Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto -
Departamento de Química
Programa de Pós – Graduação em Química

“Biorreatores capilares de NTPDase-1 de *Trypanosoma*
***cruzi*: Desenvolvimento e aplicação na triagem de inibidores**
seletivos”

Felipe Antunes Calil

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, como parte das exigências para a obtenção
do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014

Felipe Antunes Calil

“Biorreatores capilares de NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*: Desenvolvimento e aplicação na triagem de inibidores seletivos”

Versão Corrigida da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química no dia 26/05/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Calil, Felipe Antunes

Biorreatores capilares de NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*:
Desenvolvimento e aplicação na triagem de inibidores seletivos.

72 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências e
Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química

Orientadora: Cardoso, Carmen Lúcia.

1. Expressão heteróloga 2. NTPDase-1 *T.cruzi* 3. Imobilização de
enzimas 4. Ensaio enzimáticos

Nome: Felipe Antunes Calil

Título: Biorreatores capilares de NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*:

Desenvolvimento e aplicação na triagem de inibidores seletivos.

Aprovado em: 26/05/2014

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais,
que criaram os
pilares para o meu
crescimento
profissional e como
pessoa. Por
estarem ao meu
lado em todos os
momentos; os
felizes, mas
principalmente os
tristes e difíceis.
Obrigado!*

Agradecimentos

Primeiramente a Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso, pela atenção, dedicação, e muita paciência. Pela confiança em me aceitar como seu aluno e dar a responsabilidade de um projeto único, promissor e desafiador, onde nem mesmo eu conhecia esta confiança. Por ser mais que apenas uma orientadora, mas mostrar, sem medo de compartilhar, caminhos que devemos seguir para o nosso próprio sucesso profissional e pessoal.

A minha noiva, Anelize Bauermeister, por me mostrar uma nova maneira de viver. Por ser a melhor companheira que alguém poderia sonhar; por ser tão leal, fiel e sincera; e por estar ao meu lado todos os dias das nossas vidas. E além disto, agradeço a sua família, minha nova família, por todo apoio necessário durante este trabalho.

A Profa. Dra. Juliana Lopes Rangel Fietto do Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) da Universidade Federal de Viçosa – MG, por toda colaboração e fornecimento do plasmídeo para a expressão da enzima. Também a sua aluna Christiane Mariotini-Moura, pela ajuda durante todo este trabalho.

A profa. Dra. Marcela Cristina de Moraes e ao Dr. João Oiano Neto pela contribuição dada ao trabalho no exame de qualificação.

Aos meus professores da pós-graduação, Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira, Dra. Gláucia Maria da Silva, Dr. Pietro Ciancaglini, Dra. Carmen Lúcia Cardoso, Dra. Regina Helena Costa Queiroz e Dra. Monica Tallarico Pupo, pelos grandes ensinamentos das disciplinas que me auxiliaram na construção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira, em particular, por me guiar nos momentos iniciais deste trabalho, quanto a Expressão e Purificação da enzima e muito além.

Ao corpo técnico e administrativo do Departamento de Química da FFCLRP-USP.

A Olímpia Paschoal, técnica do nosso laboratório, mas principalmente nossa amiga.

A todos do laboratório, Adriana, Luciana, Bárbara, Juliana, Luana, Luiz Cezar, Matheus, André, Eduardo, Oraci, pelos bons momentos que passamos juntos.

A Adriana Ferreira Lopes Vilela, por ter me ensinado tanto e ser uma mãe para mim no laboratório.

A Luana Magalhães e Juliana Maria Lima, por todos os ensinamentos e colaborações em horas tão difíceis. Sem vocês este trabalho não existiria.

Ao meu querido irmão, Flávio e minha cunhada, Gabriella. Estão sempre em minha mente e coração.

Principalmente, aos meus pais, Flávio e Fátima. Este mérito também é de vocês.

A todos os meus familiares, amigos e colegas.

E em especial, a Deus, que nos guia a todo momento.

*“A ciência se compõe de erros que, por sua vez,
são os passos até a verdade.”*
(Julio Verne)

Resumo

CALIL, F. A. **Biorreatores capilares de NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*: Desenvolvimento e aplicação na triagem de inibidores seletivos.** 2014. 72f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2014.

Uma das estratégias utilizadas no desenvolvimento de novas drogas envolve a descoberta de compostos que modulem a atividade de enzimas, importantes no processo infeccioso de patógenos. Uma abordagem interessante na triagem de novos ligantes é o uso de métodos baseados na imobilização de enzimas em suportes cromatográficos acoplados a sistemas de cromatografia líquida. O uso de IMERs (Immobilized Enzyme Reactors) como uma fase estacionária acoplado a sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência consiste em uma estratégia para triagem de compostos rápida e eficiente e tem vantagens em relação ao uso de enzimas em solução. A enzima NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi* age como um facilitador da infecção do patógeno, inibindo assim a resposta imune do hospedeiro, permitindo uma infecção silenciosa, o que sugere seu uso como um bom alvo na busca por inibidores. Neste trabalho, a enzima NTPDase-1 foi imobilizada na parede interna de capilares de sílica fundida formando ICERs (Immobilized Capillary Enzyme Reactors). Estudos das condições de uso destes biorreatores juntamente com o desenvolvimento de um método cromatográfico multidimensional, foram realizados e validados. A otimização do método cromatográfico e sua validação, apresentaram ótimos resultados em relação aos valores obtidos para os parâmetros avaliados para métodos bioanalíticos. A imobilização da enzima foi realizada com sucesso, sendo possível a detecção da atividade catalítica no sistema cromatográfico (*Tc*NTPDase1-ICER). Foi realizado também, o estudo cinético para ATP no *Tc*NTPDase1-ICER, obtendo-se K_M de $0,317 \pm 0,044$ mM, que comparado com estudos em solução, K_M de 0,096 mM, ainda apresenta grande afinidade pelo substrato.

Palavras chave: Expressão heteróloga, NTPDase-1 *T.cruzi*, Imobilização de enzimas, Ensaio enzimáticos.

Abstract

CALIL, F. A. **Capillary bioreactors of NTPDase-1 *Trypanosoma cruzi*: Development and application in the selective inhibitors screening** 2014. 72f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2014.

One of the strategies used in the development of new drugs involves the discovery of compounds that modulate the activity of enzymes, important in the infectious pathogens process. An interesting approach in the screening of new ligands is the use of methods based on immobilization of enzymes in chromatographic supports coupled to liquid chromatography systems. The use of IMERs (Immobilized Enzyme Reactors) as a stationary phase coupled to high performance chromatographic systems consist in a strategy to a fast and efficient compounds screening and it has advantages comparing to the use of enzymes in solution. The enzyme NTPDase-1 *Trypanosoma cruzi* acts as a pathogen infection facilitator, thus inhibits the host immune response allowing a silent infection, suggesting its use as a good target in the search for inhibitors. In this paper, the enzyme NTPDase-1 was immobilized for the manufacturing of ICERs (Immobilized Capillary Enzyme Reactors). Studies of conditions to the use of these bioreactors in the ligands screening along with the development of a multidimensional chromatographic method were performed and validated. The chromatographic method optimization and validation, presented excellent results, relating to the obtained values, from evaluated parameters in bioanalytical methods. The enzyme immobilization was successfully performed, being possible to detect the catalytic activity in the chromatographic system (*Tc*NTPDase1-ICER). The kinetic study for the substrate ATP was also performed in the *Tc*NTPDase1-ICER, obtaining K_M of 0.317 ± 0.044 mM, which in comparison with studies in solution K_M of 0.096 mM, still presents high affinity for the substrate.

Keywords: Heterologous expression, NTPDase-1 *T.cruzi*, Immobilization of enzymes, Enzymatic assays.

Lista de figuras

Figura 1.1: Métodos de imobilização de enzimas.....	4
Figura 1.2: Representação estrutural dos compostos Nifurtimox e Benznidazol.....	10
Figura 1.3: Estrutura cristalográfica da NTPDase-1 de Rato.....	11
Figura 1.4: Conversão do substrato S em produto P ao longo do tempo.....	13
Figura 1.5: Efeito da concentração [S] na velocidade inicial v_0	14
Figura 1.6: Esquema de uma reação enzimática, complexo enzima-substrato (ES) e formação de produto (P).....	15
Figura 1.7: Modelo simplificado da interação do íon-par com a fase sólida hidrofóbica da coluna e com a substância iônica.....	18
Figura 3.1: Posições do método multidimensional.....	26
Figura 4.1: Gel da NTPDase-1 <i>T. cruzi</i> purificada.....	31
Figura 4.2: Influência de diversas concentrações de DMSO na atividade específica.....	32
Figura 4.3: Otimização do tempo de virada de válvula.....	34
Figura 4.4: Cromatograma mostra diversas porcentagens de metanol e diferentes fluxos (em parenteses) para adquirir a melhor resolução entre os picos.....	34
Figura 4.5: Diferentes porcentagens de ACN e fluxos para avaliação da separação.....	35
Figura 4.6: Cromatograma mostrando a separação dos nucleotídeos com ótimo fator de separação.....	37
Figura 4.7: Curva de calibração do ADP.....	38
Figura 4.8: Curva de calibração do AMP.....	38
Figura 4.9: Cromatograma mostrando a atividade da enzima imobilizada TcNTPDase1-ICER.....	40
Figura 4.10: Hipérbole de Michaelis-Menten para o TcNTPDase1-ICER.....	42
Figura 4.11: Cromatograma mostrando a diminuição atividade enzimática do TcNTPDase1-ICER na presença de Suramina a 100 μ M.....	44

Figura 4.12: Cromatograma mostra que não há diminuição da atividade enzimática do TcNTPDase1-ICER na presença de Cloreto de Gadolínio.....45

Lista de tabelas

Tabela 1.1: Diferentes suportes e enzimas imobilizadas e aplicações dos IMERs obtidos.....	7
Tabela 4.1. Tampões de renaturação testados com respectivas atividades de ATP.....	31
Tabela 4.2: Condições cromatográficas otimizadas, utilizadas nos ensaios.....	37
Tabela 4.3. Precisão intra dia (n=5) e exatidão do método de quantificação de ADP.....	39
Tabela 4.4. Precisão intra dia (n=5) e exatidão do método de quantificação de AMP.....	39

Lista de esquemas e equações

Esquema 1.1: Representações esquemáticas das configurações dos IMERs em sistemas para estudos on-line.....	6
Esquema 1.2: Catálise de enzimas para formação de fósforo inorgânico, reação com molibdato de amônio e complexação com reagente verde de malaquita.....	13
Equação 1.1: Velocidade da reação.....	14
Equação 1.2: Velocidade inicial (v_0), num intervalo de tempo inicial (Δt_0).....	14
Equação 1.3: Equação de Michaelis-Menten.....	15
Equação 3.1: Cálculo do percentual de inibição.....	29

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

[E]	Concentração de enzima
[I]	Concentração de inibidor
[P]	Concentração de produto
[S]	Concentração de substrato
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ACN	Acetonitrila
ACR	Regiões conservadas de Apirases
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APTS	Aminopropiltriethoxisilano
ATP	Adenosina trifosfato
BIOAGRO	Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura
BL21 DE3 RIL	Linhagem específica de células de <i>Escherichia coli</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
C18	Coluna de fase estacionária octadecil
C8	Coluna de fase estacionária octil
Ca ²⁺	Cátion bivalente do Cálcio
Cm	Centímetros
CV	Coeficiente de Variação
D.I.	Diâmetro Interno
Da	Dalton
DAD	Detecção por Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	Densidade Ótica no comprimento de onda de 600 nm
DQ	Departamento de Química
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
E	Enzima livre

EC	Número de classificação de enzimas
EI	Complexo enzima-inibidor
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
E-NTPDases	Ecto-Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
ES	Complexo enzima-substrato
ESI	Complexo enzima- substrato-inibidor
FFCLRP	Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto
g	Gramma
GdCl ₃	Cloreto de Gadolínio
GDP	Guanosína difosfato
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GTP	Guanosína trifosfato
HCl	Ácido Clorídrico
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etano-sulfônico
HMG	Verde de Malaquita
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HTS	Ensaio Biológicos automatizados em larga escala (<i>High Throughput Screening</i>)
IC ₅₀	Potência Biológica
ICER	Reator capilar com enzima imobilizada (<i>Immobilized Capillary Enzyme Reactor</i>)
IMER	Reator com enzima imobilizada (<i>Immobilized Enzyme Reactor</i>)
IPC	Cromatografia de íon-par
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Monohidrogenofosfato de Potássio
K _i	Constante de inibição
K _M	Constante de Michaelis
LB	Luria-Bertani
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de Massas
LD	Limite de Detecção
LIMA	Laboratório de Infectologia Molecular Animal

LQ	Limite de Quantificação
LW	Marcador de Peso Molecular
mA	Miliamperes
MeOH	Metanol
Mg ²⁺	Cátion bivalente do Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
mL	Microlitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônio
(NH ₄) ₂ MoO ₄	Molibdato de Amônio
nL	Nanolitro
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Produto da reação enzimática
pH	Potencial Hidrogeniônico
P _i	Fosfato inorgânico
pL	Picolitros
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RPC	Cromatografia de Fase Reversa
rpm	Rotação por minuto
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE)
t	tempo
t ₀	tempo inicial
TBHS	Hidrogeno Sulfato de Tetrabutyl Amônio
TcNTPDase1-ICER	Enzima NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> imobilizada em um capilar de sílica fundida
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
UDP	Uridina difosfato
UFV	Universidade Federal de Viçosa
USP	Universidade de São Paulo

UTP	Uridina trifosfato
UV-Vis	Ultra Violeta Visível
V	Velocidade de reação enzimática
V_0	Velocidade de reação enzimática inicial
$V_{máx}$	Velocidade de reação enzimática máxima
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{máx}$	Comprimento de onda que apresenta a maior absorção

Sumário

Resumo	VII
Abstract	VIII
Lista de figuras.....	IX
Lista de tabelas.....	XI
Lista de esquemas e equações.....	XII
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	XIII
1. Introdução	1
1.1. Conceitos teóricos.....	2
1.1.1. Enzimas imobilizadas a suportes cromatográficos: uma ferramenta na triagem de inibidores seletivos.....	2
1.1.2. Desenvolvimento e caracterização de biorreatores enzimáticos.....	6
1.1.3. Imobilização de enzimas alvo de doenças negligenciadas	8
1.1.4. Doença de Chagas.....	9
1.1.5. As Ecto-Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase.....	11
1.1.6. Ensaios de monitoramento da atividade enzimática de NTPDase-1	13
1.1.7. Cinética enzimática.....	13
1.1.8. Inibidores enzimáticos	16
1.1.9. IC ₅₀	17
1.1.10. Cromatografia de íon-par	17
2. Objetivos	19
2.1. Objetivos Gerais.....	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. Procedimento Experimental.....	20
3.1. Materiais	20
3.2. Aparatos	20
3.3. Obtenção da enzima NTPDase-1 <i>T. cruzi</i>	21
3.3.1. Transformação das células competentes.....	21
3.3.2. Expressão e purificação da proteína recombinante.....	21
3.3.3. Eletroforese da proteína por SDS-PAGE.....	22
3.3.4. Quantificação da proteína	23
3.3.5. Renaturação e Liofilização da Enzima	23
3.4. Ensaios da enzima livre em solução	23
3.4.1. Avaliação da atividade específica da enzima <i>TcNTPDase1</i>	23
3.4.2. Avaliação da influência de DMSO na atividade específica.....	24
3.4.3. Teste de inibição da enzima <i>TcNTPDase1</i> em solução	24
3.5. Imobilização da enzima NTPDase-1 em capilares de sílica fundida.....	25
3.5.1. 1ª etapa: Pré-tratamento corrosivo do capilar de sílica fundida.....	25
3.5.2. 2ª etapa: Imobilização da NTPDase-1	25
3.6. Desenvolvimento do método cromatográfico multidimensional.....	25
3.7. Validação do método cromatográfico	26
3.7.1. Curvas de calibração dos produtos	26
3.7.2. Validação do método analítico.....	27
3.8. Determinação da atividade da enzima NTPDase-1 imobilizada.....	27
3.9. Estabilidade do <i>TcNTPDase1</i> -ICER.....	28
3.10. Estudo do parâmetro cinético K_M do <i>TcNTPDase1</i> -ICER.....	28
3.11. Estudo de inibição no <i>TcNTPDase1</i> -ICER.....	28
3.11.1. Determinação da Potência Inibitória (IC ₅₀) no <i>TcNTPDase1</i> -ICER	29
4. Resultados e discussão.....	30
4.1 Obtenção da enzima NTPDase-1 <i>T. cruzi</i>	30

4.1.1. Purificação da NTPDase-1 <i>T. cruzi</i> heteróloga.....	30
4.1.2. Otimização do tampão de renaturação e estabilidade em solução	31
4.1.2. Avaliação da influência de DMSO na atividade específica.....	32
4.2. Desenvolvimento do Método Multidimensional	33
4.2.1. Coluna C8 Supelco 10 cm x 3 mm, 2,7 μ m.....	33
4.2.1.1. Otimização da virada de válvula.....	33
4.2.1.2. Otimização da vazão/ porcentagem de solvente orgânico	34
4.2.2. Coluna C18 Supelco 10 cm x 3 mm, 2,7 μ m.....	36
4.2.2.1. Avaliação da fase estacionária na separação	36
4.2.3. Coluna Luna C18 100A 250 x 4.6 mm, 5 μ m.....	36
4.2.3.1. Adaptação de um método pré estabelecido e separação dos nucleotídeos	36
4.3 Validação do método cromatográfico	38
4.4 Determinação da atividade catalítica do <i>TcNTPDase1-ICER</i> e estabilidade	40
4.5 Estudo do parâmetro cinético K_M	41
4.5.1. Avaliação de K_M no <i>TcNTPDase1-ICER</i>	41
4.6. Estudos de inibição	43
4.6.1. Cloreto de Gadolínio e Suramina	43
5. Conclusões	45
6. Referências bibliográficas.....	46

1. Introdução

A necessidade de novos fármacos tem estimulado a pesquisa pelo desenvolvimento de técnicas e ensaios que reduzam o número de possíveis candidatos a fármacos que atuem como inibidores enzimáticos.

Uma alternativa promissora aos ensaios convencionais é o emprego da cromatografia de bioafinidade na identificação de ligantes em misturas complexas. Essa técnica é uma poderosa ferramenta para monitorar as interações ligante-proteína, substrato-proteína, inibidor-proteína e ligante-receptor. Uma das etapas desta técnica é a imobilização do alvo, sendo que o método de imobilização empregado é um parâmetro muito importante a ser considerado.

Protozoários da família Trypanosomatidae causam uma grande variedade de doenças graves como a tripanossomíase americana, conhecida como doença de Chagas, que é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença afeta de 7 a 8 milhões de pessoas, mais ou menos 40 milhões de pessoas estão em risco e 200.000 novos casos são registrados todos os anos. Entretanto desde sua descoberta em 1909, vários tipos de tratamentos foram testados para a doença de Chagas, porém nenhum fármaco seguro e eficaz foi, até o momento, descoberto.

As apirases do tipo E-NTPDases, enzimas ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases pertencem a classe das hidrolases. Essas enzimas são muito importantes para vários processos biológicos e têm sido muito estudadas com relação à sua importância em infecções causadas por patógenos.

T. cruzi apresenta até o momento somente uma NTPDase descrita, a NTPDase-1. Devido a sua importância na modulação dos processos inflamatórios, ela foi selecionada como o alvo biológico para o desenvolvimento de ICERs que serão utilizados na identificação de candidatos a novos fármacos contra a doença de Chagas.

1.1. Conceitos teóricos

1.1.1. Enzimas imobilizadas a suportes cromatográficos: uma ferramenta na triagem de inibidores seletivos

O tratamento de diversas doenças através de intervenção quimioterápica por inibição seletiva de enzimas envolvidas em processos vitais nos organismos infecciosos tem sido explorado com sucesso na medicina moderna e é bem representado pelo número de fármacos (antivirais, antiparasitários e antibióticos), em uso clínico que atuam como inibidores enzimáticos. A necessidade de novos fármacos tem estimulado a pesquisa pelo desenvolvimento de fármacos que atuem como inibidores enzimáticos e a triagem de substratos e/ou inibidores que se liguem seletivamente ao alvo em estudo torna-se interessante. No entanto, há a necessidade do desenvolvimento de técnicas e ensaios que reduzam o número de possíveis candidatos (Copeland, 2013).

Uma maior compreensão do papel representado pelos sistemas biológicos tem desafiado a busca por novos fármacos com alvo único ou envolvendo inibidores multi alvos, sendo uma abordagem em ascensão da farmacologia molecular. Contudo, devem-se entender os efeitos destas drogas em redes biológicas, para que seja possível melhorar a eficácia, não se esquecendo também da toxicidade envolvida no tratamento das doenças (Hopkins, 2008; Viayna, Sabate, & Muñoz-Torrero, 2013).

Os ensaios biológicos automatizados em larga escala (no inglês high throughput screening, HTS) para triagem de inibidores enzimáticos são métodos fundamentais para a identificação de novos ligantes. Os métodos mais usualmente utilizados envolvem ensaios espectrofotométricos, colorimétricos ou fluorimétricos, utilizando o formato de multipoços. Entretanto, tais ensaios apresentam desvantagens como: 1) necessidade de reagentes colorimétricos e fluorimétricos adequados para gerar um sinal; 2) interferências causadas por compostos que absorvem ou florescem em comprimentos similares ao do reagente; 3) ineficiência para triagem em misturas; 4) usualmente utilizam complexos sistemas robotizados (Houston & Banks, 1997). Vários grupos têm descrito análises off-line do substrato, produtos ou inibidores no espectrômetro de massas (Benetton et al., 2003; Bothner et al., 2000; Pi, Armstrong, Bertozzi, & Leary, 2002; Pi & Leary, 2004). Em outros trabalhos, os reatores são

utilizados em fluxo e o complexo enzima-substrato ou enzima-inibidor eluem através de uma alça onde a reação enzimática acontece. Em seguida todos os componentes (enzima, substrato e inibidor) são inseridos no sistema de espectrometria de massas para o monitoramento da atividade enzimática (de Boer et al., 2004). Como desvantagem, esses sistemas exigem alíquotas de enzimas frescas para cada análise.

Uma alternativa promissora aos ensaios convencionais é o emprego da cromatografia de bioafinidade na identificação de ligantes em misturas complexas. A cromatografia de bioafinidade ou biocromatografia é considerada uma das técnicas cromatográficas mais versáteis e é definida como um método cromatográfico que utiliza um agente de ligação específico como uma fase estacionária para purificação ou análise de uma mistura de compostos. Como esta definição sugere, as interações que ocorrem na cromatografia de afinidade são as mesmas presentes em vários sistemas biológicos, como a interação enzima-substrato ou a interação de um antígeno com o anticorpo. A elevada especificidade destas interações fornece a esta técnica um elevado grau de seletividade (Schiel, Mallik, Soman, Joseph, & Hage, 2006).

Inicialmente, a cromatografia de bioafinidade foi utilizada no isolamento e purificação de misturas biológicas complexas, mas, revela-se como uma poderosa ferramenta para monitorar as interações ligante-proteína, substrato-proteína, inibidor-proteína e ligante-receptor e tem demonstrado grandes vantagens como uma das técnicas de triagem de alta eficiência HTS (Girelli & Mattei, 2005; Moaddel, Bullock, & Wainer, 2004; Nie & Wang, 2009) .

A cromatografia de bioafinidade envolve, essencialmente, três passos: 1) a imobilização de um alvo; 2) a avaliação das modificações sofridas pela biomolécula, após a imobilização; e 3) a determinação dos parâmetros de afinidade do ligante, depois da inserção da proteína imobilizada no sistema de separação (Nie & Wang, 2009). Muitas informações importantes sobre a afinidade das ligações (K_d e K_a) usadas para descrever o processo ligante-receptor, a ligação com a proteína e o equilíbrio, bem como as constantes cinéticas (K_M) e a constante de inibição (K_i), usadas para descrever o efeito de um inibidor reversível sobre a enzima alvo, podem ser obtidas utilizando os princípios da cromatografia de bioafinidade. Trata-se, portanto, de um método útil no desenvolvimento de fármacos ou pró-fármacos que se liguem a alvos biológicos seletivos.

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. Um parâmetro muito importante que deve ser considerado no desenvolvimento de um protocolo de imobilização é o método de imobilização empregado. Como ilustrado na Figura 1.1, estes se baseiam nas ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte sendo; por adsorção, ligação covalente, ligação cruzada, ou por confinamento em matriz ou microcápsula (Cardoso, Moraes, & Cass, 2009).

Figura 1.1: Métodos de imobilização de enzimas (Cardoso et al., 2009).

A utilização de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando como suporte, biorreatores ou IMERs (do inglês Immobilized Enzymes Reactors), permite a junção de características de ambos como: seletividade, rapidez, reprodutibilidade e ensaios não destrutivos com a especificidade e sensibilidade de uma reação enzimática. Com isso, há um grande aumento da sensibilidade em sistemas de detecção o que favorece a determinação de componentes em traços em matrizes complexas.

A imobilização de enzimas a suportes cromatográficos apresenta diversas vantagens, sobre a utilização de enzimas livres em solução, entre as quais destacamos: 1) a utilização de pequenos volumes de amostra (pL-nL); 2) aumento do tempo de vida e da estabilidade da enzima em relação à temperatura, solventes orgânicos e variação de pH sem perda considerável da atividade catalítica; 3) reutilização; 4) pequeno manuseio da amostra, evitando contaminações e 5) fácil separação da enzima dos produtos da reação (Girelli, Mattei, & Messina, 2007; Zhang, Xiao, Kellar, & Wainer, 1998). Essas vantagens são úteis nos estudos enzimáticos on-line, onde os produtos da reação enzimática e os inibidores são detectados diretamente por UV-vis,

fluorescência ou espectrometria de massas (de Boer, Lingeman, Niessen, & Irth, 2007).

Existem duas principais classes de aplicações analíticas dos biorreatores enzimáticos ou IMERs. Na primeira classe estão às aplicações biocatalíticas, que utilizam as reações enzimáticas para obter um produto de interesse, ou ainda transformar um analito em uma espécie mais facilmente detectável (Koeller & Wong, 2001). A segunda classe engloba os biorreatores desenvolvidos para triagem de substratos e para os estudos das características cinéticas das enzimas (Urban, Goodall, & Bruce, 2006). Nessa segunda classe, os IMERs têm sido amplamente utilizados para separação e identificação de metabólitos (Hodgson, Besanger, Brook, & Brennan, 2005), nos estudos de metabolismo dos fármacos (Markoglou, Hsuesh, & Wainer, 2004; Pasternyk, Ducharme, Descorps, Felix, & Wainer, 1998), para análise e síntese enantiosseletiva (Koeller & Wong, 2001), na digestão proteolítica de proteínas on-line (Calleri et al., 2004), no controle biotecnológico de fármacos (Temporini et al., 2006) e para a identificação de substratos e/ou inibidores na busca por novos e potenciais fármacos (Bartolini, Cavrini, & Andrisano, 2004, 2007). Também merece destaque o uso de enzimas imobilizadas como biosensores em aplicações biomédicas (Liang, Li, & Yang, 2000).

Os biorreatores enzimáticos podem ser preparados em diferentes formatos e utilizados acoplados a sistemas cromatográficos em diferentes configurações como pré-coluna, pós-coluna ou até mesmo como a coluna do sistema cromatográfico como ilustrado no Esquema 1.1.

Esquema 1.1: Representações esquemáticas das configurações dos IMERs em sistemas para estudos on-line. A) O IMER como pós-coluna analítica. As amostras são transferidas da coluna analítica para o IMER através da válvula de desvio. B) Sistema multidimensional, o IMER como primeira coluna. A transferência do produto da reação é feita através de uma válvula de desvio. C) O IMER é acoplado diretamente ao detector. Cópia autorizada por Cardoso e Moraes (2009).

1.1.2. Desenvolvimento e caracterização de biorreatores enzimáticos

Além dos conhecimentos das propriedades físico-químicas da macromolécula selecionada para imobilização, como o conhecimento do sítio ativo da biomolécula, a fim de evitar a perda da atividade enzimática pela ligação dos sítios ativos ao suporte e, o conhecimento das propriedades bioquímicas da enzima (massa molecular, pureza e estabilidade), a escolha do modo de imobilização e do suporte são fatores determinantes no processo de imobilização (Markoglou & Wainer, 2003).

Deve-se ainda levar em consideração em um desenvolvimento os grupos funcionais, tamanho de poro, se houver, e diâmetro da partícula do suporte. A morfologia interna dos suportes é a chave para uma boa imobilização, pois determina as possibilidades de multi-interações enzima-suporte, além de interações secundárias

indesejáveis entre ligantes-suporte (Cardoso et al., 2009; Girelli & Mattei, 2005; Mateo et al., 2002).

Os vários métodos de imobilização de biomoléculas a suportes cromatográficos se baseiam nas ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte. A imobilização de enzimas pode ser feita “in batch” ou “in situ”. No processo “in batch”, a enzima é primeiramente imobilizada sobre o suporte cromatográfico e em seguida empacotada na coluna. Já no processo “in situ”, a enzima é imobilizada diretamente na coluna previamente empacotada; modo de imobilização utilizado neste trabalho. O suporte determina a acessibilidade dos sítios ativos ao substrato. A superfície dos suportes tem uma importante contribuição na manutenção da estrutura terciária da biomolécula, o que influencia enormemente na estabilidade e a atividade catalítica da mesma. O suporte ideal deve ser inerte, estável e resistente à força mecânica.

A configuração de biorreatores em capilares de sílica ou ICERs (do inglês Immobilized capillary enzymes reactors) já tem sido avaliada por alguns grupos (Cardoso et al., 2006; da Silva et al., 2013; Moaddel et al., 2004; Shi & Crouch, 1999). Nesta técnica as enzimas são ligadas à parede interna de um capilar de sílica fundida, no qual os reagentes são introduzidos e onde ocorre a interação enzima-substrato.

Os IMERs têm sido usados em diferentes áreas da química, em estudos farmacológicos e de metabolismo, como ilustrado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Diferentes suportes e enzimas imobilizadas e aplicações dos IMERs obtidos (Cardoso et al., 2009).

Suporte	Técnica de imobilização	Enzima	Comentários
Sílica aminopropilada	Covalente	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Imobilização <i>in situ</i> . Emprego no estudo de reações enantiosseletivas
Octadecil sílica	Adsorção	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Imobilização <i>in situ</i> . Emprego no estudo de reações enantiosseletivas
Tiopropil sefarose	Ligação covalente(S-S)	Diidrofolato Redutase de <i>Plasmodium falciparum</i>	Avaliação de inibidores com maior afinidade pela

Meio de interação conectivo monolítico formato de disco (CIM)	Covalente	Acetilcolinesterase recombinante humana (rhAChE)	enzima a partir de bibliotecas de moléculas. Estudo e caracterização de inibidores reversíveis e pseudo-reversíveis
--	-----------	--	---

1.1.3. Imobilização de enzimas alvo de doenças negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs), refere-se a doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários, provocando doenças como Doença de Chagas, Doença do Sono, Leishmanioses, Malária, Esquistossomose, entre outras e afetam predominantemente os indivíduos mais pobres, ameaçando a vida de mais de 1 bilhão de pessoas no mundo, incluindo meio bilhão de crianças (Lancet, 2014).

Muitas enzimas de parasitos causadores de DTNs já foram e tenho sido validadas como alvos para estudo de inibidores, com possível uso farmacológico. Entre alguns destes estudos, podemos citar os trabalhos feitos por Cardoso et al. (2008); (2006), onde a enzima gGAPDH (via glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas) e humana foram imobilizadas em capilares de sílica fundida como ferramenta para a triagem de inibidores, sendo a enzima humana estudada para avaliar a especificidade. Além do trabalho feito por de Moraes, Cardoso, e Cass (2013), que mostra a enzima PNP (Purina nucleosídeo fosforilase) de *Schistosoma mansoni* (Esquistossomose) também imobilizada em IMERs.

Outros trabalhos como o de Price, MacLean, Marrison, O'Toole, e Smith (2010), mostram a imobilização do próprio parasito; onde neste trabalho foi utilizado os parasitos *Trypanosoma brucei* (Doença do Sono) e *Leishmania major* (Leishmaniose) e imobilizados em um gel termoreversível, podendo ser usados para diversas aplicações, inclusive fazer a avaliação da inibição de enzimas alvos por meio de marcadores e anticorpos.

1.1.4. Doença de Chagas

Alguns parasitos protozoários da família Trypanosomatidae causam uma grande variedade de doenças graves como a tripanossomíase, conhecida como doença de Chagas. A doença de Chagas é uma doença de potencial risco de vida causada pelo protozoário parasito *T. cruzi* e constitui-se, em termos de impacto social e econômico, em um dos mais graves problemas de saúde pública na América Latina. Ela é transmitida aos humanos pelo vetor, *Triatoma infestans*, inseto conhecido no Brasil popularmente como “vinchuca”, “barbeiro”, etc e kissing bugs nos Estados Unidos e Europa. A infecção também pode ocorrer através de transfusão sanguínea, transmissão congênita, transplante de órgãos, incidentes laboratoriais ou através da ingestão de comida ou bebida contaminada (Stramer et al., 2007).

Aproximadamente 120 milhões de pessoas correm o risco de contrair a infecção na América Latina, onde a doença é endêmica em quinze países. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença afeta de 7 a 8 milhões de pessoas, mais ou menos 40 milhões de pessoas estão em risco e 200.000 novos casos são registrados todos os anos. Entretanto devido à migração em grande escala de latino-americanos para diversas partes do mundo, a doença de Chagas se tornou um problema de saúde global (Pita & Pascutti, 2011; WHO, 2014). Nos últimos anos tem sido relatado o aumento dos casos desta doença nas áreas urbanas da América do Norte. A transmissão vetorial está confinada ao continente Americano enquanto que a infecção por transfusão sanguínea ou de mãe para filho ocorre quando indivíduos com a infecção crônica migram (Alvim, Dias, Castilho, Oliva, & Corrêa, 2005; Buckner & Urbina, 2012). Cerca de 3 milhões das pessoas infectadas tem desenvolvido complicações severas, caracterizadas por cardiopatia crônica, lesões digestivas e distúrbios neurológicos, levando a morte cerca de 45 mil pessoas ao ano (WHO, 2014).

É estimado que aproximadamente 100.000 pessoas infectadas que residem nos Estados Unidos, tenham adquirido a doença enquanto residiam em área endêmicas. Contudo, vetores e animais infectados pelo *T. cruzi* foram encontrados em muitas partes dos Estados Unidos (Bern et al., 2007).

Esta doença é caracterizada por duas fases distintas, uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda apresenta alta parasitemia, sendo assintomática ou oligossintomática na grande maioria dos casos. Entretanto, dependendo do local de inoculação apresenta manifestações locais, como o sinal de Romaña (quando *T. cruzi* penetra na conjuntiva causando um edema bpalpebral unilateral), ou um chagoma de inoculação (quando penetra na pele, causando um edema). Durante a fase crônica os parasitos se encontram nos tecidos-alvo. Essa fase pode ser assintomática, durando a vida toda na maioria dos pacientes (70%), ou sintomática, que pode evoluir após a fase de latência e apresentar sintomatologia relacionada com o sistema cardiovascular (forma cardíaca), digestivo (forma digestiva), ou ambos (forma mista) (WHO-TRS, 2012).

Desde sua descoberta em 1909, vários tipos de tratamentos foram testados para a doença de Chagas, porém nenhum fármaco seguro e eficaz foi, até o momento, descoberto. Os fármacos nifurtimox (Lampit®, Bayer) e o benznidazol (Rochagan®, Roche), disponíveis há mais de 30 anos, são efetivos apenas na fase aguda da infecção (Figura 1.2). O nifurtimox não é mais comercializado no Brasil e em outros países como a Argentina, Uruguai e Chile. Estes fármacos apresentam baixa eficácia e severos efeitos colaterais, como anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, vômito, dermatite alérgica e neuropatia periférica (Coura, 2009).

Figura 1.2: Representação estrutural dos compostos Nifurtimox e Benznidazol.

Várias propostas de fármacos para o tratamento da doença de Chagas têm sido estudadas (Buckner & Urbina, 2012; Pita & Pascutti, 2011). No entanto, a descoberta de novas drogas com atuação em diferentes alvos e por diferentes mecanismos de ação é ainda uma necessidade crítica e uma tarefa desafiadora.

1.1.5. As Ecto-Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

As apirases do tipo E-NTPDases, enzimas ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (Figura 1.3) pertencem a classe das hidrolases (EC 3), agindo em anidridos (EC 3.6), que contenham fósforos (EC 3.6.1), com a capacidade de hidrolisar nucleotídeos extracelulares tri e difosfatados (EC 3.6.1.5) e estão presentes em diversos organismos. Essas enzimas são muito importantes para vários processos biológicos e têm sido muito estudadas com relação à sua importância em infecções causadas por patógenos (Sansom, Robson, & Hartland, 2008). Uma característica particular destas enzimas é a presença de 5 regiões conservadas de apirase (ACR), que são trechos curtos de aminoácidos que contêm os resíduos essenciais para a função da enzima (Sansom, 2012). Estas enzimas estão localizadas em diversas partes do parasito (na superfície celular e em diversas localizações intracelulares) e sua atividade catalítica é dependente da presença de cátions divalentes como Mg^{2+} e Ca^{2+} (Ashraf et al., 2011).

Figura 1.3: Estrutura cristalográfica da NTPDase-1 de Rato. A estrutura apresenta uma associação tetramérica (dois dímeros), em azul monômeros I e em verde monômeros II (Zebisch, Krauss, Schäfer, & Sträter, 2012).

Quando na presença de danos aos tecidos as células liberam ATP. A presença de ATP extracelular é interpretada pelo sistema imune como um “sinal de perigo” e estabelece uma resposta inflamatória ao dano. A NTPDase atua então como um modulador da resposta imune mediado pela hidrólise de ATP e ADP (Mizumoto et

al., 2002). Em mamíferos a NTPDase apresenta-se em 8 tipos (NTPDase 1 a NTPDase 8) e uma de suas associações é ao controle de nucleotídeos extracelulares prevenindo o início de um processo de coagulação e trombogenicidade (Ashraf et al., 2011).

As NTPDases estão presentes ainda em diferentes parasitos incluindo *Toxoplasma gondii* (Krug, Totzauer, & Sträter, 2013), *Trypanosoma cruzi* (Fietto et al., 2004), *Trichomonas vaginalis* (Giordani et al., 2010), *Leishmania infantum* (R. F. de Souza et al., 2013), entre outros. Nestes parasitos a NTPDase pode hidrolisar ATP extracelular a AMP diminuindo a resposta imune do hospedeiro (M. C. de Souza et al., 2010).

Considerando os importantes papéis do ATP, ADP e adenosina como moléculas extracelulares na modulação de processos inflamatórios e agregação de plaquetas e o papel proposto das NTPDases em interações patogênicas no hospedeiro, é possível especular que alguns efeitos *in vivo* observados devem ser correlacionados à habilidade de enfraquecimento do parasito ao modular os níveis destes nucleotídeos por inibição de NTPDase, sendo necessários novos experimentos para confirmar esta hipótese (Santos et al., 2009).

Além da dependência de cátions divalentes, estudos caracterizaram esta enzima com atividade ótima em pH 8,0 e também mostraram que associações enzimáticas foram eliminadas pelo uso de inibidores seletivos (Leal et al., 2005). Outros ainda têm sugerido que ecto-nucleotidases de agente patogênicos, incluindo parasitos, e de forma especial as NTPDases têm um papel crucial nos fatores de virulência. Dados suportam para o parasito *T. gondii*, a ideia que a ativação da NTPDase é um evento relacionado com o fim do ciclo de vida de um parasito intracelular e o começo de uma infecção celular (Krug et al., 2013).

T. cruzi apresenta até o momento somente uma NTPDase descrita, a NTPDase-1, que é capaz de hidrolisar ATP, ADP, UTP, UDP, GTP e GDP (Fietto et al., 2004; Mariotini-Moura et al., 2014; Santos et al., 2009). Devido à sua importância como facilitador e fator de virulência em *T. cruzi* (Santos et al., 2009), ela foi selecionada como o alvo biológico para o desenvolvimento de ICERs para triagem de ligantes seletivos.

1.1.6. Ensaios de monitoramento da atividade enzimática de NTPDase-1

Existem vários métodos para dosagem de atividade nucleotidásica, incluindo técnicas colorimétricas de dosagem de liberação de fosfato. A maioria das técnicas para a determinação de fósforo livre são baseadas na formação do complexo fosfomolibdato, pela reação do fósforo inorgânico com molibdato em uma solução ácida.

Este composto (incolor à amarelo claro) pode ser determinado diretamente pela absorção no UV, ou pela medida colorimétrica depois da redução a azul de molibdênio ou pela complexação com corantes tais como o verde de malaquita (Berti, Fossati, Tarenghi, Musitelli, & Melzi d'Eril, 1988; Taussky & Shorr, 1953). No esquema 1.2 podemos ver as reações que ocorrem no método por complexação com verde de malaquita, método este, utilizado na determinação de fósforo livre a partir de reações enzimáticas de ectonucleotidases (Wall, Wigmore, Lopatář, Frenguelli, & Dale, 2008).

Esquema 1.2: Catálise de enzimas para formação de fósforo inorgânico, P_i ; reação deste com molibdato de amônio (amarelo, com $\lambda_{\text{max}} \approx 446\text{nm}$) e complexação com reagente verde de malaquita (verde, com $\lambda_{\text{max}} \approx 640\text{nm}$). Esquema modificado de Hogan (2011).

1.1.7. Cinética enzimática

A velocidade de uma reação química é uma medida da conversão de reagente(s) em produto(s) por unidade de tempo. As reações químicas apresentam velocidades diferentes, avaliadas pelo consumo de reagentes ou pela variação da quantidade de

produtos formados, num dado intervalo de tempo. Nas reações catalisadas por uma enzima (E), os reagentes são chamados de substratos (S) e estes são convertidos em produtos (P), sendo reações reversíveis, como ilustrado na Figura 1.4.

Figura 1.4: Conversão do substrato S em produto P ao longo do tempo.

De acordo com a Figura 1.4, pode-se verificar que a velocidade de reação é mais elevada no início e que esta velocidade vai decrescendo ao longo do tempo. Isso ocorre pois à medida que o produto vai sendo formado e a concentração de substrato é menor, a reação inversa começa a acontecer. Logo, existe uma vantagem em medir velocidades apenas nos momentos iniciais, em que a variação de substrato não é significativa, não havendo necessidade de considerar a reação inversa. Assim, num determinado tempo, a velocidade de reação é dada pela Equação 1.1:

$$v = \frac{\text{produto formado}}{\text{tempo}} = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad \text{Equação 1.1}$$

No caso em que são estudadas apenas as velocidades iniciais (v_0), num intervalo de tempo inicial (Δt_0), esta equação transforma-se na Equação 1.2:

$$v_0 = \frac{\Delta P}{\Delta t_0} \quad \text{Equação 1.2}$$

A concentração de substrato, [S], numa reação enzimática, afeta a velocidade de reação, na medida em que aumentando a concentração [S] a velocidade de reação tende a aumentar, obtendo-se, entre este e a velocidade inicial, uma relação hiperbólica. Assim os valores da velocidade de reação, quando se aumenta a

concentração de substrato, tendem para um valor máximo, aproximando-se da cinética de ordem zero, em que a velocidade é independente da $[S]$. Este fato pode ser notado na Figura 1.5 (Nelson & Cox, 2004).

Figura 1.5: Efeito da concentração $[S]$ na velocidade inicial v_0 (Nelson & Cox, 2004).

O complexo enzima-substrato (ES) como intermediário de reações enzimáticas, ilustrado na Figura 1.6, é o responsável pelo perfil hiperbólico da curva Michaelis-Menten.

Figura 1.6: Esquema de uma reação enzimática, complexo enzima-substrato (ES) e formação de produto (P).

A teoria de Michaelis-Menten é uma simplificação, válida para a maioria das enzimas. Nos instantes iniciais da reação, a quantidade de produto formada é zero, o que torna unidirecional o segundo passo da reação. Quando a concentração de substrato torna-se suficientemente elevada para converter toda a enzima no complexo (ES), o segundo passo da reação torna-se limitante, de modo que a velocidade global de reação se torna cada vez mais insensível ao aumento de $[S]$, aproximando-se assim de uma assíntota (velocidade máxima, $v_{\max}$). Este comportamento pode ser traduzido pela Equação 1.3.

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equação 1.3}$$

Em que v_0 é a velocidade inicial para cada concentração de substrato $[S]$, v_{max} a velocidade máxima e K_M a constante de Michaelis (ou constante de equilíbrio de dissociação do complexo ES). A constante de Michaelis engloba as constantes k_1 , k_2 e k_{-1} que são constantes, logo, K_M não varia com a quantidade de enzima e é portanto uma característica da atividade da enzima. É assim, uma medida da afinidade do substrato em relação à enzima, ou seja, quanto maior o seu valor menor será a afinidade. A velocidade máxima, v_{max} , que é igual a $k_{-1}[E]$ e portanto é constante apenas para uma concentração de enzima fixa, é o valor para o qual tende a velocidade à medida que se aumenta a concentração de substrato. Corresponde à situação experimental em que todos os centros ativos das moléculas de enzima estão saturados de substrato. K_M iguala a concentração de substrato quando dividimos v_{max} por dois. A constante de Michaelis é assim igual à concentração de substrato para a qual a velocidade de reação é metade da sua velocidade máxima. Sendo assim, pode-se afirmar que a eficiência catalítica máxima de uma enzima é atingida a uma baixa concentração de substrato, quando o valor da constante de Michaelis é baixo (Nelson & Cox, 2004).

1.1.8. Inibidores enzimáticos

Toda substância que reduz a velocidade de uma reação catalisada enzimaticamente pode ser considerada um inibidor (drogas, antibióticos, venenos, toxinas, etc).

As enzimas catalisam potencialmente todos os processos celulares e possuem papéis importantes nos processos vitais e patológicos, e, portanto são alvo em estudos de desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos, e na busca por novos ligantes com o objetivo de agrotóxicos cada vez mais eficientes e menos agressivos tanto ao meio ambiente quanto à saúde humana. O método normalmente utilizado para a descoberta de novos inibidores, envolve a seleção da enzima cuja atividade está associada a alguma desordem ou doença (Cardoso et al., 2009).

O estudo dos inibidores das enzimas tem fornecido informações fundamentais a respeito dos mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir algumas vias metabólicas (Nelson & Cox, 2004).

Há duas classes principais de inibidores, os reversíveis e os irreversíveis.

Os reversíveis são compostos que se ligam em sítios específicos na enzima de modo que a atividade enzimática possa ser resgatada por meios físicos. Estes estão subdivididos em competitivos, não-competitivos, incompetitivos e/ou mistas de acordo com o modo de atuação de inibição. Os irreversíveis reagem covalentemente com a enzima inativando-a. Somente por meios químicos a atividade da enzima pode ser restaurada (Copeland, 2005; Nelson & Cox, 2004). Na busca de fármacos os inibidores reversíveis são de maior interesse, pois a administração da droga pode ser controlada, podendo ter seu efeito reverso quando necessário.

1.1.9. IC₅₀

A metade da concentração máxima inibitória (IC₅₀) é uma medida da eficácia de uma substância na inibição de uma função biológica ou bioquímica específica. Esta medida quantitativa indica a quantidade de uma substância necessária para inibir um determinado processo biológico (ou componente de um processo, ou seja, uma enzima, a célula, o receptor da célula ou microorganismo) pela metade. É comumente utilizada como uma medida da potência da droga antagonista em investigações farmacológicas (Yung-Chi & Prusoff, 1973).

1.1.10. Cromatografia de íon-par

A cromatografia de íon-par (IPC) foi originalmente desenvolvida a partir de um método de extração de solventes, chamado extração de íon-par. O método de extração de íons par envolve a aplicação de contra-íons na coluna, sendo feito depois a extração dos compostos de interesse para uma camada de solvente orgânico. Gel de sílica foi usado na aplicação inicial do IPC para HPLC, mas agora a maioria de IPC é realizada usando-se a cromatografia de fase reversa (RPC) (Shimadzu, 2014).

Consequentemente, a adição de contra-íons de uma substância iônica para formar íons-pares, reduz a polaridade e aumenta a força de retenção. Um sal de alquilsufanato, tal como o octano-1 sulfonato de sódio é geralmente utilizado como o reagente de par iônico para substâncias básicas. Íons tetra alquilamonio, tal como o hidrogeno sulfato de tetrabutil amônio (TBHS) são muitas vezes utilizados como um reagente de par iônico para substâncias ácidas (Figura 1.7). No geral, quanto maior a cadeia alquílica de um reagente de íon-par e quanto mais alta sua concentração, maior será a força de retenção da amostra (Shimadzu, 2014; Snyder, Kirkland, & Glajch, 1997).

Figura 1.7: Modelo simplificado da interação do íon-par com a fase sólida hidrofóbica da coluna e com a substância iônica (Shimadzu, 2014).

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Imobilização da enzima NTPDase-1 de *T. cruzi* em capilares de sílica fundida e desenvolvimento de um método analítico cromatográfico para triagem de inibidores seletivos.

2.2. Objetivos específicos

- Realização da expressão e purificação da enzima NTPDase-1 de *T. cruzi*.
- Estudo das condições ideais para a imobilização da enzima NTPDase-1 de *T. cruzi*.
- Desenvolvimento de métodos para avaliação da atividade cinética da enzima imobilizada.
- Determinação das condições cromatográficas ótimas para o acoplamento dos ICERs a um sistema cromatográfico.
- Realização dos estudos cinéticos para a enzima imobilizada e avaliação da estabilidade nas condições cromatográficas de análise.
- Triagem dos compostos Suramina e Cloreto de Gadolínio na enzima em solução e imobilizada

3. Procedimento Experimental

3.1. Materiais

A enzima NTPDase-1 (EC 3.6.1.5, de *T. cruzi*) foi obtida pela expressão e purificação, sendo seu plasmídeo fornecido pela Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto do Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa - MG (Santos et al., 2009). Seus substratos Adenosine 5'-triphosphate di(tris) salt hydrate (ATP), Adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP), Adenosine 5'-monophosphate disodium salt (AMP), Guanosine 5' triphosphate tris salt (GTP) e Guanosine 5'-diphosphate Tris salt from *Saccharomyces cerevisiae* (GDP) foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Componentes dos tampões e todos os reagents utilizados durante a expressão e purificação; imobilização e procedimentos cromatográficos foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, Alemanha), Synth (São Paulo, Brasil), ou Acros (Geel, Bélgica). A água utilizada em todas as preparações foi obtida do sistema MILLI-Q® (Millipore, São Paulo, Brasil). O capilar de sílica fundida (0,375 mm x 0,1 mm D.I.) foi comprado da Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, EUA). Todas as soluções tampão foram filtradas através de filtros de membrana de nitrato de celulose Phenomenex® de 0,45 µm e degaseificadas antes de serem usadas nos experimentos de HPLC.

3.2. Aparatos

Para o preparo do capilar e imobilização da enzima foi utilizada uma bomba seringa - Syringe Pump 2211 plus.

As análises foram realizadas no cromatógrafo líquido SHIMADZU – PROMINANCE, que possui duas bombas SHIMADZU LC 20 AD, onde uma delas está acoplada a uma válvula seletora de solvente SHIMADZU FCV-20AL para gradiente de baixa pressão; um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável SHIMADZU SPD-M20A; um auto-injetor SHIMADZU SIL-20A e uma válvula de seis caminhos VALCO que será utilizada para o sequenciamento de

colunas. O equipamento está acoplado a uma interface SHIMADZU CBM-20A e os cromatogramas são registrados através do software LC Solutions.

A homogeneização das amostras foi efetuada em um vórtex Heidolph Reax top.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica Marte, modelo AY220, com precisão 0,0001g.

As medidas de pH foram realizadas em pH-metro Marte MB 10 com precisão de 0,01.

Para a quantificação e ensaio de atividade da enzima em solução foi utilizado um sistema de leitura de microplacas de Elisa (Elisa readers – TPP).

3.3. Obtenção da enzima NTPDase-1 *T. cruzi*

3.3.1. Transformação das células competentes

Para cada transformação, foram utilizados 5 µL de plasmídeo DNA purificado (pET21b – Novagen) contendo o gene ao qual codifica a enzima NTPDase-1 *T. cruzi* (somente o ectodomínio da enzima, sem o peptídeo sinal). Foram adicionados a tubos tipo Eppendorf contendo 50 µL de células *E. coli* competentes (BL21 DE3 RIL), previamente preparadas (Howland, 1996). Subsequentemente, esta mistura foi incubada em gelo por 20 minutos. Então, foi dado um choque térmico de 42 °C por 90 segundos e retornado ao gelo por 2 minutos, por fim completado (em chama) com 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido (Sezonov, Joseleau-Petit, & D'Ari, 2007) sem antibióticos, 10 µL de glicose e 10 µL de MgCl₂; para as células se recuperarem do choque térmico. Este cultivo foi incubado por 1 hora a 37 °C e 180 rpm. Depois deste tempo, o cultivo foi colocado (em chama) em mais 4 mL de meio LB, com antibióticos (ampicilina 50 µg/mL, gentamicina 75 µg/mL e estreptomicina 75 µg/mL) e incubados por 12 a 16 horas a 37 °C e 180 rpm.

3.3.2. Expressão e purificação da proteína recombinante

Os 5 mL de cada cultivo expandido em meio líquido LB (com os antibióticos) foram colocados em um frasco de Erlenmeyer contendo 250 mL de meio LB com os mesmos antibióticos e incubados a 37 °C e 200 rpm para crescimento até chegar a

uma DO_{600} entre 0,6-0,8. Então, 0,1 mM do indutor IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) foi adicionado. O tempo de indução foi de 1 hora. As células foram recuperadas por centrifugação a 4 °C e 25.000g por 15 minutos em tubos tipo Falcon de 50 mL; e adicionado 25 mL de tampão de lise (100 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl), 1 mL de PMSF-phenylmethanesulfonylfluoride 4 mM (etanol) e Lisozima 1 mg/mL, e a lise foi feita utilizando-se um sonificador (20 amplitude, pulsos de 10 segundos por 6 vezes com igual intervalo em um banho de gelo). O resultante da lise foi centrifugado por 15 minutos a 4°C e 25.000g. O corpo de inclusão foi lavado com 20 mL de tampão de ligação (50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl e 2 M Uréia); centrifugado por 20 minutos a 4°C e 25.000g. O procedimento anterior foi repetido três vezes. 10 mL de tampão de lavagem (50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 8 M Uréia) foram adicionados ao corpo de inclusão, e transferido a um tubo do tipo Falcon de 25 mL, seguido dos passos de purificação.

A cada tubo foi adicionado 1 mL de resina de afinidade (Nickel Sepharose) previamente equilibrada em tampão de lavagem. Depois de uma hora de ligação à resina sobre agitação branda em uma bainha dentro da câmara fria, foi feita uma centrifugação rápida, onde todo o volume não ligado foi colectado (flow through). O tampão de lavagem foi passado através da resina (para descartar proteínas indesejadas) e tampão de eluição composto por 50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 8 M Uréia (sendo o composto Imidazol responsável pela eluição da enzima). As eluições foram reservadas para renaturação.

3.3.3. Eletroforese da proteína por SDS-PAGE

Depois de realizar a purificação da proteína, as amostras foram analisadas por SDS PAGE 9% (Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

15 μ L de cada amostra foram analisadas em 5 μ L de β -mercaptoetanol a 25 mA por aproximadamente 2 horas. Para comparar a massa molecular, 5 μ L do marcador de massa molecular foram utilizados. O marcador de massa molecular utilizado foi o Low Molecular Weight Calibration Kit (GE Healthcare) e contém como padrão as proteínas Fosforilase b (97 KDa), Albumina (66 KDa), Ovoalbumina (45 KDa), Anidrase Carbônica (30 KDa), Inibidor de tripsina (20,1 KDa) e α -lactalbumina (14,4 KDa). Os géis de poliacrilamida foram colocados em solução corante de Coomassie Blue com agitação por pelo menos 10 horas. Depois deste tempo, a

solução corante foi removida. Então, uma solução descorante (ácido acético 5%) foi adicionada, até visualização adequada das amostras.

3.3.4. Quantificação da proteína

A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford usando Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão na curva de calibração. O sistema reacional foi composto por 1 mL de reagente de Bradford e 20 µL da amostra. A mistura foi homogeneizada e a absorbância foi observada a 595 nm (Bradford, 1976).

3.3.5. Renaturação e Liofilização da Enzima

Depois da purificação e análise em SDS-PAGE, a enzima foi adicionada a um tampão de renaturação (mais de um foi testado, o primeiro continha Tris 100 mM; NaCl 0,6 M; GSH 2 mM; GSSG 1 mM; 33% Glicerol; o segundo Tris 150 mM; KCl 10 mM; NaCl 250 mM; GSH 2 mM; GSSG 0.2 mM; o terceiro Tris 150 mM; KCl 10 mM; NaCl 250 mM; GSH 4 mM; GSSG 1.5 mM e o quarto Tris 50 mM; NaCl 0.5 M). Este tampão faz com que a enzima assuma sua forma ou conformação funcional. O armazenamento foi feito em geladeira a temperatura de -4 °C, onde amostras podem ser usadas um dia após a renaturação; e mantido a esta temperatura enquanto houvesse atividade.

Além disto, amostras de enzimas purificadas, em tampão de purificação, foram liofilizadas (processo de desidratação). Armazenamento do liofilizado foi feito em freezer à temperatura de -20 °C. Quando necessário seu uso, a enzima foi pesada, feito a quantificação (item 3.3.4) e ressuspensa em tampão de imobilização, composto de Hepes 50 mM e NaCl 0,3 M.

3.4. Ensaio da enzima livre em solução

3.4.1. Avaliação da atividade específica da enzima *TcNTPDase1*

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços usando um sistema de leitura de microplaca (leitor de ELISA) para medir a absorbância. Para avaliar a

atividade fosfatásica da enzima, o Ensaio Colorimétrico de Verde de Malaquita foi utilizado (Taussky & Shorr, 1953).

A curva de calibração de fosfato livre (P_i) foi feita pela adição de 150 μL de tampão A (Hepes 50 mM pH 8,0, Tris 50 mM pH 8,0, MgCl_2 3 mM, NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM) e 10 μL do padrão KH_2PO_4 1,5 mg/mL no primeiro poço. Nos demais, foram adicionados 80 μL de tampão A e uma diluição seriada foi feita. A curva foi preparada em 12 pontos entre 62,5 à 0,49 nmol $P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$.

A reação da atividade enzimática foi avaliada pela adição de 16 μL de tampão B (cinco vezes mais concentrado que o tampão A), 3 μL dos nucleotídeos a 25 mM (foram testados ATP, ADP, GTP e GDP), 0,5 μg de enzima e água suficiente para completar 80 μL ; e finalmente incubado por 10 minutos a 37 °C.

Tanto para a curva de calibração quanto para a reação enzimática, 80 μL de HCl 0,2 M foram adicionados, para parar a reação; 40 μL de reagente colorimétrico (molibdato de amônio 86 mM: verde de malaquita 0,2% 1:3) foram adicionados e a solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e lido a 650 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4.2. Avaliação da influência de DMSO na atividade específica

Diferentes concentrações de DMSO (0,25; 1; 5; 10 e 15 %) foram adicionadas no procedimento de avaliação da atividade específica, ATPásica.

3.4.3. Teste de inibição da enzima *TcNTPDase1* em solução

Dois compostos descritos em Santos et al. (2009), foram testados como possíveis inibidores na enzima em solução. A Suramina foi descrita como inibidor da enzima NTPDase-1, testado diretamente no protozoário e na enzima em solução.

Os compostos Cloreto de Gadolínio (GdCl_3) e Suramina foram adicionados segundo o procedimento do item 3.4.1 numa concentração pontual de 100 μM , para avaliar a diminuição da atividade em relação ao substrato ATP.

3.5. Imobilização da enzima NTPDase-1 em capilares de sílica fundida

3.5.1. 1ª etapa: Pré-tratamento corrosivo do capilar de sílica fundida

Um capilar de sílica fundida de 100 cm (100 μ m D.I. $\times$ 0.375 mm) foi percolado com 2,0 mL de uma solução HCl 2 M; seguido de 1,0 mL de água MiliQ e aquecido, em estufa, por uma hora a 95 °C. Em seguida, 1,0 mL de uma solução de APTS 10% foi percolada através do capilar. O capilar foi aquecido, em estufa, por 30 minutos a 95 °C; e finalmente mantido em temperatura ambiente por 12 horas (da Silva et al., 2013).

3.5.2. 2ª etapa: Imobilização da NTPDase-1

Depois do pré-tratamento do capilar, 1,5 mL do agente homobifuncional glutaraldeído (em tampão fosfato 50 mM), usado como espaçador foi percolado, seguido de 2,0 mL de tampão fosfato 50 mM para impedir a polimerização do glutaraldeído. Uma solução contendo 0,03 mg/mL *TcNTPDase1* em tampão de imobilização (Hepes 50 mM e NaCl 0,3 M) foi percolado três vezes, onde as enzimas foram covalentemente imobilizadas. Finalmente, 1,0 mL de tampão de atividade foi percolado para eliminar todo fosfato livre presente (P_i).

No final deste processo, os 100 cm de capilar com a enzima já imobilizada foram cortados em três capilares de 30 cm, sendo armazenados em geladeira a 4 °C em tubos do tipo eppendorf perfurados e contendo tampão de trabalho da enzima (ver descrição no item 3.6).

O pré-tratamento e a imobilização foram realizados utilizando-se uma bomba seringa com fluxo de 130,0 μ L/min usando-se um método previamente descrito por da Silva et al. (2013).

3.6. Desenvolvimento do método cromatográfico multidimensional

As análises cromatográficas no *TcNTPDase1*-ICER foram realizadas a 25 °C. As análises foram feitas usando-se um método multidimensional onde o ICER foi usado como uma pré-coluna, onde a reação catalisada pela enzima acontece. O

produto e substrato restante são transferidos através de uma válvula de desvio de 6 caminhos para a coluna cromatográfica (três diferentes colunas foram testadas - Coluna C8 Supelco 10 cm x 3 mm, 2,7 μm ; Coluna C18 Supelco 10 cm x 3 mm, 2,7 μm e Coluna Luna C18 100A 250 x 4.6 mm, 5 μm) protegida por uma pré-coluna de mesma fase e micragem. A fase móvel na primeira dimensão (ICER) consiste em um tampão de trabalho da enzima, previamente otimizado composto por Hepes 50 mM pH 8,0, Tris 50 mM pH 8,0, MgCl_2 3 mM, NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM e a fase móvel na segunda dimensão (coluna cromatográfica) consiste de uma eluição isocrática com Metanol:Tampão C (KH_2PO_4 3 mM, NH_4Cl 50 mM, TBHS 80 mM), onde diferentes percentuais de solvente orgânico foram avaliados na otimização da separação. A vazão de operação do ICER e na coluna analítica também foi avaliada; com detecção a $\lambda=254$ nm. A Figura 3.1 ilustra as duas posições da válvula de desvio neste método multidimensional.

Figura 3.1: Posições da válvula de desvio do método multidimensional. O método começa na posição B, onde nada ainda está sendo transferido para a coluna cromatográfica. Na posição A, o fluxo da bomba C (injetor) vai através do ICER (onde a reação acontece) para a coluna cromatográfica, para coletar os produtos da reação. E finalmente, retorna para a posição B, onde a mistura das bombas A e B separam os produtos e os reagentes, sendo então detectados.

3.7. Validação do método cromatográfico

3.7.1. Curvas de calibração dos produtos

As curvas de calibração foram construídas utilizando-se diferentes concentrações dos nucleotídeos ADP e AMP (500, 400, 300, 200, 100, 50 e 25 μM).

A partir da solução de 25 μM foram preparadas 3 amostras (12,5; 6,25 e 3,125 μM) para identificar o limite de quantificação e de detecção. 10 μL de cada uma das concentrações foram injetados no sistema cromatográfico multidimensional como descrito anteriormente, em triplicatas independentes, porém ao invés do ICER foi colocado um capilar vazio (sem a enzima) de mesmo comprimento (30 cm). As análises de regressão linear usando o software Origin versão 8.0 foram empregadas para determinar as equações lineares e os coeficientes de correlação (R^2).

3.7.2. Validação do método analítico

Para a validação do método analítico, segundo parâmetros preconizados pela ANVISA - métodos bioanalítico (Cassiano, Barreiro, Martins, Oliveira, & Cass, 2009; Ribani, Bottoli, Collins, Jardim, & Melo, 2004), as seguintes figuras de mérito foram avaliadas: seletividade, linearidade, repetibilidade, precisão, exatidão, limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).

A precisão intra – dia e a exatidão foram avaliadas pela análise de três controles de qualidade em três diferentes concentrações (baixo, médio e alto - 40, 250, e 450 mM em relação ao intervalo da curva de calibração). Cinco amostras de cada concentração foram injetadas em um capilar vazio em três dias não consecutivos.

Amostras do branco (10 μL de tampão de trabalho da enzima) foram injetadas a cada sequência de análise para avaliação da seletividade (Cassiano et al., 2009; Ribani et al., 2004).

3.8. Determinação da atividade da enzima NTPDase-1 imobilizada

O *TcNTPDase1*-ICER preparado foi acoplado ao sistema de cromatografia líquida multidimensional, onde os eventos da válvula de desvio estão ilustrados no item 3.6. Para as análises, 10 μL de ATP em solução tampão foram injetados em triplicata. O reagente (ATP) e o produto (ADP) foram confirmados pela presença de dois picos no espectro adquirido pelo detector de DAD, já conhecidos os tempos de retenção pela adição de padrão.

Além disto, foi feita testada a atividade com outros nucleotídeos como ADP, GTP e GDP, para comparação da atividade específica, somente.

3.9. Estabilidade do *TcNTPDase1-ICER*

A estabilidade do *TcNTPDase1-ICER* foi determinada pela medida da atividade, sob as condições otimizadas, periodicamente. As análises foram realizadas em triplicata.

3.10. Estudo do parâmetro cinético K_M do *TcNTPDase1-ICER*

O parâmetro cinético, constante de Michaelis (K_M) foi obtido pela concentração de produto frente a diferentes concentrações do substrato ATP utilizando-se o *TcNTPDase1-ICER*.

As soluções estoque de ATP foram preparadas nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM e 10 mM. As soluções utilizadas para a obtenção da curva foram preparadas a partir de diluições das soluções estoques nas seguintes concentrações: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,7; 1; 2; 3; 5 e 7 mM. Foram injetados 10 μ L das soluções de ATP, em duplicata, nas condições cromatográficas validadas.

Os dados experimentais obtidos foram analisados usando o software Sigma Plot versão 11.0 e o valor de K_M calculado através da análise de regressão não linear de melhor ajuste.

3.11. Estudo de inibição no *TcNTPDase1-ICER*

Assim como descrito no item 3.4.3 deste trabalho, os dois compostos Cloreto de Gadolínio ($GdCl_3$) e Suramina foram testados como possíveis inibidores da enzima NTPDase-1, utilizando-se o *TcNTPDase1-ICER* como ferramenta para esta avaliação. Uma concentração pontual de 100 μ M de cada inibidor foi injetada nas condições cromatográficas validadas, para avaliar a diminuição da atividade em relação ao substrato ATP, que foi injetado juntamente com os inibidores numa concentração de 1 mM.

3.11.1. Determinação da Potência Inibitória (IC₅₀) no *Tc*NTPDase1-ICER

As soluções estoque do inibidor Suramina, nas concentrações de 1 mM e 1 µM, foram preparadas, utilizando-se o tampão de trabalho da enzima descrito no item 3.6. Para as curvas dose resposta, as concentrações variavam de 0,01 a 200 µM, com a adição da solução de substrato ATP (1 mM). As soluções foram preparadas em duplicata e alíquotas de 10µL foram injetadas.

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a concentração do produto da reação da enzima na presença do inibidor (C_i) com a concentração do produto da reação na ausência de inibidor (C₀), de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \left[\frac{C_i}{C_0} \times 100 \right] \quad \text{Equação 3.1}$$

Os dados experimentais obtidos foram analisados usando o software Sigma Plot versão 11.0 e o valor de IC₅₀ calculado através da análise de regressão não linear de melhor ajuste.

4. Resultados e discussão

4.1 Obtenção da enzima NTPDase-1 *T. cruzi*

4.1.1. Purificação da NTPDase-1 *T. cruzi* heteróloga

Para a realização deste trabalho, a apirase recombinante de *T. cruzi* (NTPDase-1), com aproximadamente 66 kDa foi expressa em sistema heterólogo bacteriano e purificada por cromatografia de afinidade. Como pode ser observada na Figura 4.1, na coluna E1, observa-se a presença de uma única banda no SDS-PAGE de eluição; onde o SDS (detergente) confere carga às proteínas, facilitando a separação por peso molecular; as proteínas de menor tamanho migram com maior velocidade que as de tamanho maior. A massa molecular observada para a NTPDase-1 recombinante purificada está de acordo com a proteína NTPDase-1 heteróloga predita, sem a sequência hidrofóbica amino-terminal e o sítio de clivagem proteolítico predito por Fietto et al. (2004), e adicionado os aminoácidos derivados do vetor clonador contendo a cauda de hexa-histidina (Cunha, 2010).

Deve ser dito que dois protocolos diferentes para a purificação foram avaliados. Um deles envolve a adição manual dos tampões na resina, com subseqüentes centrifugações; e no outro protocolo, as adições dos tampões foram feitas através do equipamento FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), onde o fluxo e as pressões são controlados. No segundo caso, as concentrações de enzima obtidas foram muito maiores do que aquela utilizando o primeiro protocolo descrito, sendo a partir de então, o protocolo escolhido para novas purificações.

Figura 4.1: Gel da NTPDase-1 *T. cruzi* purificada. 15 μ L de cada amostra foi aplicada em cada poço, mostrando a proteína purificada com aproximadamente 66 kDa. 10% SDS-PAGE corado com Coomassie Blue. LW - Ladder Weight (marcador peso molecular); W1 e W2 - Wash Buffer (tampão lavagem); E1 e E2 - Elution Buffer (tampão eluição).

4.1.2. Otimização do tampão de renaturação e estabilidade em solução

Vários tampões foram testados para identificar aquele que resultaria na melhor renaturação, e assim garantiria a melhor atividade da enzima NTPDase-1. Juntamente com o grupo LIMA-UFV, um tampão com atividade em todos os nucleotídeos tri e difosfatos foi encontrado. Na tabela 1, são mostrados todos os tampões utilizados nos testes e suas respectivas atividades utilizando ATP como substrato.

Tabela 4.1. Tampões de renaturação testados com respectivas atividades em ATP.

Tampão de Renaturação	Atividade ATPásica (nmol Pi/min/μg)
Tris 100 mM; NaCl 0,6 M; GSH 2 mM; GSSG 1 mM; 33% Glicerol	Sem atividade
Tris 150 mM; KCl 10 mM; NaCl 250 mM; GSH 2 mM; GSSG 0.2 mM	Sem atividade
Tris 150 mM; KCl 10 mM; NaCl 250 mM; GSH 4 mM; GSSG 1.5 mM	0,034
Tris 50 mM; NaCl 0.5 M	9,20

Comparando-se com os dados descritos por Mariotini-Moura et al. (2014), mesmo utilizando o tampão que apresentou a melhor atividade ATPásica, esta ainda permanece baixa. Uma razão seria devido a problemas relacionados com a concentração de enzima purificada e/ou renaturação inapropriada da enzima. Todavia, para os procedimentos realizados com a enzima imobilizada, a baixa atividade em solução não interfereu para a detecção no sistema cromatográfico.

A estabilidade desta enzima em solução também ficou de acordo com Mariotini-Moura et al. (2014), onde a atividade para a maioria dos nucleotídeos é crescente nos 5 a 6 primeiros dias após a renaturação e após este período começa um decrescimento bastante lento da atividade. Além disto, os valores de atividade para os demais nucleotídeos testados também estiveram de acordo, sendo GDP>GTP>ADP>ATP.

Neste trabalho a atividade foi observada sem perda da atividade catalítica por cerca de 90 dias.

4.1.2. Avaliação da influência de DMSO na atividade específica

A Figura 4.2 ilustra a atividade ATPásica relativa da *TcNTPDase-1* na presença de diferentes concentrações de DMSO. Observa-se que o DMSO, foi capaz de ativar a enzima, como já observado para a atividade ATPásica in vivo do *T. cruzi* (Santos et al., 2009).

Figura 4.2: Influência de diversas concentrações de DMSO na atividade específica.

A estabilidade por solvatação é encontrada em biomoléculas em geral. A formação de um bolso hidrofóbico ocorre durante a catálise enzimática, onde a água é expulsa do sítio ativo, local onde ocorrerá a reação com o substrato (Nelson & Cox, 2004). Estudos da estrutura de uma NTPDase mostram que, durante o estado de transição, as cargas negativas que se desenvolvem pelo ataque nucleofílico de uma molécula de água são estabilizadas por complexação do cátion metálico divalente (cofator) e por uma série de pontes de hidrogênio formadas a partir dos radicais aminoacídicos (Zebisch & Sträter, 2008). O DMSO possui um grande poder de solvatação, além de ser muito higroscópico, formando complexos com moléculas de água (Fuchs, McCrary, & Bloomfield, 1961). Este efeito pode favorecer o estado de transição, potencializando a atividade da enzima.

4.2. Desenvolvimento do Método Multidimensional

O desenvolvimento do método multidimensional foi feito testando mais de uma coluna analítica, como descrito no item 3.6, e otimizando-se os seguintes parâmetros: virada de válvula e consequentes vazões da primeira e segunda dimensão, pH e composição do tampão da segunda dimensão, além do percentual de solvente orgânico utilizado.

Para todo o desenvolvimento do método foram utilizadas três diferentes colunas analíticas, que serão descritas aqui separadamente, sendo elas:

4.2.1. Coluna C8 Supelco 10 cm x 3 mm, 2,7 µm

4.2.1.1. Otimização da virada de válvula

A virada de válvula foi otimizada para garantir que todo o produto que elui do *TcNTPDase1-ICER* fosse transferido para a coluna analíticas, responsável pela separação do produto e substrato na segunda dimensão cromatográfica do sistema multidimensional. A Figura 4.3 ilustra os tempos de virada avaliados. A faixa de tempo entre 0,50-7,50 minutos foi selecionada como a melhor, pois observo-se a melhor transferência do produto formado no ICER (um pico fino com maior área), comparado com os outros tempos estudados (menor pico e/ou mais largo).

Figura 4.3: Otimização do tempo de virada de válvula. Cromatograma mostra diferentes tempos para a virada de válvula. 0,85-5 minutos (verde); 0,85-7,5 minutos (vermelho); 0,50-5 minutos (preto) e 0,50-7,5 minutos (azul). Condições cromatográficas: vazões coluna analítica 0,2 mL/min e ICER 0,05 mL/min; $\lambda = 254$ nm; 10 μ L de ADP 1 mM foi injetado; MeOH 8,5%.

4.2.1.2. Otimização da vazão/ porcentagem de solvente orgânico

Utilizando-se a faixa de tempo entre 0,50-7,50 minutos que havia sido selecionado como a melhor virada de válvula foi testado então a separação do substrato (ATP) e dos produtos (ADP e AMP), utilizando diversas diferentes vazões no ICER e porcentagens de metanol. Na Figura 4.4, observa-se que nenhuma das condições testadas foi eficiente na separação dos picos.

Figura 4.4: Cromatograma mostra diversas porcentagens de metanol e diferentes vazões (em parenteses) para adquirir a melhor resolução entre os picos. Condições cromatográficas: vazão ICER 0,5 mL/min; $\lambda = 254$ nm; 10 μ L da mistura ATP/ADP 0.7 mM.

A condição que apresentou melhor separação foi utilizando-se metanol 7% e vazão de 0.22 mL/min (preto); contudo desta forma os picos não estão definidos e suas áreas não são exatas, não havendo assim, a possibilidade da validação do método.

Partindo-se do fato, que a separação ineficiente dos testes anteriores foram devido a seletividade do solvente orgânico, outro solvente foi selecionado para a separação, a ACN. Na Figura 4.5, pode ser observado os resultados utilizando-se diferentes porcentagens de ACN e diferentes vazões no ICER.

Figura 4.5: Diferentes porcentagens de ACN e vazões ICER para avaliação da separação. Condições cromatográficas: vazão coluna cromatográfica 0,2 mL/min; $\lambda = 254$ nm; 10 μ L da mistura ATP/ADP 0.7 mM.

No cromatograma em preto foi utilizado ACN a 8% e fluxo de 0,04 mL/min, porém a separação continuou sem sucesso, assim como em MeOH. Em azul, ACN a 6% e fluxo de 0,04 mL/min, obteve-se a melhor condição de separação, mas ainda assim, a separação não foi de linha de base não permitindo assim a quantificação. E no cromatograma em vermelho, ACN a 6% e fluxo de 0,035 mL/min, não houve efetiva separação e além disto, ocorreu desdobramento dos picos e rabiamento das bandas.

Apesar da mudança para um novo solvente orgânico, não houve uma condição onde a separação foi eficiente.

4.2.2. Coluna C18 Supelco 10 cm x 3 mm, 2,7 μ m

4.2.2.1. Avaliação da fase estacionária na separação

Outra alternativa era o uso de uma coluna cromatográfica de fase estacionária diferente, para que fosse testada a interação dos nucleotídeos com a fase estacionária. A coluna C18 descrita acima foi avaliada, onde todos os outros parâmetros eram idênticos aos da coluna C8 testada anteriormente.

Diferenças expressivas não foram identificadas, afirmando assim, que algo no sistema estava influenciando de tal forma a não permitir a otimização da separação. Em comparação a trabalhos deste mesmo grupo, foi observado que o tempo de transferência da primeira dimensão para a segunda dimensão (virada de válvula) estava muito superior, ou seja, o volume do tampão da primeira dimensão (tampão de trabalho da enzima) estava perturbando a estabilização do tampão da segunda dimensão, considerando o mecanismo de separação ser íon-par, e por tratar-se de um sistema muito sensível a qualquer alteração de vazão, pH e composição de íons no tampão de trabalho, a separação dos nucleotídeos não foram eficientes.

4.2.3. Coluna Luna C18 100A 250 x 4.6 mm, 5 μ m

4.2.3.1. Adaptação de um método pré estabelecido e separação dos nucleotídeos

Levando-se em consideração todos os problemas encontrados na otimização do método de separação em desenvolvimento, uma terceira coluna foi testada. Um método em desenvolvimento no grupo, pela aluna de mestrado Juliana Maria de Lima, já apresentava ótimas separações; com pH e composição do tampão da segunda dimensão, tempo de virada de válvula, fluxos da primeira e segunda dimensão já otimizados. Por este fato, este método foi adaptado utilizando-se o tampão de trabalho da enzima *TcNTPDase-1* na primeira dimensão e avaliando se haveria interferência na separação.

As condições cromatográficas utilizadas neste e nos procedimentos futuros e os tempos de virada de válvula e suas respectivas posições (ver Figura 3.1) estão apresentadas na tabela a seguir:

Tabela 4.2: Condições cromatográficas otimizadas, utilizadas nos ensaios.

	Primeira Dimensão	Segunda Dimensão
Tampão Utilizado	Hepes 50 mM pH 8,0, Tris 50 mM pH 8,0, MgCl ₂ 3 mM, NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM	KH ₂ PO ₄ 50 mM, NH ₄ Cl 80mM, TBHS 3 mM
Vazão	0,03 mL/min	1,00 mL/min
pH	8,0	4,7
Solvente Orgânico	0	16% MeOH
Virada de Válvula (tempo:posição)	0:00 – 0:30 0:31 – 8:00 8:01 – 20:00	Posição B Posição A Posição B

Na Figura 4.6, pode ser observado a separação dos três nucleotídeos com bons fatores de separação ($\alpha_{1-2} = 1,10$ e $\alpha_{2-3} = 1,16$), no tempo de aproximadamente 14 minutos, AMP (1); em aproximadamente 15,5 minutos, ADP (2) e em aproximadamente 18 minutos, ATP (3).

Como foi possível a obtenção de uma boa separação, esta condição foi utilizada para a validação do método cromatográfico como ferramenta de estudos de inibidores.

Figura 4.6: Cromatograma mostrando a separação dos nucleotídeos com bons fatores de separação (α). Condições cromatográficas utilizadas descritas na Tabela 4.2; 10 μ L de ATP 1,0 mM foram injetados.

4.3. Validação do método cromatográfico

As curvas de calibração foram construídas pelas quantificações das áreas das bandas cromatográficas, e a correlação entre as concentrações de ADP e AMP padrão injetadas, nas faixas de concentrações citadas no item 3.7.1. Os resultados foram proporcionais apresentando linearidade, conforme mostrado nas Figuras 4.7 e 4.8.

Figura 4.7: Curva de calibração do ADP.

Figura 4.8: Curva de calibração do AMP.

Com os três controles de qualidade selecionados 40, 250 e 450 μM (de ADP e AMP) foram avaliados a precisão intra – dia e a exatidão do método. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 4.3 e 4.4.

A precisão intradia foi expressa como o coeficiente de variação (CV%) e foram aceitos valores de CV menores ou iguais a 20%. A exatidão foi determinada em porcentagem, como a razão entre o valor médio encontrado pelo método e o valor de referência das concentrações adicionadas. Para a exatidão, foram aceitos desvios menores ou iguais a 15% do valor nominal da concentração (Ribani et al., 2004).

Tabela 4.3. Precisão intra dia (n=5) e exatidão do método de quantificação de ADP.

Concentração ADP ($\mu\text{mol/L}$)	1º dia		2º dia		3º dia		Média dos três dias	
	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
40	6,83	109,0	4,11	104,0	4,30	106,5	5,08	106,5
250	0,63	96,7	0,41	98,4	0,75	96,9	0,60	97,3
450	0,22	97,3	0,51	98,9	5,01	96,6	1,91	97,6

Tabela 4.4. Precisão intra dia (n=5) e exatidão do método de quantificação de AMP.

Concentração AMP ($\mu\text{mol/L}$)	1º dia		2º dia		3º dia		Média dos três dias	
	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
40	3,02	111,7	1,07	110,7	1,65	99,7	1,91	107,4
250	0,07	101,9	0,19	98,2	0,31	95,5	0,19	98,5
450	0,21	101,1	0,46	99,5	0,13	95,4	0,27	98,7

O LQ, a menor concentração onde a precisão e a exatidão de três amostras não excediram o valor de 20%, que foi de 12,5 μM para ADP e 25 μM para AMP. E o LD para o método foi calculado pela relação sinal/ruído com uma razão igual a 3. O valor encontrado foi de 10 μM para ADP e 15 μM para AMP (Cassiano et al., 2009; Ribani et al., 2004).

A seletividade do método foi garantida pelas análises de branco antes e após cada sequência de análise. Pelos valores obtidos dos parâmetros avaliados para métodos bioanalíticos, vimos que o método atende as exigências preconizadas pelas normas e, portanto foi utilizado na sequência dos estudos.

4.4 Determinação da atividade catalítica do *TcNTPDase1-ICER* e estabilidade

A atividade enzimática foi monitorada comparando-se o aumento das bandas dos produtos ADP e AMP pelo método validado, utilizando-se o *TcNTPDase1-ICER*, comparando-se com as bandas cromatográficas quando um capilar vazio foi acoplado ao sistema cromatográfico. A Figura 4.9 ilustra no cromatograma em preto os sinais quando se injeta o substrato, ATP 1 mM, no capilar vazio (sem enzima); e no cromatograma em vermelho, temos a banda, principalmente do ADP, em 15,5 minutos, aumentados, confirmando assim a atividade da enzima imobilizada.

Figura 4.9: Cromatograma mostrando a atividade da enzima imobilizada *TcNTPDase1-ICER*. Condições cromatográficas utilizadas descritas na Tabela 4.2; 10 µL de ATP 1,0 mM foi injetado. Em preto, capilar vazio e em vermelho capilar com a enzima imobilizada (*TcNTPDase1-ICER*).

Algo muito importante que deve também ser levado em consideração é a estabilidade da enzima no *TcNTPDase1-ICER*. O ICER desenvolvido permaneceu ativo durante 32 dias. Embora o período não seja tão longo quanto desejávamos, é suficiente para a realização de diversos estudos cinéticos e de mecanismos de inibição. A grande vantagem desse sistema, no entanto, está na reutilização da enzima; o que confere

economia no consumo de enzima fresca em solução, além de permitir reprodutibilidade das análises, uma vez que o mesmo lote de enzimas é utilizado.

Além disto, o armazenamento da enzima em sua forma liofilizada também foi avaliado com estudo de atividade em solução e após a imobilização, não sendo modificada a atividade da enzima. A atividade observada na Figura 4.9 é de uma enzima imobilizada que foi liofilizada e resuspendida em tampão de imobilização. A estabilidade de armazenagem máxima testada para a enzima liofilizada foi de 180 dias.

Outros nucleotídeos também foram testados como descrito no item 3.8 e a atividade específica foi mantida, como visto em solução, onde $GDP > GTP > ADP > ATP$, porém a atividade quando comparada aos outros substratos não apresentava valores tão superiores aos do ATP. Por este motivo e pelo fato de ter menor custo, o substrato ATP foi utilizado nos demais ensaios, de cinética enzimática e testes de inibição. Ainda deve ser levado em consideração que apesar de outros nucleotídeos, como o UTP, terem maiores valores de atividade específica, o K_M encontrado para o ATP foi bem menor que para os demais, como descrito por Mariotini-Moura et al. (2014).

4.5 Estudo do parâmetro cinético K_M

4.5.1. Avaliação de K_M no *TcNTPDase1-ICER*

A determinação do parâmetro cinético, K_M , permite avaliar a afinidade da ligação entre a enzima e o substrato. Ele corresponde à concentração do substrato onde a velocidade da reação é igual à metade da velocidade máxima de catálise.

Com o intuito de se determinar a eficiência catalítica do *TcNTPDase1-ICER* e a afinidade de ligação entre a enzima e um dos substratos, o ATP, os estudos foram realizados com o ICER e comparados com os resultados já encontrados em literatura para a enzima em solução (Mariotini-Moura et al., 2014).

Neste experimento, foram empregadas concentrações crescentes de ATP (0,025 – 7 mM). O valor de K_M encontrado foi de: $0,317 \pm 0,044$ mM para o *TcNTPDase1-ICER*, como visto na Figura 4.10.

Figura 4.10: Hipérbole de Michaelis-Menten para o *TcNTPDase1-ICER*.

Pela curva obtida observa-se que em baixas concentrações de substrato a velocidade da reação é diretamente proporcional a concentração de substrato, e, progressivos aumentos na concentração de substrato produzem incrementos cada vez menores na velocidade da reação. Assim o perfil da hipérbole está de acordo com a equação de Michaelis-Menten (Equação 1.3).

Apesar deste fato, o K_M encontrado para a enzima imobilizada é maior do que o K_M para a enzima em solução que de acordo com Mariotini-Moura et al. (2014) foi de 0,096 mM. Este aumento, de aproximadamente 3,3 vezes, era esperado e pode ser explicado por diversos fatores, como: modificação conformacional da molécula da enzima devido à alteração na estrutura terciária do sítio ativo; efeitos estereoquímicos que podem causar inacessibilidade ao sítio ativo da enzima; efeitos difusionais ou de transferência de massa, que têm origem na resistência de difusão do substrato até o sítio catalítico da enzima, e do produto da reação; e efeitos microambientais (Cardoso et al., 2009).

Cabe destacar ainda que, em solução usam-se condições estáticas e alíquotas frescas de enzima, e no método proposto as condições utilizadas estão em um sistema em fluxo. No entanto, observa-se que a seletividade e atividade enzimática foram mantidas no *TcNTPDase1-ICER*, permitindo a utilização do método proposto para triagem de inibidores.

4.6. Estudos de inibição

Estudos de inibição foram realizados no *TcNTPDase1-ICER*, para avaliar sua aplicação na triagem de inibidores. Os resultados obtidos para o *TcNTPDase1-ICER* foram comparados com o ensaio de inibição da *NTPDase-1* em solução. Apenas dois compostos foram testados, até o momento neste trabalho, sendo eles: Cloreto de Gadolínio e Suramina; os resultados preliminares seguem abaixo.

A concentração de ATP utilizado ($\pm 3,15$ vezes o valor de K_M), garante a saturação das enzimas imobilizadas no capilar.

4.6.1. Cloreto de Gadolínio e Suramina

Os resultados dos estudos inibição mostraram uma redução da área da banda quando adicionado uma concentração conhecida do inibidor Suramina, evidenciando um decréscimo na hidrólise do substrato. Já o Cloreto de Gadolínio, não mostrou inibição, nenhum decréscimo na área da banda foi observado, quando injetado no *TcNTPDase1-ICER*. A Figura 4.11, ilustra a diminuição da banda de absorção do produto ADP (banda em 15,5 min.) na presença do inibidor Suramina a 100 μM e na Figura 4.12, não ocorre diminuição da banda de ADP, não mostrando assim qualquer inibição, na presença de Cloreto de Gadolínio.

Figura 4.11: Cromatograma mostrando a diminuição atividade enzimática do *TcNTPDase1-ICER* na presença de Suramina a 100 μM . Condições cromatográficas utilizadas descritas na Tabela 4.2; 10 μL de ATP 1,0 mM foram injetados. Em vermelho, atividade com

injeção apenas de ATP e em preto, injeção de ATP e Suramina, mostrando diminuição da banda de ADP.

Figura 4.12: Cromatograma mostra que não há diminuição da atividade enzimática do TcNTPDase1-ICER na presença de Cloreto de Gadolínio. Condições cromatográficas utilizadas descritas na Tabela 4.2; 10 μ L de ATP 1,0 mM foram injetados. Em vermelho, atividade com injeção apenas de ATP e em preto, injeção de ATP e Cloreto de Gadolínio.

A porcentagem de inibição foi de 51% para o composto Suramina. Isto está de acordo com os testes de inibição estudados para a enzima em solução que apresentou 69% de inibição para o composto Suramina e apenas 12% para o composto Cloreto de Gadolínio, que já havia sido descrito anteriormente, como um não inibidor da NTPDase-1 de *T. cruzi* (Santos et al., 2009).

A curva de inibição foi obtida para o inibidor Suramina, porém mesmo nas concentrações mais altas da curva não apresentaram valores de inibição maiores que 52%. Os valores de inibição observados para Suramina evidenciam que este composto é um inibidor fraco da enzima NTPDase-1 de *T. cruzi*.

5. Conclusões

Após os estudos realizados neste trabalho, algumas considerações finais podem ser feitas.

Os métodos de expressão e purificação foram eficientes, obtendo-se a enzima purificada com atividade em tampão de renaturação otimizado, sendo que esta apresentou estabilidade de até 90 dias em solução.

Além disto, alíquotas da enzima purificada passaram pelo processo de liofilização, onde a atividade catalítica foi mantida após a ressuspensão diretamente no tampão de imobilização; e após a imobilização desta enzima no capilar. A vantagem deste procedimento foi a estabilidade de armazenamento da enzima, sendo observada atividade catalítica em até 180 dias.

A escolha do método e o processo de imobilização preservou a atividade da enzima com estabilidade por aproximadamente 32 dias, um período considerado não muito longo, porém o suficiente para realizar diversas amostras de possíveis inibidores.

As condições de separação do substrato e dos produtos da reação no sistema cromatográfico foram otimizadas e o método foi validado na melhor condição de separação, com tempo total de análise de 20 minutos.

A determinação do parâmetro cinético K_M com a enzima imobilizada foi realizada e os resultados evidenciaram o efeito da imobilização quando comparada com a enzima em solução, porém esta enzima ainda apresenta atividade, seletividade e mostra que a afinidade pelo substrato foi mantida.

Este bioreator é uma ferramenta promissora para o uso em estudos online de inibidores seletivos, já tendo sido feito testes preliminares de possíveis inibidores para a enzima, apresentando seletividade.

Visto as vantagens que o *TcNTPDase1-ICER* possui pode-se concluir que os objetivos deste trabalho foram alcançados com sucesso.

6. Referências bibliográficas

- Alvim, J., Jr., Dias, R. L. A., Castilho, M. S., Oliva, G., & Corrêa, A. G. (2005). Preparation and evaluation of a coumarin library towards the inhibitory activity of the enzyme gGAPDH from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, 763-773.
- Ashraf, M., Shah, S. M. A., Ahmad, I., Ahmad, S., Arshad, S., Ahmad, K., & Nasim, F. H. (2011). Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDase) inhibitory activity of some medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(10), 2090-2094.
- Bartolini, M., Cavrini, V., & Andrisano, V. (2004). Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies. *Journal of Chromatography A*, 1031(1-2), 27-34. doi: 10.1016/j.chroma.2003.11.080
- Bartolini, M., Cavrini, V., & Andrisano, V. (2007). Characterization of reversible and pseudo-irreversible acetylcholinesterase inhibitors by means of an immobilized enzyme reactor. *Journal of Chromatography A*, 1144(1), 102-110. doi: 10.1016/j.chroma.2006.11.029
- Benetton, S., Kameoka, J., Tan, A., Wachs, T., Craighead, H., & Henion, J. D. (2003). Chip-Based P450 Drug Metabolism Coupled to Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Detection. *Analytical Chemistry*, 75(23), 6430-6436. doi: 10.1021/ac030249+
- Bern, C., Montgomery, S. P., Herwaldt, B. L., Rassi, A., Jr., Marin-Neto, J. A., Dantas, R. O., . . . Moore, A. C. (2007). Evaluation and treatment of chagas disease in the united states: A systematic review. *JAMA*, 298(18), 2171-2181. doi: 10.1001/jama.298.18.2171
- Berti, G., Fossati, P., Tarengi, G., Musitelli, C., & Melzi d'Eril, G. V. (1988). Enzymatic Colorimetric Method for the Determination of Inorganic Phosphorus in Serum and Urine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 26(6), 399. doi: 10.1515/cclm.1988.26.6.399
- Bothner, B., Chavez, R., Wei, J., Strupp, C., Phung, Q., Schneemann, A., & Siuzdak, G. (2000). Monitoring Enzyme Catalysis with Mass Spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13455-13459. doi: 10.1074/jbc.275.18.13455
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

- Buckner, F. S., & Urbina, J. A. (2012). Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2(0), 236-242. doi: 10.1016/j.ijpddr.2011.12.002
- Calleri, E., Marrubini, G., Massolini, G., Lubda, D., de Fazio, S. S., Furlanetto, S., . . . Caccialanza, G. (2004). Development of a chromatographic bioreactor based on immobilized β -glucuronidase on monolithic support for the determination of dextromethorphan and dextrorphan in human urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(5), 1179-1189. doi: 10.1016/j.jpba.2004.02.033
- Cardoso, C. L., de Moraes, M. C., Carvalho Guido, R. V., Oliva, G., Andricopulo, A. D., Wainer, I. W., & Cass, Q. B. (2008). The development of an immobilized enzyme reactor containing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: the effect of species' specific differences on the immobilization. [10.1039/B711145B]. *Analyst*, 133(1), 93-99. doi: 10.1039/b711145b
- Cardoso, C. L., Lima, V. V., Zottis, A., Oliva, G., Andricopulo, A. D., Wainer, I. W., . . . Cass, Q. B. (2006). Development and characterization of an immobilized enzyme reactor (IMER) based on human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies. *Journal of Chromatography A*, 1120(1-2), 151-157. doi: 10.1016/j.chroma.2005.10.063
- Cardoso, C. L., & Moraes, M. C. (2009). Immobilized enzymes in the identification of new ligands. In N. P. Lopes & T. Guaratini (Eds.), *Analytical Chemistry for Pharmaceutical and Medical Sciences* (Vol. 37, pp. 91 - 109). Kerala: Transworld Research Network.
- Cardoso, C. L., Moraes, M. C., & Cass, Q. B. (2009). Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, 32, 175-187.
- Cassiano, N. M., Barreiro, J. C., Martins, L. R. R., Oliveira, R. V., & Cass, Q. B. (2009). Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, 32, 1021-1030.
- Copeland, R. A. (2013). Tight Binding Inhibition *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery* (pp. 245-285): John Wiley & Sons, Inc.
- Copeland, R. A. (Ed.). (2005). *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery : a guide for medicinal chemists and pharmacologists* New Jersey: John Wiley & Sons
- Coura, J. R. (2009). Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 549-554.
- Cunha, L. C. S. (2010). *Imunolocalização da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDASE-1) de Trypanossoma cruzi* Master, Universidade Federal de Viçosa.

- da Silva, J. I., de Moraes, M. C., Vieira, L. C. C., Corrêa, A. G., Cass, Q. B., & Cardoso, C. L. (2013). Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 73(0), 44-52. doi: 10.1016/j.jpba.2012.01.026
- de Boer, A. R., Letzel, T., van Elswijk, D. A., Lingeman, H., Niessen, W. M. A., & Irth, H. (2004). On-Line Coupling of High-Performance Liquid Chromatography to a Continuous-Flow Enzyme Assay Based on Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76(11), 3155-3161. doi: 10.1021/ac035380w
- de Boer, A. R., Lingeman, H., Niessen, W. M. A., & Irth, H. (2007). Mass spectrometry-based biochemical assays for enzyme-inhibitor screening. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(9), 867-883. doi: 10.1016/j.trac.2007.08.004
- de Moraes, M. C., Cardoso, C. L., & Cass, Q. B. (2013). Immobilized purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni* for specific inhibition studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(14), 4871-4878. doi: 10.1007/s00216-013-6872-7
- de Souza, M. C., de Assis, E. A., Gomes, R. S., Marques da Silva, E. d. A., Melo, M. N., Fietto, J. L. R., & Afonso, L. C. C. (2010). The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Tropica*, 115(3), 262-269. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.04.007
- de Souza, R. F., dos Santos, Y. L., de Souza Vasconcellos, R., Borges-Pereira, L., Caldas, I. S., de Almeida, M. R., . . . Fietto, J. L. R. (2013). Recombinant *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Tropica*, 125(1), 60-66. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.09.011
- Fietto, J. L. R., DeMarco, R., Nascimento, I. P., Castro, I. M., Carvalho, T. M. U., de Souza, W., . . . Verjovski-Almeida, S. (2004). Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(2), 454-460. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.071
- Fuchs, R., McCrary, G. E., & Bloomfield, J. J. (1961). Mechanisms of Nucleophilic Displacement in Aqueous Dimethyl Sulfoxide Solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 83(20), 4281-4284. doi: 10.1021/ja01481a043
- Giordani, R. B., Weizenmann, M., Rosemberg, D. B., De Carli, G. A., Bogo, M. R., Zuanazzi, J. A. S., & Tasca, T. (2010). *Trichomonas vaginalis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. *Parasitology International*, 59(2), 226-231. doi: 10.1016/j.parint.2010.02.004

- Girelli, A. M., & Mattei, E. (2005). Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Chromatography B*, 819(1), 3-16. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.01.031
- Girelli, A. M., Mattei, E., & Messina, A. (2007). Immobilized tyrosinase reactor for on-line HPLC application: Development and characterization. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 121(2), 515-521. doi: 10.1016/j.snb.2006.04.076
- Hodgson, R. J., Besanger, T. R., Brook, M. A., & Brennan, J. D. (2005). Inhibitor Screening Using Immobilized Enzyme Reactor Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77(23), 7512-7519. doi: 10.1021/ac050761q
- Hogan, M. (2011). Ask a Chemist: How Colorimetric Assays Work Retrieved Março, 2014, from <http://bitesizebio.com/7214/ask-a-chemist-how-colorimetric-assays-work/>
- Hopkins, A. L. (2008). Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nature Chemical Biology*, 4(11), 682-690. doi: Doi 10.1038/Nchembio.118
- Houston, J. G., & Banks, M. (1997). The chemical-biological interface: developments in automated and miniaturised screening technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(6), 734-740. doi: 10.1016/S0958-1669(97)80128-0
- Howland, J. L. (1996). Short protocols in molecular biology, third edition: Edited by F Ausubel, R Brent, R E Kingston, D D Moore, J G Seidman, J A Smith and K Struhl. P 836. John Wiley & Sons, New York. 1995. \$74.95. ISBN 0-471-13781-2. *Biochemical Education*, 24(1), 68-68. doi: 10.1002/bmb.1996.5690240143
- Koeller, K. M., & Wong, C. H. (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature*, 409(6817), 232-240. doi: Doi 10.1038/35051706
- Krug, U., Totzauer, R., & Sträter, N. (2013). The crystal structure of *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 represents a conformational intermediate in the reductive activation mechanism of the tetrameric enzyme. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(7), 1271-1276. doi: 10.1002/prot.24288
- Lancet, T. (2014). Neglected tropical diseases: becoming less neglected. *The Lancet*, 383(9925), 1269. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60629-2
- Leal, D. B. R., Streher, C. A., Bertoncheli, C. d. M., Carli, L. F. D., Leal, C. A. M., da Silva, J. E. P., . . . Schetinger, M. R. C. (2005). HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1746(2), 129-134. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.10.009

- Liang, J. F., Li, Y. T., & Yang, V. C. (2000). Biomedical application of immobilized enzymes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(8), 979-990. doi: 10.1002/1520-6017(200008)89:8<979::Aid-Jps2>3.0.Co;2-H
- Mariotini-Moura, C., Bastos, M. S. e., de Castro, F. F., Trindade, M. L., de Souza Vasconcellos, R., Neves-do-Valle, M. A. A., . . . Fietto, J. L. R. (2014). Trypanosoma cruzi nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. *Acta Tropica*, 130(0), 140-147. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.11.008
- Markoglou, N., Hsuesh, R., & Wainer, I. W. (2004). Immobilized enzyme reactors based upon the flavoenzymes monoamine oxidase A and B. *Journal of Chromatography B*, 804(2), 295-302. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.01.031
- Markoglou, N., & Wainer, I. W. (2003). Immobilized enzyme reactors in liquid chromatography: On-line bioreactors for use in synthesis and drug discovery. In D. W. Ian (Ed.), *Handbook of Analytical Separations* (Vol. 4, pp. 215-234): Elsevier Science B.V.
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pedroche, J., Fernández-Lafuente, R., & Guisan, J. M. (2002). Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment. *Biotechnology Progress*, 18(3), 629-634. doi: 10.1021/bp010171n
- Mizumoto, N., Kumamoto, T., Robson, S. C., Sévigny, J., Matsue, H., Enjyoji, K., & Takashima, A. (2002). CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nature Medicine*, 8(3), 358-365. doi: 10.1038/nm0402-358
- Moaddel, R., Bullock, P. L., & Wainer, I. W. (2004). Development and characterization of an open tubular column containing immobilized P-glycoprotein for rapid on-line screening for P-glycoprotein substrates. *Journal of Chromatography B*, 799(2), 255-263. doi: 10.1016/j.jchromb.2003.10.054
- Nelson, D., & Cox, M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry (4th Ed.)*. New York: W.H. Freeman.
- Nie, Y.-l., & Wang, W.-h. (2009). Immobilized Enzyme Reactor in On-line LC and Its Application in Drug Screening. *Chromatographia*, 69(1), 5-12. doi: 10.1365/s10337-008-0791-3
- Pasternyk, M., Ducharme, M. P., Descorps, V., Felix, G., & Wainer, I. W. (1998). On-line deconjugation of chloramphenicol- β -d-glucuronide on an immobilized β -glucuronidase column: Application to the direct analysis of urine samples. *Journal of Chromatography A*, 828(1-2), 135-140. doi: 10.1016/S0021-9673(98)00815-2

- Pi, N., Armstrong, J. I., Bertozzi, C. R., & Leary, J. A. (2002). Kinetic analysis of NodST sulfotransferase using an electrospray ionization mass spectrometry assay. *Biochemistry*, 41(44), 13283-13288. doi: Doi 10.1021/Bi020457g
- Pi, N., & Leary, J. A. (2004). Determination of enzyme/substrate specificity constants using a multiple substrate ESI-MS assay. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(2), 233-243. doi: 10.1016/j.jasms.2003.10.009
- Pita, S. S. d. R., & Pascutti, P. G. (2011). Alvos terapêuticos na Doença de Chagas: a tripanotona redutase como foco. *Revista Virtual de Química*, 3(4), 307-324. Retrieved from www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/view/198/193
- Price, H. P., MacLean, L., Marrison, J., O'Toole, P. J., & Smith, D. F. (2010). Validation of a new method for immobilising kinetoplastid parasites for live cell imaging. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 169(1), 66-69. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.09.008
- Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., & Melo, L. F. C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780.
- Sansom, F. M. (2012). The role of the NTPDase enzyme family in parasites: what do we know, and where to from here? *Parasitology*, 139(08), 963-980. doi: doi:10.1017/S003118201200025X
- Sansom, F. M., Robson, S. C., & Hartland, E. L. (2008). Possible Effects of Microbial Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases on Host-Pathogen Interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 765-781. doi: 10.1128/mmbr.00013-08
- Santos, R. F., Pôssa, M. A. S., Bastos, M. S., Guedes, P. M. M., Almeida, M. R., DeMarco, R., . . . Fietto, J. L. R. (2009). Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(3), e387. doi: 10.1371/journal.pntd.0000387
- Schiell, J. E., Mallik, R., Soman, S., Joseph, K. S., & Hage, D. S. (2006). Applications of silica supports in affinity chromatography. *Journal of Separation Science*, 29(6), 719-737. doi: 10.1002/jssc.200500501
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746-8749. doi: 10.1128/jb.01368-07
- Shi, Y., & Crouch, S. R. (1999). Micro-scale determination of glucose by capillary flow injection with an immobilized enzyme reactor. *Analytica Chimica Acta*, 381(2-3), 165-173. doi: 10.1016/S0003-2670(98)00729-6
- Shimadzu. (2014). Introduction to HPLC *LC World Talk Special Issue* (Vol. 1, pp. 28). Japan.

- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (1997). Ionic Samples: Reversed-Phase, Ion-Pair, and Ion-Exchange HPLC *Practical HPLC Method Development* (pp. 292-349): John Wiley & Sons, Inc.
- Stramer, S. L., Dodd, R. Y., Leiby, D. A., Herron, R. M., Mascola, L., Rosenberg, I. J., . . . Verani, J. R. (2007). Blood donor screening for Chagas disease. *MMWR*, 56, 141-143.
- Taussky, H. H., & Shorr, E. (1953). A Microcolorimetric Method for the Determination of Inorganic Phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 202(2), 675-685.
- Temporini, C., Perani, E., Mancini, F., Bartolini, M., Calleri, E., Lubda, D., . . . Massolini, G. (2006). Optimization of a trypsin-bioreactor coupled with high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for quality control of biotechnological drugs. *Journal of Chromatography A*, 1120(1–2), 121-131. doi: 10.1016/j.chroma.2006.01.030
- Urban, P. L., Goodall, D. M., & Bruce, N. C. (2006). Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies. *Biotechnology Advances*, 24(1), 42-57. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.06.001
- Viayna, E., Sabate, R., & Muñoz-Torrero, D. (2013). Dual Inhibitors of beta-Amyloid Aggregation and Acetylcholinesterase as Multi-Target Anti-Alzheimer Drug Candidates. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(15), 1820-1842.
- Wall, M. J., Wigmore, G., Lopatář, J., Frenguelli, B. G., & Dale, N. (2008). The novel NTPDase inhibitor sodium polyoxotungstate (POM-1) inhibits ATP breakdown but also blocks central synaptic transmission, an action independent of NTPDase inhibition. *Neuropharmacology*, 55(7), 1251-1258. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.08.005
- WHO-TRS. (2012). Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis (Vol. 975, pp. 116). Itália.
- WHO. (2014) Retrieved Março, 2014, from http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/
- Yung-Chi, C., & Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*, 22(23), 3099-3108. doi: 10.1016/0006-2952(73)90196-2
- Zebisch, M., Krauss, M., Schäfer, P., & Sträter, N. (2012). Crystallographic Evidence for a Domain Motion in Rat Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase (NTPDase) 1. *Journal of Molecular Biology*, 415(2), 288-306. doi: 10.1016/j.jmb.2011.10.050

- Zebisch, M., & Sträter, N. (2008). Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19), 6882-6887. doi: 10.1073/pnas.0802535105
- Zhang, Y., Xiao, Y., Kellar, K. J., & Wainer, I. W. (1998). Immobilized Nicotinic Receptor Stationary Phase for On-Line Liquid Chromatographic Determination of Drug-Receptor Affinities. *Analytical Biochemistry*, 264(1), 22-25. doi: 10.1006/abio.1998.2828