua dispersão por toda a coluna. E por fim, o fluxo foi controlado com o auxílio de uma bomba peristáltica sendo ajustado para $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Dessa, maneira foi realizada mais uma corrida aplicando-se um menor volume de amostra, $500 \mu\text{L}$. O perfil das atividades das frações eluídas pela coluna Sepharose-lisinopril é ilustrado pelos cromatogramas mostrado na FIGURA 4.17.

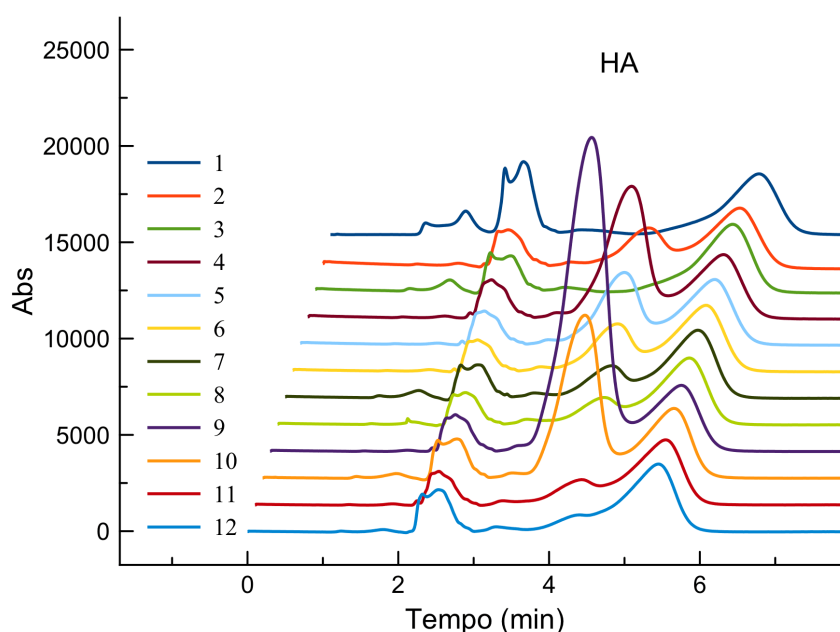


FIGURA 4.17 - Cromatogramas das atividades das frações eluídas a partir da coluna de Sepharose-lisinopril após limpeza com FET.

Apesar do aparecimento de um interferente logo após a banda do HA foi possível avaliar a formação do HA em diferentes frações eluídas da coluna Sepharose-lisinopril. Como ilustrado na FIGURA 4.17, há uma significativa mudança no padrão de eluição da ACE1 pela coluna, através de suas atividades. As primeiras frações, que antes apareciam com a maior atividade, apresentaram uma menor atividade e as frações 9 e 10, que deveriam apresentar maior atividade, de fato apresentaram indicando que a utilização dos FETs foram eficientes na remoção de artefatos que interferiam na retenção da ACE1 na coluna Sepharose-lisinopril.

Após extensivas repetições, as frações 9 e 10 de cada eluição foram combinadas e dialisadas contra tampão Tris-HCl 1 mmol.L⁻¹ pH 7,2 utilizando FET com *cutoff* de 100 kDa para ser aplicada a um gel de SDS-PAGE com revelação por prata a fim de verificar a sua pureza, como apresentado na FIGURA 4.18.

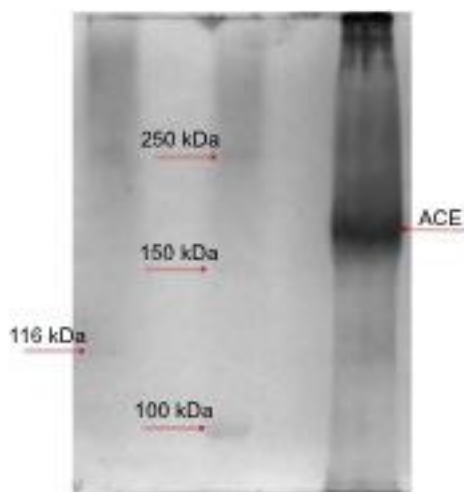


FIGURA 4.18 - Gel de SDS-PAGE com revelação por prata das frações 9 e 10 eluídas da coluna Sepharose-lisinopril.

O restante da amostra foi congelada e liofilizada. Ao final da liofilização obteve-se 6,2 mg de material.

Para a confirmação da atividade da ACE1, 1 mg do material final foi pesado e ressuscitado em 1 mL de tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹ pH 7,2. E os ensaios de atividade foram realizados variando a quantidade de enzima utilizada para verificar se a produção de HA estaria relacionada com a quantidade de enzima, confirmando-se assim a presença da ACE1. Na TABELA 4.5 está apresentada as soluções utilizadas.

TABELA 4.5 - Soluções utilizadas para o ensaio de atividade

	Tampão fosfato (10 mmol.L ⁻¹) pH 8.3	NaCl (3 mol.L ⁻¹)	HHL (5 mmol.L ⁻¹)	Enzima (1 mL.min ⁻¹)	Volume total (µL)
E10	440	25	25	10	500
E25	425	25	25	25	500
E50	400	25	25	50	500
E75	375	25	25	75	500
E100	350	25	25	100	500

A incubação foi realizada por 50 minutos à 37 °C sob agitação constante, a reação foi interrompida com a adição de 500 µL de MeOH. As soluções foram agitadas e centrifugadas a 10000 rpm durante 15 minutos e 200 µL de cada solução foram transferidos para serem analisados no sistema cromatográfico. A FIGURA 4.19 mostra os cromatogramas obtidos para cada incubação.

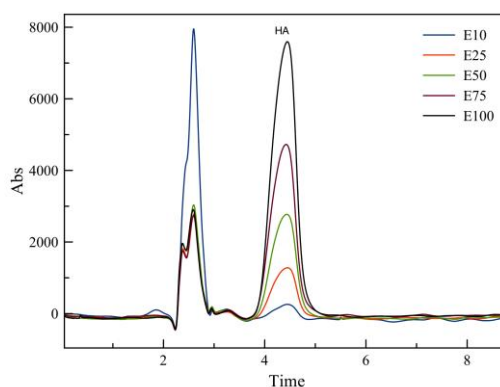


FIGURA 4.19 - Cromatogramas para as diferentes ensaios de atividade.

Como ilustrado na FIGURA 4.1 a intensidade da banda de HA aumenta conforme há uma maior quantidade de enzima utilizada no ensaio de atividade, confirmando que a enzima permanece ativa.

A TABELA 4.6 resume o processo de extração e mostra a eficiência de cada etapa de purificação.

TABELA 4.6 - Purificação da ACE1 de 900 g de pulmão bovino

Etapa de purificação	Proteínas totais (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Purificação (fold)
Extrato (NH ₄) ₂ SO ₄	10800	5765,24	0,53	1
FET 100kDa	4200	5187,24	1,23	2,32
ConA FPLC	74	992,82	13,41	10,90
Sepharose-lisinopril	6,2	10644,76	1716,90	128,03

Para cada etapa de purificação da ACE1, houve um aumento na atividade específica, no entanto quando um ensaio de atividade foi realizado para uma solução de cada etapa de purificação na mesma concentração de 1 mg.mL⁻¹ de proteína, observou uma grande perda de atividade após a última etapa de purificação quando comparado às outras. Isso pode ser observado pela menor formação de produto HA na FIGURA 4.20.

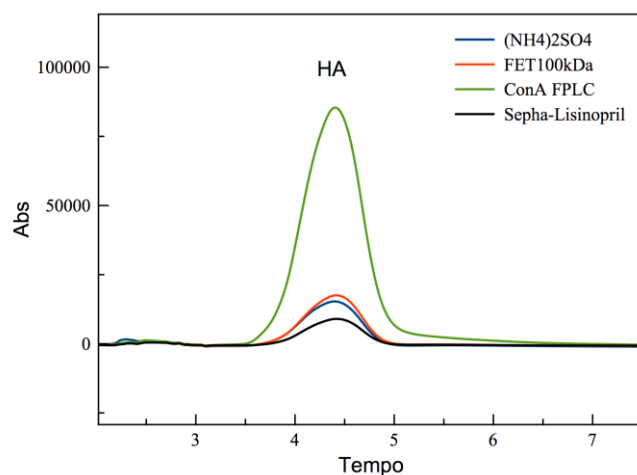


FIGURA 4.20 – Cromatogramas ilustrando a formação de HA para os ensaios de atividade em cada etapa de purificação.

Apesar de uma significativa diminuição na atividade enzimática para a última etapa de purificação a ACE1 foi purificada com sucesso, e com o intuito de confirmar a sua presença de forma direta, foi realizada uma análise por nanoLC-MS/MS.

4.3 - Identificação da ACE1 por nanoLC-MS/MS

Com a confirmação da atividade da ACE1 através de diversos ensaios e a baixa intensidade de sua banda no gel de SDS-PAGE por revelação com prata, foi realizado mais um experimento para a comprovação de sua identidade.

Como descrito na seção 3.11 a ACE1 (Con A) foi digerida e os seus peptídeos analisados no sistema nanoLC-MS/MS. Para isso, foi utilizada a aquisição dependente de dados (DDA, *Data Dependent Acquisition*) na qual um número determinado de picos é selecionado em um espectro de varredura, usando regras pré-determinadas, para um segundo experimento de espectrometria de massas sequencial⁸⁵. Assim, o arquivo bruto foi processado no software Proteome Discovery 1.4 (Thermo Scientific, EUA) utilizando a ferramenta de busca Mascot (Matrix Science, Reino Unido) contra o banco de dados de proteína NCBI nr com filtro para “mamíferos”. Os critérios para busca utilizados foram: tripsina como protease; carbamidometilação em cisteínas como modificação fixa; oxidação de metionina como modificação variável; tolerância de massa para o íon precursor de 10 ppm e 0,6 Da para todos os íons fragmentos.

Foram identificadas 133 proteínas com mais de três peptídeos cada, dentre elas, a ACE1 bovina foi identificada com 20,8 % de cobertura e todos os seus peptídeos identificados foram filtrados com alta confiança, ou seja, com uma taxa de identificação falsa menor que 1 % (FDR, *False Discovery Rate*). Além disso, dentre os 23 peptídeos identificados, 18 peptídeos são únicos, dando uma confiabilidade ainda maior de sua identidade. A TABELA 4.7 apresenta o detalhamento da identificação da ACE 1 de *Bos taurus*.

TABELA 4.7 - Resultado da identificação da ACE 1 por nanoLC-MS/MS com busca em banco de dados de proteínas

Accession Number - Description	Score	Coverage %	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]
331284213 - angiotensin I converting enzyme [Bos taurus]	996.93	20.83	18	23	48	1306	150.0
A2	Sequence	# PSMs	Modifications	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
High	TLGPANLDLEK	2		2	1170.63603	-0.43	36.48
High	GPQFGSEVELR	1		2	1218.61125	-0.11	35.35
High	YNYDWWYLR	2		2	1378.62212	0.44	50.16
High	QDGFSDTGAYWR	2		2	1402.60173	-0.38	37.78
High	LEPDLTNLMATSR	1		2	1460.74333	1.30	43.00
High	SWYDSPTFTEDLER	3		2	1745.76604	0.38	45.46
High	ALLQAGSSRPWQEVLK	2		2	1782.98906	1.62	40.93
High	TAPcWSLDPELTNILASSR	6	C4(Carbamidomethyl)	2	2131.05083	0.89	54.49
High	LQEEAALLSQEFSEAWGQK	5		2	2164.06670	5.04	53.03
High	INLLSSGDGGYEEDINFLMK	1		2	2215.06645	3.44	53.86
High	EAGHQGPLHQcDIYQSTQAGAK	3	C11(Carbamidomethyl)	3	2396.10257	-0.96	26.57
High	VFDGSVTR	2		2	880.45281	0.52	24.43
High	LEGPFGVSGR	2		2	1018.53075	-0.92	32.57
High	SQDDFDPGAK	2		2	1079.46477	0.67	23.88
High	KFVEEYDR	2		2	1085.52617	-0.07	23.95
High	FVEEYDRR	2		2	1113.53227	-0.11	23.69
High	SMLEKPTDGR	1		2	1133.56243	0.37	21.84
High	YQGVcPPLAR	1	C5(Carbamidomethyl)	2	1160.58721	-0.80	30.90
High	YQGIcPPVVR	2	C5(Carbamidomethyl)	2	1188.61968	0.20	33.43
High	NYQDLAWAWK	3		2	1294.62187	0.26	46.02
High	LKYQGVcPPLAR	1	C7(Carbamidomethyl)	3	1401.76654	-0.45	31.82
High	TLGPANLDLEKR	1		2	1326.73638	-0.97	33.83
High	GANPGFHEAIGDVLALSVPAPHLHK	1		3	2638.38169	3.02	47.08

4.4 - Avaliação da estabilidade da enzima em possíveis condições de imobilização

Uma vez que o processo de purificação estava estabelecido, foi possível partir para a etapa de desenvolvimento do reator enzimático. Para a imobilização da enzima foi necessário conhecer a sua estabilidade em diferentes condições, pois geralmente as condições determinadas para obtenção da sua melhor atividade são agressivas e irreversíveis para a sua estabilidade. Neste sentido foi determinado um tampão para a realização da imobilização e ensaios de atividade e outro para o seu armazenamento.

De acordo com as condições determinadas por Cushman e Cheung⁵⁰, as melhores condições afim de obter a melhor atividade da ACE1 em solução estão apresentadas na TABELA 4.8.

TABELA 4.8 - Tabela com as melhores parâmetros encontrados por Cushman e Cheung⁵⁰ para a atividade da ACE1

	Tampão	pH	Temp.	NaCl	Tempo de incubação
Condições	Tampão fosfato 100 mmol.L ⁻¹	8,3	37 °C	300 mmol.L ⁻¹	50 min

Além disso, neste mesmo trabalho, Cushman e Cheung testaram a atividade em diferentes tampões como Tris-HCl e borato, obtendo uma atividade 40 % menor quando comparado ao tampão fosfato, porém quando levado de volta ao tampão fosfato a atividade era restabelecia.

Levando em consideração que toda a extração/purificação da ACE1 foi feita em tampão Tris-HCl e seus ensaios de atividade realizados em tampão fosfato, foi considerado como condições para armazenamento da enzima, o tampão Tris-HCl e para as condições de análise e imobilização, o tampão fosfato.

Devido às condições utilizadas para a imobilização da enzima, é recomendado que não se utilize o tampão Tris-HCl, pois o Tris apresenta um grupo amino que compete com os grupos – NH₂ da cadeia lateral dos resíduos de lisina da ACE1, criando uma competição para a reação com o grupo aldeído do glutaraldeído e formação das bases de Schiff. Para isso, foi avaliada a

estabilidade da ACE1 nesse tampão durante 24 horas através de diversos ensaios enzimáticos, retirando-se alíquotas de 50 μL da solução de ACE1. A FIGURA 4.21 mostra os cromatogramas obtidos.

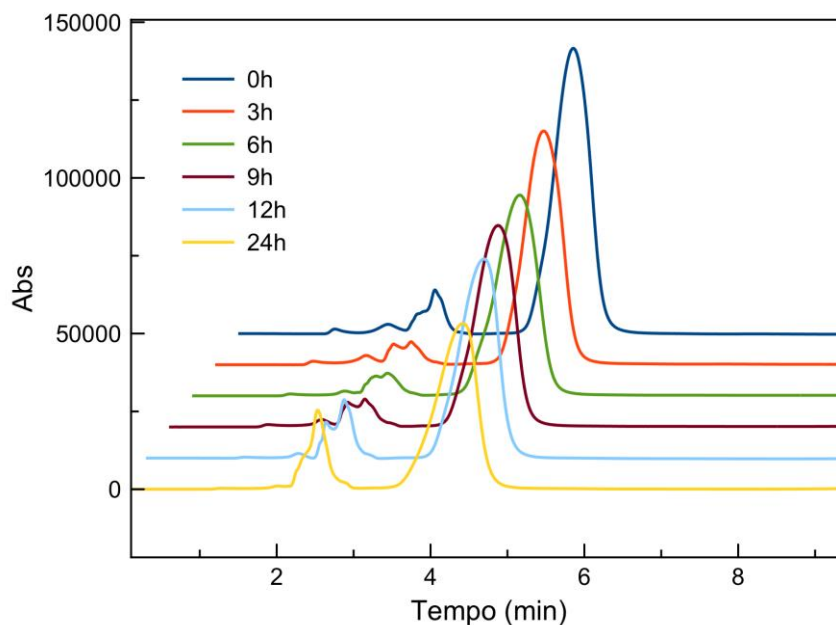


FIGURA 4.21 - Cromatogramas da atividade da ACE1 ao longo de 24 horas em tampão fosfato 100 mmol.L^{-1} , pH 8,3.

Como é possível observar, houve um decréscimo na formação de HA ao longo do tempo, demonstrando um processo natural de denaturação e conseqüente perda de atividade. Nas 3 primeiras horas houve uma perda de apenas 16 % e após 24 horas uma perda de 45 % na sua atividade, como apresentado na TABELA 4.9.

TABELA 4.9 - Valores de atividade da ACE1 em solução ao longo do tempo e suas respectivas porcentagens

Tempo (h)	%
0	100
3	83,8
6	80,9
9	76,9
12	74,4
24	65,6

Considerando que, a enzima imobilizada apresenta uma melhor estabilidade, essa perda de atividade seria diminuída com a sua imobilização. Sendo assim, o tampão escolhido para a imobilização foi o fosfato.

4.5 - Imobilização da ACE1 em partículas nanomagnéticas e sua atividade

A síntese e modificação da superfície das partículas nanomagnéticas foram realizadas como descrito na seção 3.12 e a FIGURA 4.22 ilustra o processo de recobrimento.

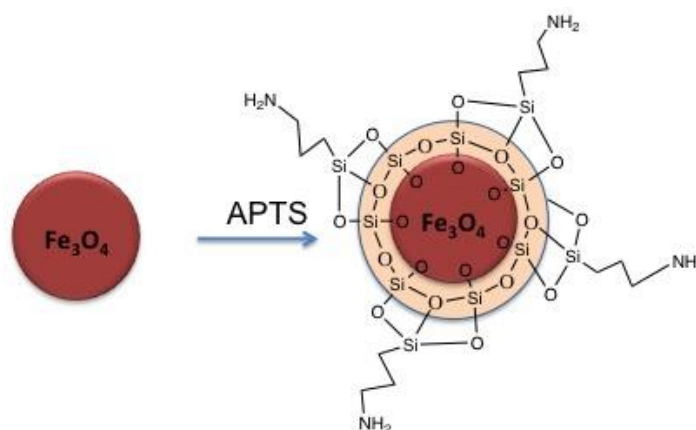


FIGURA 4.22 - Funcionalização das partículas nanomagnéticas.

Para fim de comparação ambas as enzimas, ACE1 purificada (ACE-p) e ACE1 comercial (ACE-c), foram imobilizadas.

A fim de testar a estabilidade das enzimas imobilizadas, as suas atividades foram testadas utilizando o ensaio de atividade como descrito na seção 3.13. Desta maneira, foi realizado um estudo para avaliar o melhor tempo de incubação, pois com a enzima imobilizada talvez fosse preciso menos tempo para que sua atividade pudesse ser medida. Na FIGURA 4.23 é comparado o perfil de atividade para ambas as enzimas imobilizadas.

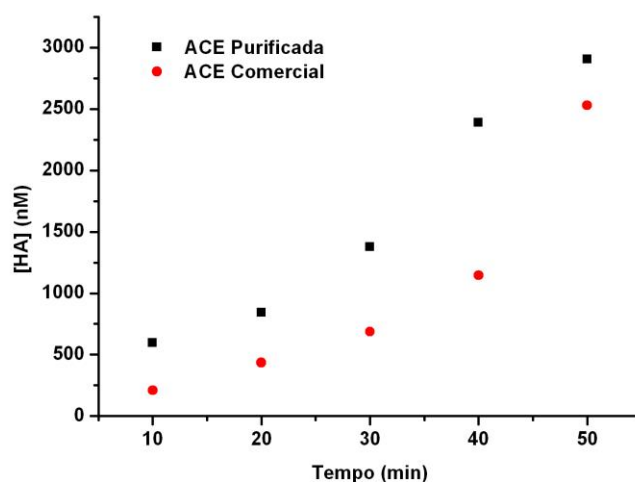


FIGURA 4.23 - Formação de HA (nmol.L⁻¹) em relação ao tempo de incubação para os reatores enzimáticos ACE-p e ACE-c.

Mesmo após a imobilização, o tempo de incubação utilizado foi de 50 min, pois para a determinação dos parâmetros cinéticos seria necessário utilizar concentrações de substratos mais baixas e talvez não seria possível a detecção do HA caso utilizasse um tempo menor de incubação.

Em seguida, a fim de avaliar a estabilidade da enzima, foi realizado um ensaio no qual o reator enzimático permaneceu por 72 h em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ (pH 8,3) e suas atividades foram medidas em intervalos determinados. Os resultados obtidos estão apresentados nas TABELA 4.10.

TABELA 4.10 - Avaliação da estabilidade dos reatores de ACE1

Tempo (h)	ACE-p %	ACE-c %
0	100	100
24	46,2	41,2
48	46,0	36,9
72	53,8	-

Diferentemente do ensaio de estabilidade realizado para a enzima em solução, no qual a solução permaneceu em temperatura ambiente e alíquotas foram retiradas para o ensaio de atividade, no ensaio de estabilidade da enzima

imobilizada, os reatores, após o ensaio de atividade, foram lavados e armazenados a 4 °C até o próximo ensaio.

Sendo assim, apesar da grande diminuição na atividade da enzima após 24 h, quando comparada a estabilidade da ACE1 em solução, mesmo após 72 h o reator da ACE-p (NMB-ACE-p) permanece ativo, enquanto que o reator da ACE-c (NMB-ACE-c) já não mais apresentou atividade. Essa perda de atividade nas primeiras 24 h pode estar associada à perda de enzimas que não estavam covalentemente ligadas e após o primeiro ensaio de atividade, elas foram removidas junto com a lavagem do reator. O fato que contribui para que esta hipótese possa ser verdadeira é que após 48 h não há perda de atividade.

4.6 - Avaliação da atividade dos reatores NMB-ACE e determinação de suas propriedades cinéticas

A constante de Michaelis-Menten, K_M , é definida como a concentração do substrato onde se obtém uma velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de catálise. Essa constante foi determinada para o substrato HHL medindo-se a atividade enzimática para ambos os reatores, NMB-ACE-p e NMB-ACE-c, com diferentes intervalos de concentrações, sendo 62,5 a 3500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 125 a 3500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Os intervalos foram determinados utilizando concentrações crescentes do substrato até que fosse atingido um patamar de saturação onde, o aumento da concentração de HHL não alterasse a velocidade da reação.

A FIGURA 4.24 está apresentado as curvas obtidas para o cálculo de K_M para ambos os reatores.

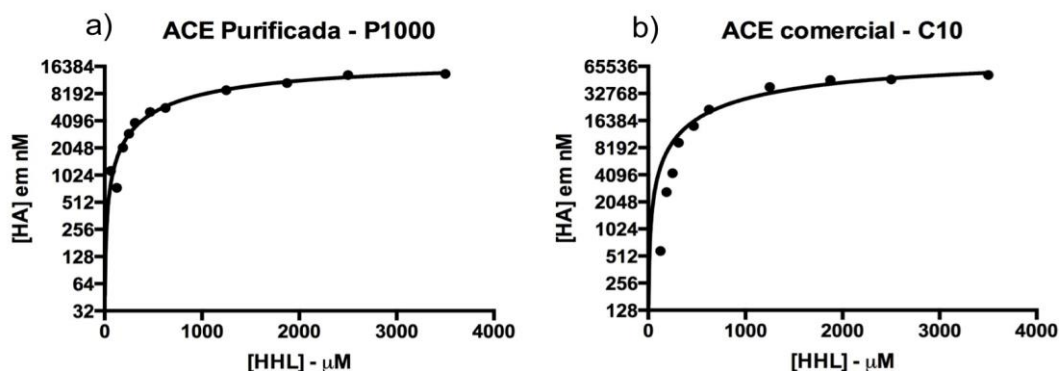


FIGURA 4.24 - Curvas de K_M para os reatores com a) ACE1 Purificada e b) ACE1 Comercial.

Como pode-se observar, o perfil cinético para ambos os reatores foi Michaeliano para a formação do produto HA. Os valores obtidos de K_M e V_{max} para NMB-ACE-p foram de $1452 \pm 167,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $19642 \pm 1044 \text{ nmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente. Os valores obtidos de K_M e V_{max} para NMB-ACE-c foram de $2128 \pm 670,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $89287 \pm 14699 \text{ nmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente.

O reator NMB-ACE-p apresentou uma V_{max} muito inferior quando comparado ao reator NMB-ACE-c. Em teoria, o reator NMB-ACE-p tem uma quantidade de enzima imobilizada muito superior e deveria apresentar uma velocidade maior, visto que em condições apropriadas, a velocidade das reações catalisadas por enzima é proporcional à quantidade de enzima presente. No entanto, para a última etapa de purificação, apesar de ter um aumento significativo de sua atividade específica, houve uma perda na atividade total da enzima, como pode ser observado na FIGURA 4.20 que para uma mesma concentração de enzima houve um decréscimo na sua atividade quando comparada às outras etapas de purificação, provavelmente resultado de uma denaturação da enzima.

Sendo assim, pode se dizer que a última etapa de purificação não foi eficiente, resultando em uma porcentagem de enzima inativa. Portanto, boa parte da quantidade de enzima imobilizada (0,5 mg) não apresentou atividade, resultando em uma baixa V_{max} observada.

Na tentativa de obter um reator que apresentasse um melhor desempenho, considerou-se a imobilização da ACE1 purificada até a etapa da cromatografia de afinidade por sítios de glicosilação utilizando a resina de

concanavalina A, pois até esta etapa houve um aumento na atividade enzimática. Para isso, foi utilizado o mesmo procedimento de imobilização preparando-se dois reatores contendo 0,5 mg de proteína cada. Para o NMB-ACE-ConA, as incubações foram realizadas com concentração do substrato HHL variando de 62,5 a 3500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e o resulta obtido está apresentado na FIGURA 4.25.

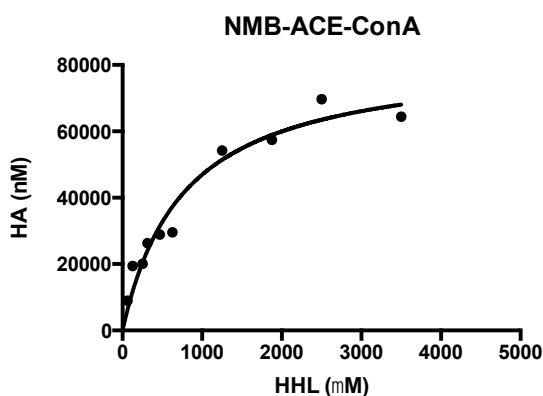


FIGURA 4.25 - Curva de K_M para o reator NMB-ACE-ConA.

Os valores obtidos de K_M e V_{max} para NMB-ACE-p foram de $764,4 \pm 169,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $82977 \pm 6773 \text{ nmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente.

Diferentemente do reator NMB-ACE-p, a V_{max} do NMB-ACE-ConA é mais próxima da V_{max} encontrada para o NMB-ACE-c, que tomamos como referência. Na TABELA 4.11 é mostrado o K_M de ACE1 purificada de diversos organismos.

TABELA 4.11 - Valores de K_M encontrados na literatura para ACE1 em solução extraída de diversos organismos

Referência	Substrato	Organismo	Órgão	K_M (mol.L ⁻¹)
Cushman ⁵⁰	HHL	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (coelho)	Pulmão	$2,6 \times 10^{-3}$
Holmquist ⁸⁶	FAPGG	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (coelho)	Pulmão	$3,0 \times 10^{-4}$
Friedland ⁸⁷	HHL	<i>Homo Sapiens</i>	Pulmão	$1,6 \times 10^{-3}$
Hara ⁵⁴	HHL	<i>Homo Sapiens</i>	Pele	$1,7 \times 10^{-3}$
Hara ⁵⁴	HHL	<i>Mus musculus</i> (camundongo)	Pele	$2,6 \times 10^{-3}$
Bunning ⁸⁸	FAPGG	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (coelho)	Pulmão	$3,0 \times 10^{-4}$
Ehlers ⁸⁹	HHL	<i>Homo Sapiens</i>	Pulmão	$1,9 \times 10^{-3}$
Ehlers ⁸⁹	HHL	<i>Homo Sapiens</i>	Rim	$1,7 \times 10^{-3}$
Koichiro ⁵⁶	HHL	<i>Homo Sapiens</i>	Pulmão	$1,9 \times 10^{-3}$
Polanco ⁵⁷	HHL	<i>Gallus gallus</i> (galinha)	Pulmão	$5,2 \times 10^{-4}$
Zhang ⁶²	HHL	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (coelho)	Pulmão	$1,4 \times 10^{-3}$
Sanchez ⁵⁸	FAPGG	<i>Sus scrofa</i> (porco)	Pulmão	$2,3 \times 10^{-4}$
Chen ⁵⁹	FAPGG	<i>Sus scrofa</i> (porco)	Pulmão	$7,8 \times 10^{-4}$
NMB-ACE-c	HHL	<i>Bos taurus</i> (boi)	Pulmão	$2,1 \times 10^{-3}$
NMB-ACE-p	HHL	<i>Bos taurus</i> (boi)	Pulmão	$1,4 \times 10^{-3}$
NMB-ACE- ConA	HHL	<i>Bos taurus</i> (boi)	Pulmão	$7,6 \times 10^{-4}$

Os valores de K_M determinados para as ACE1s imobilizadas não foram muito diferentes dos valores encontrados na literatura para enzimas livres, em solução. Isto é um bom indicativo de que o comportamento cinético da ACE1 imobilizada não foi afetado pela sua imobilização. Assim, a imobilização da ACE1 surge como uma alternativa econômica para ensaios de atividade uma vez que a enzima pode ser reutilizada, enquanto que os ensaios em solução utiliza-se uma alíquota (em torno de 0,05U de ACE1) e não pode ser reutilizada. Além disso, a sua estabilidade é mantida por pelo menos 72 horas e a sua utilização é facilitada

pelo suporte utilizado nesse trabalho, que apresenta propriedades magnéticas e com uma simples aproximação de um ímã a solução incubada pode ser analisada.

4.7 - Ensaio de inibição utilizando NMB-ACE

Em complementação à determinação dos parâmetros cinéticos, foram realizados ensaios de inibição com inibidores de ACE1 conhecidos como o captopril e lisinopril com o objetivo de confirmar as respectivas capacidades inibitórias para o sistema em desenvolvimento, pois uma vez confirmada, isso serviria de modelo para a triagem de novos inibidores. Os ensaios de inibição foram realizados como descrito na seção 3.13, no entanto para ensaios preliminares a concentração de inibidores utilizada foi de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e os resultados estão apresentados na TABELA 4.12.

TABELA 4.12 - Ensaio de inibição em NMB-ACE

Captopril		
	Conc. de HA (ng.mL^{-1})	Atividade %
Pré-inibição	891,08	100
Inibição	43,93	4,93
Pós-inibição	32,03	3,60
Lisinopril		
	Conc. de HA (ng.mL^{-1})	Atividade %
Pré-inibição	468,69	100
Inibição	20,19	4,31
Pós-inibição	87,79	18,7

Foram obtidos valores de inibição de 95% para ambos os compostos, valores que estão de acordo com a literatura, uma vez que estes já são fármacos conhecidos e comercializados. No entanto, após o ensaio de inibição os biorreatores não voltaram a apresentar atividade comparável à inicial. Isto pode ter sido causado pela alta concentração de inibidores utilizados, pois inicialmente tomou-se como base as concentrações utilizadas para ensaios de inibição de outros biorreatores já desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa.

Vale ressaltar entretanto, que os valores de IC_{50} para o captopril encontram-se na faixa entre 1 a 15 $nmol.L^{-1}$ ⁹⁰ enquanto que os valores para o lisinopril encontram-se em torno de 5 $nmol.L^{-1}$ ⁹¹. Assim foi concluído que a não regeneração do biorreator foi causada pela alta concentração dos inibidores usados em ambos os ensaios.

Como tentativa de recuperar o reator, ele foi lavado com diferentes tampões com $Na_2B_4O_7$ 50 $mmol.L^{-1}$ pH 9,5 e Tris-HCl 20 $mmol.L^{-1}$ pH 7,8, mas não houve sucesso.

Sendo assim, outro reator foi preparado e um ensaio de inibição com a concentração de 1 $\mu mol.L^{-1}$ foi realizado. Além da inibição de 95 %, a atividade do reator foi recuperada em 97%, confirmando que o problema encontrado com os ensaios preliminares estava relacionado à concentração dos inibidores.

Desta maneira, o IC_{50} para o lisinopril foi determinado utilizando concentrações de 0,5 a 1000 $nmol.L^{-1}$ no reator NMB-ACE-ConA e o gráfico obtido está apresentado na FIGURA 4.26.

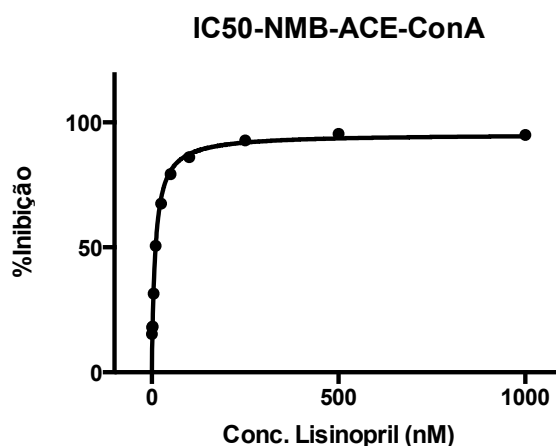


FIGURA 4.26 - Gráfico de IC_{50} para NMB-ACE-ConA.

Através do gráfico é possível determinar o valor de IC_{50} para o lisinopril que está exatamente em 10 $nmol.L^{-1}$, valor que está de acordo com os dados da literatura para ensaios em solução. Assim, somado aos parâmetros cinéticos já determinados para os NMB-ACEs o a determinação do IC_{50} para um inibidor de ACE1 conhecido amplia a versatilidade e robustez do biorreator como ferramenta para ensaios de inibição e mostra que a enzima imobilizada reconhece inibidores referência.

4.8 - Ensaio de atividade utilizando substrato natural da ACE1

Em complementação ao estudo do comportamento do reator NMB-ACE-ConA, a atividade da ACE1 foi medida utilizando-se o seu substrato natural angiotensina I monitorando a formação da angiotensina II. Para isso, um método utilizando LC-MS/MS foi desenvolvido e as condições determinadas aparecem descritas na seção 3.15.2. A incubação foi realizada nas mesmas condições estabelecidas para o substrato sintético HHL. O resultado para essa análise é apresentado na FIGURA 4.27.

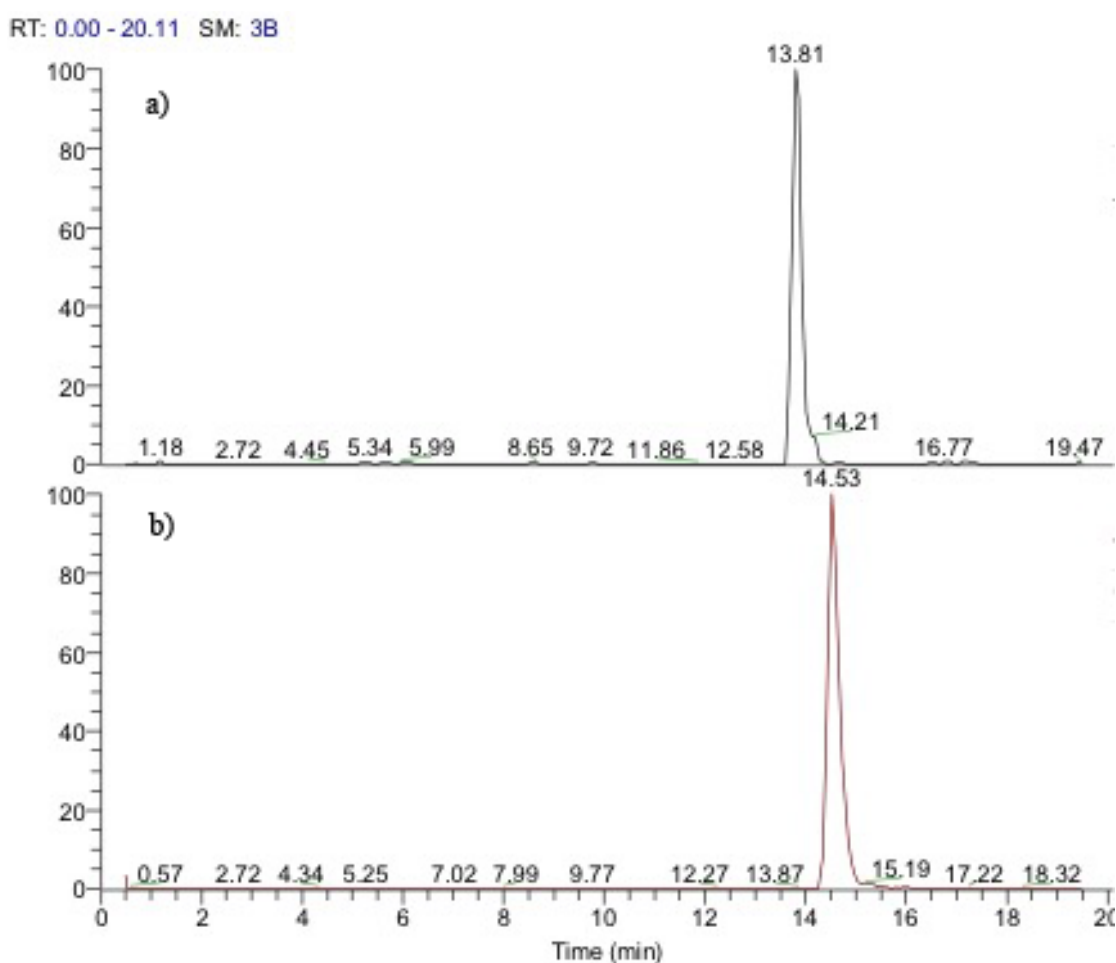


FIGURA 4.27 - Cromatograma de íons extraídos para a) angiotensina II e b) angiotensina I.

Com isso, a seletividade, especificidade do reator foi mais uma vez comprovada, demonstrando a sua capacidade catalítica frente aos dois substratos diferentes.

4.9 - Ensaio de bioconjugação (*fishing*) utilizando NMB-ACE

O experimento de bioconjugação foi realizado para avaliação da capacidade de interação da ACE1 com ligantes que tenham uma afinidade específica. Seja no sítio ativo ou não, os ligantes podem interagir de diferentes formas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações π - π , dipolo-dipolo e interações eletrostáticas.

A realização desse experimento, vem da necessidade de uma ferramenta para a busca de inibidores de ACE1 em misturas complexas. Como no trabalho desenvolvido por Siemerink et al⁹², uma mistura complexa é primeiramente fracionada e em seguida a atividade inibitória de cada fração é avaliada, em seguida a identificação dos componentes da fração ativa é realizada para posteriormente fracionar novamente a fração ativa em busca do composto responsável pela inibição. Muitos outros trabalhos foram realizados dessa maneira^{93,94}, no entanto utilizando a bioconjugação essa busca seria facilitada e otimizada, tanto em termos qualitativos, como em termos de rapidez.

Com a utilização de NMB-ACE para o ensaio de bioconjugação, o reator é imerso em uma mistura complexa e os compostos que apresentarem alguma afinidade com a ACE1 serão "bioconjugados" e, após a extração do biorreator são diretamente identificados por LC-MS/MS. Essa estratégia é um salto qualitativo, pois em trabalhos que fracionam as misturas, moléculas que estão em baixa abundância podem ficar muito diluídas e não serem detectadas e/ou identificadas. Neste contexto, a identificação de ligantes é baseada na afinidade enzima-ligante e não na concentração presente na mistura. Além disso, pode apresentar uma economia de tempo, pois muitas vezes apenas uma análise para o fracionamento não é suficiente para realizar os testes de inibição de cada fração.

Sendo assim, para o desenvolvimento dessa ferramenta, primeiramente foi utilizado um ligante de ACE1 conhecido para avaliar sua capacidade de bioconjugação. Para isso, como descrito na seção 3.15.1, NMB-ACE-ConA foi imerso em uma solução contendo 100 nmol.L⁻¹ de lisinopril e após incubação, o sobrenadante (A1-S) foi retirado, extraído e analisado. Na sequência, o NMB-ACE-ConA foi incubado em uma solução de 10 mmol.L⁻¹ tampão fosfato, pH 8,3/CH₃CN 5 % v/v e em seguida este sobrenadante (A1-E) foi retirado, extraído e analisado.

Em uma segunda etapa do estudo de bioconjugação, o NMB-ACE-ConA foi imerso em uma solução contendo 100 nmol.L^{-1} de lisinopril e 25 pmol de Tryptic BSA, após a incubação o sobrenadante (A2-S) foi retirado, extraído e analisado. Na sequência, o NMB-ACE-ConA foi novamente incubado em uma solução de 10 mmol.L^{-1} tampão fosfato, pH 8,3/ CH_3CN 5 % v/v e em seguida este sobrenadante (A2-E) foi retirado, extraído e analisado. O resultado para avaliação da bioconjugação do lisinopril está apresentado na FIGURA 4.28.

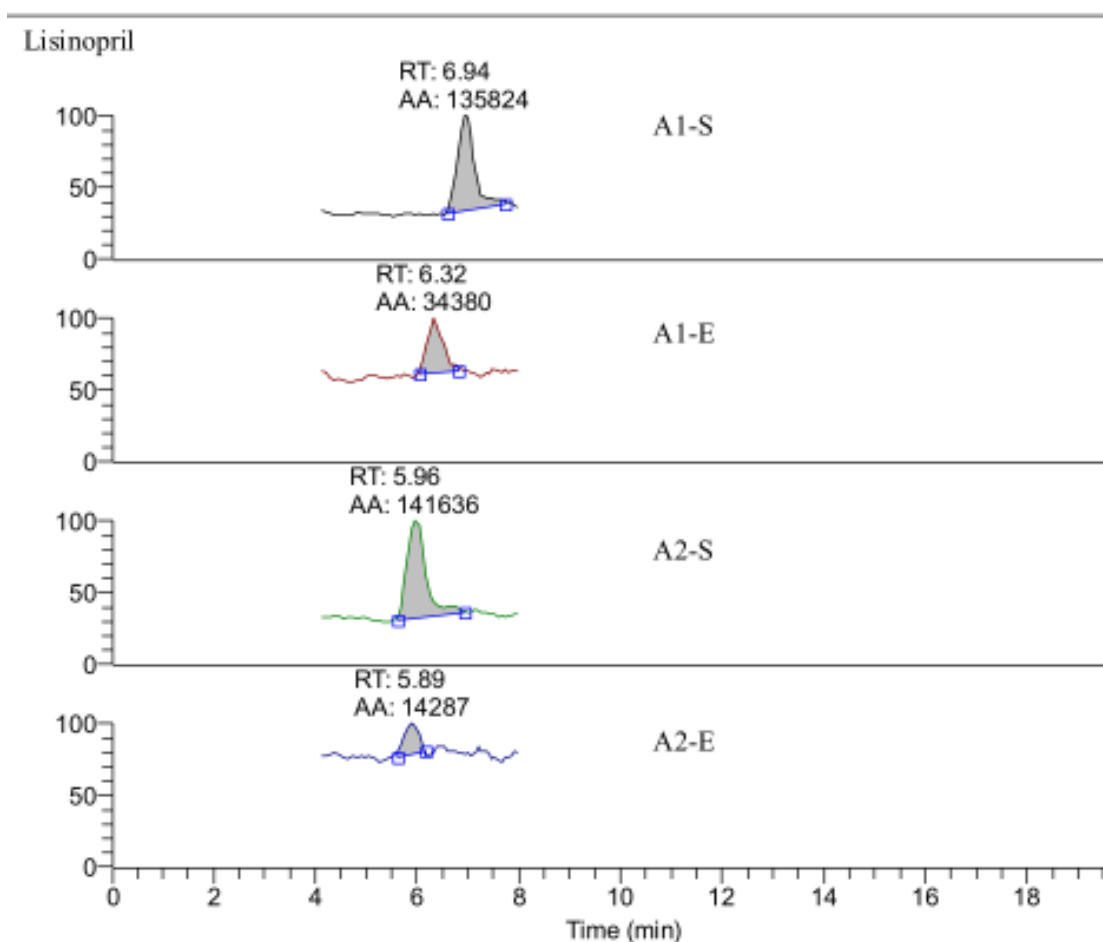


FIGURA 4.28 - Cromatograma de íons extraídos para o lisinopril.

As bandas de cada análise foram integradas para comparação na quantidade relativa entre cada ensaio. Para o primeiro ensaio, consistindo de A1-S e A1-E, a soma das duas áreas corresponde a quantidade total de lisinopril presente na solução que a NMB-ACE-ConA foi incubada. O valor estimado de área equivalente a 100 nmol.L^{-1} de lisinopril é 170204. Boa parte do lisinopril, mesmo após a incubação, permaneceu em solução não se ligando a ACE1, e

esta quantidade é de 135824 para A1-S. Em torno de 80 % do lisinopril permaneceu em solução, sem interagir com a ACE1. Por outro lado, a quantidade de lisinopril observada em A1-E, é resultado da interação com a ACE1, sendo em torno de 20 nmol.L⁻¹. Curiosamente, ao observarmos a FIGURA 4.26 esta quantidade de lisinopril provocaria 65 % de inibição do reator. Com isso, podemos explicar a grande parte de lisinopril que permaneceu em solução, pois para uma inibição de 65 %, boa parte dos sítios ativos da enzima já estavam ocupados.

Para o segundo ensaio, o valor estimado de área equivalente a 100 nmol.L⁻¹ de lisinopril é de 155923. No entanto, a quantidade relativa de que permaneceu em solução sem interagir com a ACE1 foi ainda maior, em torno de 90 %. Isto significa que houve uma menor interação do lisinopril com o mesmo reator NMB-ACE-ConA. É importante lembrar que para esse ensaio foi utilizado uma mistura de peptídeos junto com o lisinopril na incubação. Sendo assim, a menor quantidade de lisinopril pescado pode ser atribuída a uma competição pelos sítios ativos da enzima. Para a comprovação dessa hipótese, outros íons foram monitorados durante a análise de A2-S e A2-E, pois caso houvesse alguma competição por sítios ativos, as moléculas competidoras deveriam aparecer pescadas na amostra A2-E.

Como é possível observar na FIGURA 4.29 a análise de A2-E apresenta alguns peptídeos que bioconjugaram com a ACE1 e que possivelmente competiram pelos seus sítios ativos. Mesmo com 50 % dos sítios ativos ocupados pelo lisinopril, outros sítios podem ter sido ocupados pelos peptídeos AEFVEVTK, YLYEIAR e LVNELTEFAK.

Para esta análise, foram monitorados apenas 21 peptídeos trípticos de BSA. BSA é uma proteína que tem 607 aminoácidos e apresenta 78 sítios de clivagem utilizando tripsina (região C-terminal de arginina e lisina), sendo assim, a sua completa clivagem tríptica pode gerar uma mistura com mais de 100 peptídeos, pois usualmente ocorrem erros no processo de clivagem.

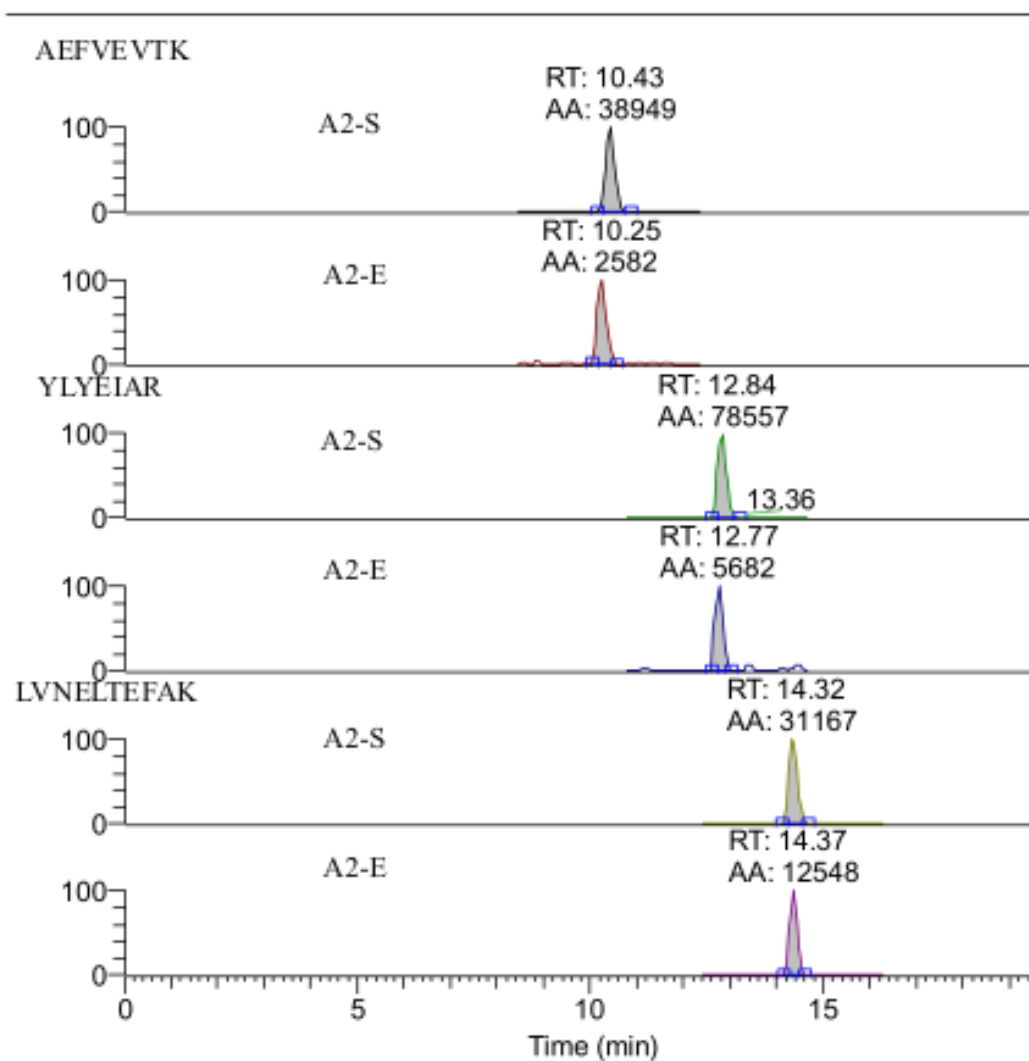


FIGURA 4.29 - Cromatogramas extraídos para os íons monitorados para os peptídeos AEFVEVTK, YLYEIAR e LVNELTEFAK.

Para a confirmação desse fenômeno, foi realizado o ensaio do branco (B2-E), no qual os mesmos compostos foram incubados, sob as mesmas condições, com partículas magnéticas modificadas apenas com APTS (NMB-APTS). O resultado obtido para o experimento está apresentado na TABELA 4.13.

TABELA 4.13 - Valores de área obtidos para os ensaios de bioconjugação (A1 e A2) e branco (B2)

	Lisinopril	AEFVEVTK	YLYEIAR	LVNELTEFAK
A1-E	44020	-	-	-
A2-E	14287	2582	5682	12548
B2-E	3519	2653	20649	5925

Quando comparamos os valores de área obtidos para os experimentos de bioconjugação e branco, a quantidade de lisinopril obtida por bioconjugação é maior, confirmando a especificidade do NMB-ACE-ConA frente a um inibidor conhecido. Para os compostos da mistura peptídica, apenas um composto pode ser confirmado como bioconjugado, o LVNELTEFAK. Para os outros dois peptídeos, AEFVEVTK e YLYEIAR, os valores de área obtidos no ensaio do branco foram igual ou maior do que o ensaio de bioconjugação.

Curiosamente, na literatura já foi reportado um peptídeo denominado albutensina A^{43,95}, ALKAWSVAR, derivado de BSA que apresentou um IC₅₀ de 3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Desta maneira, como próximo etapa, para o peptídeo pescado a determinação da constante de afinidade e seu respectivo valor de IC₅₀ seria essencial para a confirmação de sua capacidade inibidora de ACE1. Apesar desses parâmetros não terem sido determinados, os testes realizados demonstraram que o reator NMB-ACE-ConA foi capaz de pescar, seletivamente, um peptídeo em meio a uma mistura complexa, corroborando a sua aplicabilidade para a busca de ligantes de ACE1.

5 – Conclusão

Neste trabalho, a ACE1 foi extraída e purificada com o objetivo de imobilizá-la em um suporte para que ela atuasse não só como um reator enzimático para realizar ensaios catalíticos, mas também como uma ferramenta para busca de novos inibidores da ACE1 em misturas complexas.

Primeiramente, a extração e purificação da ACE1 foram baseados no procedimento utilizado por Chen et al⁵⁹, que fora desenvolvido para pulmão suíno, o procedimento foi adaptado para pulmão bovino e a enzima foi obtida com sucesso. Conjuntamente à extração e purificação, ensaios de atividade em solução foram otimizados e estabelecidos, utilizando o substrato sintético HHL, que posteriormente foram analisados através de um método desenvolvido e validado para a quantificação do produto catalisado pela ACE1 por LC-UV.

Com a obtenção da ACE1, o suporte para sua imobilização foi escolhido considerando características que podem ser fornecidas apenas por materiais nanoestruturados, como a praticidade, eficiência e robustez. Sendo assim, a ACE1 imobilizada em nanopartículas de ferrita modificada foi caracterizada pela determinação de suas propriedades enzimáticas através de estudos cinéticos, inibição e afinidade, e a aplicação demonstrada pelos ensaios de bioconjugação.

Os NMB-ACEs apresentaram um comportamento Michaeliano, nos quais os valores obtidos para as constantes foram na mesma ordem de grandeza quando comparado àqueles encontrados na literatura para ensaios com a enzima livre em solução. Com isso, o biorreator desenvolvido permite a realização de não apenas ensaios enzimáticos, mas também ensaios cinéticos.

Para confirmar a sua eficiência, o NMB-ACE1 foi submetido ao teste de inibição para o lisinopril. Os resultados obtidos não apenas demonstraram que o reator foi inibido na presença do lisinopril, bem como mostrou uma extrema capacidade de regeneração após um ensaio e outro, sendo possível determinar o IC₅₀ para o lisinopril, obtendo um valor próximo aos valores encontrados na literatura.

A sua seletividade e especificidade foram avaliadas através do ensaio de atividade utilizando o seu substrato natural, angiotensina I e monitorando a formação do seu produto catalítico, angiotensina II.

Complementarmente, no ensaio de bioconjugação um peptídeo foi pescado de uma mistura complexa, demonstrando claramente a sua capacidade de identificar peptídeos encriptados como ligantes de ACE1.

Desta forma, é essencial ressaltar a importância das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa utilizadas no trabalho, pois somente com o seu conhecimento a fundo foi possível usufruir de suas versatilidade e robustez, desde a extração da ACE1 aos estudos de bioconjugação, se tornando uma ferramenta indispensável para o estado da arte na busca por ligantes enzimáticos.

Finalmente, o presente trabalho apresenta uma ferramenta versátil, robusta e seletiva para ser empregada em estudos de atividade, inibição e bioconjugação. O desempenho do NMB-ACE1, para os estudos mencionados, foram mais do que suficientes para o seu estabelecimento como uma ferramenta com grande potencial para a busca de ligantes de ACE1 em misturas complexas.

6 Referências Bibliográficas

1. SKEGGS, L.T.; KAHN, J.R.; & SHUMWAY, N.P. "The Preparation and Function of the Hypertensin-Converting Enzyme." *J. Exp. Med.*, **103**, 295, 1956.
2. BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D.; SALVESEN, G.; & FRED WOESSNER, J. "Introduction." *Handb. Proteolytic Enzym.*, 11, 2013.
3. SOUBRIER, F.; ALHENC-GELAS, F.O.I.S.; HUBERT, C.; ALLEGRINI, J.; JOHNT, M.; TREGERT, G.; & CORVOL, P. "Two Putative Active Centers in Human Angiotensin I-Converting Enzyme Revealed by Molecular Cloning." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 9386, 1988.
4. WEI, L.; ALHENC-GELAS, F.; SOUBRIER, F.; MICHAUD, A.; CORVOL, P.; & CLAUSER, E. "Expression and Characterization of Recombinant Human Angiotensin I-Converting Enzyme. Evidence for a C-Terminal Transmembrane Anchor and for a Proteolytic Processing of the Secreted Recombinant and Plasma Enzymes." *J. Biol. Chem.*, **266**, 5540, 1991.
5. ORTH, T.; VORONOV, S.; BINEVSKI, P.; SAENGER, W.; & KOST, O. "Glycosylation of Bovine Pulmonary Angiotensin-Converting Enzyme Modulates Its Catalytic Properties." *FEBS Lett.*, **431**, 255, 1998.
6. WEI, L.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL, P.; & CLAUSER, E. "The Two Homologous Domains of Human Angiotensin I-Converting Enzyme Are Both Catalytically Active." *J. Biol. Chem.*, **266**, 9002, 1991.
7. HOWARD, T.E.; SHAI, S.Y.; LANGFORD, K.G.; MARTIN, B.M.; & BERNSTEIN, K.E. "Transcription of Testicular Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Is Initiated within the 12th Intron of the Somatic ACE Gene." *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4294, 1990.
8. SEN GC, THEKKUMKARA TJ, K.R. "Angiotensin-Converting Enzyme: Structural Relationship of the Testicular and the Pulmonary Forms." *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **16**, S14, 1990.
9. UCHIDE, T.; FUJIMORI, Y.; FUKUSHIMA, U.; UECHI, M.; SASAKI, T.; & TEMMA, K. "cDNA Cloning of Hamster Angiotensin-Converting Enzyme and mRNA Expression." *DNA Seq.*, **17**, 319, 2006.
10. YANG, H.-Y.T. & NEFF, N.H. "Distribution and Properties of Angiotensin Converting Enzyme of Rat Brain." *J. Neurochem.*, **19**, 2443, 1972.
11. KREGG, J.H.; JOHN, S.W.; LANGENBACH, L.L.; HODGIN, J.B.; HAGAMAN, J.R.; BACHMAN, E.S.; JENNETTE, J.C.; O'BRIEN, D. A; & SMITHIES, O. "Male-Female Differences in Fertility and Blood Pressure in ACE-Deficient Mice." *Nature*, **375**, 146, 1995.

12. HOOPER, N.M. & TURNER, A J. "Isolation of Two Differentially Glycosylated Forms of Peptidyl-Dipeptidase A (angiotensin Converting Enzyme) from Pig Brain: A Re-Evaluation of Their Role in Neuropeptide Metabolism." *Biochem. J.*, **241**, 625, 1987.
13. BAUDIN, B.; ALVES, N.; PILON, A.; BÉNÉTEAU-BURNAT, B.; & GIBOUDEAU, J. "Structural and Biological Roles of Glycosylations in Pulmonary Angiotensin I-Converting Enzyme." *Glycobiology*, **7**, 565, 1997.
14. ZHANG, C.; WU, S.; & XU, D. "Catalytic Mechanism of Angiotensin-Converting Enzyme and Effects of the Chloride Ion." *J. Phys. Chem. B*, **117**, 6635, 2013.
15. WEIR, M.R. "Effects of Renin-Angiotensin System Inhibition End-Organ Protection: Can We Do Better?" *Clin. Ther.*, **29**, 1803, 2007.
16. PROBSTFIELD, J.L. & O'BRIEN, K.D. "Progression of Cardiovascular Damage: The Role of Renin-Angiotensin System Blockade." *Am. J. Cardiol.*, **105**, 10A, 2010.
17. KEIDAR, S.; KAPLAN, M.; & GAMLIEL-LAZAROVICH, A. "ACE2 of the Heart: From Angiotensin I to Angiotensin (1-7)." *Cardiovasc. Res.*, **73**, 463, 2007.
18. DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R.E.; ACTON, S.; ACE, C.; ANGIOTENSIN, C.; & STAGLIANO, N. "A Novel Angiotensin-Converting Enzyme – Related to Angiotensin 1-9." *Circ. Res.*, **87**, 1, 2000.
19. "KEGG PATHWAY Database." Disponível em <http://www.genome.jp/keggbin/show_pathway?map04614>. Acesso em: 15 de março de 2015.
20. WONG, J.; PATEL, R. A.; & KOWEY, P.R. "The Clinical Use of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors." *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **47**, 116, 2004.
21. FERREIRA, S.H.; BARTELT, D.C.; & GREENE, L.J. "Isolation of Bradykinin-Potentiating Peptides from *Bothrops Jararaca* Venom." *Biochemistry*, **9**, 2583, 1970.
22. SMITH, C. & VANE, J. "The Discovery of Captopril." *FASE B J.*, **17**, 788, 2003.
23. CUSHMAN, D.W.; CHEUNG, H.S.; SABO, E.F.; & ONDETTI, M. A. "Design of Potent Competitive Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Carboxyalkanoyl and Mercaptoalkanoyl Amino Acids." *Biochemistry*, **16**, 5484, 1977.
24. AKIF, M.; GEORGIADIS, D.; MAHAJAN, A.; DIVE, V.; STURROCK, E.D.; ISAAC, R.E.; & ACHARYA, K.R. "High-Resolution Crystal Structures of *Drosophila Melanogaster* Angiotensin-Converting Enzyme in Complex with Novel Inhibitors and Antihypertensive Drugs." *J. Mol. Biol.*, **400**, 502, 2010.

25. DUCHIN, K.L.; MCKINSTRY, D.N.; COHEN, A I.; & MIGDALOF, B.H. "Pharmacokinetics of Captopril in Healthy Subjects and in Patients with Cardiovascular Diseases." *Clin. Pharmacokinet.*, **14**, 241, 1988.
26. ATKINSON, A.B. & ROBERTSON, J.I.S. "Captopril in the Treatment of Clinical Hypertension and Cardiac Failure." *Lancet*, **October 20**, 836, 1979.
27. PATCHETT, A.A.; HARRIS, E.; TRISTRAM, E.W.; WYVRATT, M.J.; WU, M.T.; TAUB, D.; PETERSON, E.R.; IKELER, T.J.; BROEKE, J. TEN; PAYNE, L.G.; ONDEYKA, D.L.; THORSETT, E.D.; GREENLEE, W.J.; N. S. LOHR*, R.D.H.; JOSHUA, H.; RUYLE, W. V.; ROTHROCK, J.W.; ASTER, S.D.; MAYCOCK, A.L.; ROBINSON, F.M.; HIRSCHMANN, R.; SWEET, C.S.; ULM, E.H.; GROSS, D.M.; VASSIL, T.C.; & STONE, C.A. "New Classes of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors." *Nature*, **288**, 280, 1980.
28. BULL, H.G.; THORNBERRY, N. A; CORDES, M.H.; PATCHETT, A A; & CORDES, E.H. "Inhibition of Rabbit Lung Angiotensin-Converting Enzyme by N Alpha-[(S)-1-Carboxy-3-phenylpropyl]L-Alanyl-L-Proline and N Alpha-[(S)-1-Carboxy-3-phenylpropyl]L-Lysyl-L-Proline." *J. Biol. Chem.*, **260**, 2952, 1985.
29. GREENBAUM, R.; ZUCHELLI, P.; CASPI, A.; NOURIEL, H.; PAZ, R.; SCLAROVSKY, S.; O'GRADY, P.; YEE, K.-F.; W.-C. LIAO; & B. MANGOLD. "Comparison of the Pharmacokinetics of Fosinoprilat with Enalaprilat and Lisinopril in Patients with Congestive Heart Failure and Chronic Renal Insufficiency." *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **49**, 23, 2000.
30. BOELSMA, E. & KLOEK, J. "Lactotripeptides and Antihypertensive Effects: A Critical Review." *Br. J. Nutr.*, **101**, 776, 2009.
31. NI, H.; LI, L.; LIU, G.; & HU, S.Q. "Inhibition Mechanism and Model of an Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Hexapeptide from Yeast (*saccharomyces Cerevisiae*)." *PLoS One*, **7**, e37077, 2012.
32. GARDNER, M.L. "Intestinal Assimilation of Intact Peptides and Proteins from the Diet--a Neglected Field?" *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **59**, 289, 1984.
33. PARKER, F.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; FLOC'H, F.; ZERIAL, A.; WERNER, G.H.; JOLLÈS, J.; CASARETTO, M.; ZAHN, H.; & JOLLÈS, P. "Immunostimulating Hexapeptide from Human Casein: Amino Acid Sequence, Synthesis and Biological Properties." *Eur. J. Biochem.*, **145**, 677, 1984.
34. KITTS, D.D. & WEILER, K. "Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses Used in Isolation and Recovery." *Curr. Pharm. Des.*, **9**, 1309, 2003.
35. GUANG, C. & PHILLIPS, R.D. "Plant Food-Derived Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides." *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 5113, 2009.
36. DZIUBA, J.; MINKIEWICZ, P.; NAŁĘCZ, D.; & IWANIAK, A. "Database of Biologically Active Peptide Sequences." *Nahrung - Food*, **43**, 190, 1999.

37. MEISEL, H. "Multifunctional Peptides Encrypted in Milk Proteins." *BioFactors*, **21**, 55, 2004.
38. CHOI, H.; CHO, H.; YANG, H.; RA, K.; & SUH, H.. "Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor from *Grifola Frondosa*." *Food Res. Int.*, **34**, 177, 2001.
39. OKAMOTO, A.; HANAGATA, H.; KAWAMURA, Y.; & YANAGIDA, F. "Anti-Hypertensive Substances in Fermented Soybean, Natto." *Plant Foods Hum. Nutr.*, **47**, 39, 1995.
40. UKEDA, H.; MATSUDA, H.; OSAJIMA, K.; MATSUFUJI, H.; MATSUI, T.; & OSAJIMA, Y. "Peptides from Peptic Hydrolyzate of Heated Sardine Meat That Inhibit Angiotensin I Converting Enzyme." *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **66**, 25, 1992.
41. KOHAMA, Y.; MATSUMOTO, S.; OKA, H.; TERAMOTO, T.; OKABE, M.; & MIMURA, T. "Isolation of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor from Tuna Muscle." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**, 332, 1988.
42. ABUBAKAR, A.; SAITO, T.; AIMAR, M.V.; & ITOH, T. "New Derivation of the Inhibitory Activity against Angiotensin-Converting Enzyme from Sweet Cheese Whey." *Tohoku J. Agric. Res.*, **47**, 1, 1996.
43. FITZGERALD, R.J.; MURRAY, B.A.; & WALSH, D.J. "Hypotensive Peptides from Milk Proteins." *J. Nutr.*, **134**, 980S, 2004.
44. JAUHAINEN, T. & KORPELA, R. "Milk Peptides and Blood Pressure." *J. Nutr.*, **137**, 825S, 2007.
45. MEISEL, H. "Biochemical Properties of Peptides Encrypted in Bovine Milk Proteins." *Curr. Med. Chem.*, **12**, 1905, 2005.
46. PHELAN, M. & KERINS, D. "The Potential Role of Milk-Derived Peptides in Cardiovascular Disease." *Food Funct.*, **2**, 153, 2011.
47. SAITO, T. "Antihypertensive Peptides Derived from Bovine Casein and Whey Proteins." *Adv. Exp. Med. Biol.*, **606**, 295, 2008.
48. HONG, F.; MING, L.; YI, S.; ZHANXIA, L.; YONGQUAN, W.; & CHI, L. "The Antihypertensive Effect of Peptides: A Novel Alternative to Drugs?" *Peptides*, **29**, 1062, 2008.
49. VERMEIRSEN, V.; CAMP, J. VAN; & VERSTRAETE, W. "Bioavailability of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides." *Br. J. Nutr.*, **92**, 357, 2004.
50. CUSHMAN, D.W. & CHEUNG, H.S. "Spectrophotometric Assay and Properties of the Angiotensin I-Converting Enzyme of Rabbit Lung." *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637, 1971.

51. DORER, F.E.; KAHN, J.R.; LENTZ, K.E.; LEVINE, M.; & SKEGGS, L.T. "Purification and Properties of Angiotensin-Converting Enzyme from Hog Lung." *Circ. Res.*, **31**, 356, 1972.
52. HAYAKARI, M.; KONDO, Y.; & IZUMI, H. "A Rapid and Simple Spectrophotometric Assay of Angiotensin-Converting Enzyme." *Anal. Biochem.*, **84**, 361, 1978.
53. CHIKNAS, S.G. "A LiquidChromatography-AssistedAssay for Angiotensin-Converting Enzyme (PeptidylDipeptidase) in Serum." *Clin. Chem.*, **25**, 1259, 1979.
54. HARA, A.; FUKUYAMA, K.; & EPSTEIN, W.L. "Partial Purification and Characterization of Angiotensin-Converting Enzyme in Mouse and Human Skin." *J. Invest. Dermatol.*, **78**, 503, 1982.
55. PANTOLIANO, M.W.; HOLMQUIST, B.; & RIORDAN, J.F. "Affinity Chromatographic Purification of Angiotensin Converting Enzyme." *Biochemistry*, **23**, 1037, 1984.
56. TAKEUCHI, K.; SHIMIZU, T.; OHISHI, N.; SEYAMA, Y.; TAKAKU, F.; YOTSUMOTO, H.; & **DEPARTMENT, *THE THIRD DEPARTMENT OF INTERNAL MEDICINE AND. "Purification of Human Lung Angiotensin-Converting Enzyme Liquid Chromatography: Properties and N-Terminal Amino Acid Sequence." *J. Biochem.*, **106**, 442, 1989.
57. POLANCO, M.J.; MIGUEL, J.L.; AGAPITO, M.T.; & RECIO, J.M. "Characterization of Chicken Lung Angiotensin I-Converting Enzyme." *J. Endocrinol.*, **132**, 261, 1991.
58. ANDUJAR-SÁNCHEZ, M.; CÁMARA-ARTIGAS, A.; & JARA-PÉREZ, V. "Purification of Angiotensin I Converting Enzyme from Pig Lung Using Concanavalin-A Sepharose Chromatography." *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **783**, 247, 2003.
59. CHEN, H.L.; LÜNSDORF, H.; HECHT, H.J.; & TSAI, H. "Porcine Pulmonary Angiotensin I-Converting Enzyme-Biochemical Characterization and Spatial Arrangement of the N- and C-Domains by Three-Dimensional Electron Microscopic Reconstruction." *Micron*, **41**, 674, 2010.
60. EISELE, T.; STRESSLER, T.; KRANZ, B.; & FISCHER, L. "Automated Multi-Step Purification Protocol for Angiotensin-I-Converting-Enzyme (ACE)." *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **911**, 64, 2012bh.
61. KASTURI, S.; JABBAR, M. A; SEN, G.C.; & SEN, I. "Role of Glycosylation in the Biosynthesis and Activity of Rabbit Testicular Angiotensin-Converting Enzyme." *Biochemistry*, **33**, 6228, 1994.
62. ZHANG, R.; XU, X.; CHEN, T.; LI, L.; & RAO, P. "An Assay for Angiotensin-Converting Enzyme Using Capillary Zone Electrophoresis." *Anal. Biochem.*, **280**, 286, 2000.

63. SENTANDREU, M.Á. & TOLDRÁ, F. "A Rapid, Simple and Sensitive Fluorescence Method for the Assay of Angiotensin-I Converting Enzyme." *Food Chem.*, **97**, 546, 2006.
64. XIAO, X.; LUO, X.; CHEN, B.; & YAO, S. "Determination of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity by High-Performance Liquid Chromatography/electrospray-Mass Spectrometry." *J. Chromatogr. B*, **834**, 48, 2006.
65. MEGÍAS, C.; PEDROCHE, J.; YUST, M. DEL M.; ALAIZ, M.; GIRÓN-CALLE, J.; MILLÁN, F.; & VIOQUE, J. "Immobilization of Angiotensin-Converting Enzyme on Glyoxyl-Agarose." 4641, 2006.
66. GENG, F.; HE, Y.; YANG, L.; & WANG, Z. "A Rapid Assay for Angiotensin-Converting Enzyme Activity Using Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry." *Biomed. Chromatogr.*, **24**, 312, 2010.
67. ISRAEL H. SILMAN AND EPHRAIM KATCHALSKI. "Water-Insoluble Derivatives of Enzymes, Antigens, and Antibodies." *Annu. Rev. Biochem.*, **35**, 873, 1966.
68. KATCHALSKI-KATZIR, E. "Immobilized Enzymes — Learning from Past Successes and Failures." *Trends Biotechnol.*, **11**, 471, 1993.
69. TOSA, T.; MORI, T.; FUSE, N.; & CHIBATA, I. "Studies on Continuous Enzyme Reactions. II. Preparation of DEAE-Cellulose-Aminoacylase Column and Continuous Optical Resolution of Acetyl-DL-Methionine." *Enzymologia*, **31**, 225, 1966.
70. HOMAEI, A.A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; & STEVANATO, R. "Enzyme Immobilization: An Update." *J. Chem. Biol.*, **6**, 185, 2013.
71. MASSOLINI, G. & CALLERI, E. "Immobilized Trypsin Systems Coupled on-Line to Separation Methods: Recent Developments and Analytical Applications." *J. Sep. Sci.*, **28**, 7, 2005.
72. KRESS, J.; ZANALETTI, R.; AMOUR, A.; LADLOW, M.; FREY, J.G.; & BRADLEY, M. "Enzyme Accessibility and Solid Supports: Which Molecular Weight Enzymes Can Be Used on Solid Supports? An Investigation Using Confocal Raman Microscopy." *Chem. - A Eur. J.*, **8**, 3769, 2002.
73. SHELDON, R. A & VAN PELT, S. "Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How." *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 6223, 2013.
74. DATTA, S.; CHRISTENA, L.R.; & RAJARAM, Y.R.S. "Enzyme Immobilization: An Overview on Techniques and Support Materials." *3 Biotech*, **1**, 2012.
75. KIRK, O. & CHRISTENSEN, M.W. "Lipases from *Candida Antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin." *Org. Process Res. Dev.*, **6**, 446, 2002.

76. KATCHALSKI-KATZIR, E. & KRAEMER, D.M. "Eupergit C, a Carrier for Immobilization of Enzymes of Industrial Potential." *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, **10**, 157, 2000.
77. VAN DE VELDE, F.; LOURENÇO, N.D.; PINHEIRO, H.M.; & BAKKER, M. "Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for Immobilisation Techniques." *Adv. Synth. Catal.*, **344**, 815, 2002.
78. HUDSON, S.; COONEY, J.; & MAGNER, E. "Proteins in Mesoporous Silicates." *Angew. Chemie Int. Ed.*, **47**, 8582, 2008.
79. BLANCO, R.M.; TERREROS, P.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; OTERO, C.; & DÍAZ-GONZÁLEZ, G. "Functionalization of Mesoporous Silica for Lipase Immobilization: Characterization of the Support and the Catalysts." *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **30**, 83, 2004.
80. LI, X.; YUQI, F.; SHILU, D.; & ZHIGUO, S. "Applications of Ordered Mesoporous Materials in Separation Science." *Chinese J. Anal. Chem.*, **32**, 374, 2004.
81. KIM, J.; GRATE, J.W.; & WANG, P. "Nanobiocatalysis and Its Potential Applications." *Trends Biotechnol.*, **26**, 639, 2008.
82. BRADFORD, M.M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Anal. Biochem.*, **72**, 248, 1976.
83. LAEMMLI, U.K. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680, 1970.
84. DRESCO, P.A.; ZAITSEV, V.S.; GAMBINO, R.J.; & CHU, B. "Preparation and Properties of Magnetite and Polymer Magnetite Nanoparticles." *Langmuir*, **15**, 1945, 1999.
85. VESSECCHI, R.; LOPES, N.P.; GOZZO, F.C.; DÄRR, F.A.; MURGU, M.; LEBRE, D.T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O.V.; & RIVEROS, J.M. "Nomenclaturas de Espectrometria de Massas Em Língua Portuguesa." *Quim. Nova*, **34**, 1875, 2011.
86. HOLMQUIST, B.; BÜNNING, P.; & RIORDAN, J.F. "A Continuous Spectrophotometric Assay for Angiotensin Converting Enzyme." *Anal. Biochem.*, **95**, 540, 1979.
87. FRIEDLAND, J.; SILVERSTEIN, E.; & DROOKER, M. "Human Lung Angiotensin Converting Enzyme Purification and Antibody Preparation." *J. Clin. Invest.*, **67**, 1151, 1981.
88. BÜNNING, P.; HOLMQUIST, B.; & RIORDAN, J.F. "Substrate Specificity and Kinetic Characteristics of Angiotensin Converting Enzyme." *Biochemistry*, **22**, 103, 1983.

89. EHLERS, M.R.; MAEDER, D.L.; & KIRSCH, R.E. "Rapid Affinity Chromatographic Purification of Human Lung and Kidney Angiotensin-Converting Enzyme with the Novel N-Carboxyalkyl Dipeptide Inhibitor N-[1(S)-Carboxy-5-Aminopentyl]glycylglycine." *Biochim. Biophys. Acta*, **883**, 361, 1986.
90. HENDA, Y. BEN; LABIDI, A.; ARNAUDIN, I.; BRIDIAU, N.; DELATOUCHE, R.; MAUGARD, T.; PIOT, J.M.; SANNIER, F.; THIÉRY, V.; & BORDENAVE-JUCHEREAU, S. "Measuring Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity by Micro Plate Assays: Comparison Using Marine Cryptides and Tentative Threshold Determinations with Captopril and Losartan." *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 10685, 2013.
91. PINA, A. S. & ROQUE, A. C. A. "Studies on the Molecular Recognition between Bioactive Peptides and Angiotensin-Converting Enzyme." *J. Mol. Recognit.*, **22**, 162, 2009.
92. SIEMERINK, M.; SCHEBB, N.H.; LIESENER, A.; PERCHUC, A.-M.; SCHÖNI, R.; WILMER, M.; HAYEN, H.; KARST, U.; & VOGEL, M. "Development of a Fast Liquid Chromatography/mass Spectrometry Screening Method for Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitors in Complex Natural Mixtures like Snake Venom." *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 687, 2010.
93. SHIN, Z.I.; YU, R.; PARK, S. A; CHUNG, D.K.; AHN, C.W.; NAM, H.S.; KIM, K.S.; & LEE, H.J. "His-His-Leu, an Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Korean Soybean Paste, Exerts Antihypertensive Activity in Vivo." *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3004, 2001.
94. INOUE, K.; KITADE, M.; HINO, T.; & OKA, H. "Screening Assay of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity from Complex Natural Colourants and Foods Using High-Throughput LC-MS/MS." *Food Chem.*, **126**, 1909, 2011.
95. CHIBA, H. & YOSHIKAWA, M. "Bioactive Peptides Derived from Food Proteins." *Kagaku and Seibutsu*, **29**, 454, 1991.