

DANIELLA ROMANO DE CARVALHO

Enzimas calicreína e ciclooxigenase imobilizadas: Estudo de condições para triagem de inibidores

Versão corrigida

Tese 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 Doutor em Ciências

Área de concentração: Química

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Carvalho, Daniella Romano

Enzimas calicreína e ciclooxigenase imobilizadas: Estudo de condições para triagem de inibidores. Ribeirão Preto, 2021.

114 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras a de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientadora: Cardoso, Carmen Lúcia.

1. Enzimas imobilizadas. 2. Triagem de ligantes. 3. Calicreínas. 4. Ciclooxigenase. 5. Inibidores enzimáticos.

CARVALHO, D. R. **Enzimas calicreína e ciclooxigenase imobilizadas: Estudo de condições para triagem de inibidores.** 2021. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Química) – Departamento de Química – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Aos meus pais Donizetti e Magali, pelo amor, dedicação, apoio e incentivo, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Carmen Lúcia Cardoso pela confiança e orientação durante a realização deste trabalho.

À técnica Olímpia por todo apoio no desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, pela amizade e bons momentos compartilhados nesses anos.

Aos colegas do laboratório GCBPN pelo convívio, conselhos e auxílio nos experimentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes pela colaboração e por ter me recebido em seu laboratório para as análises de fluorescência apresentados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes pelas amostras fornecidas.

À Luiza, minha prima querida, pela amizade, conselhos e apoio.

Ao Douglas por todo carinho, companheirismo e incentivo.

Aos meus pais, por todo amor, incentivo e suporte durante estes anos de estudo.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

À FAPESP e a CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

CARVALHO, D. R. **Enzimas calicreína e ciclooxigenase imobilizadas: Estudo de condições para triagem de inibidores.** 2021. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Química) – Departamento de Química – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A identificação de compostos que se liguem especificamente a alvos biológicos e que atuem como inibidores enzimáticos tem grande importância nos estudos de desenvolvimento de novos fármacos. Tal paradigma estimula o desenvolvimento de novos métodos de triagem para facilitar e reduzir o tempo de identificação dessas substâncias. Nesse contexto, os biorreatores com enzimas imobilizadas ou IMERs (do inglês *immobilized enzyme reactors*) têm se destacado como uma alternativa promissora aos ensaios de triagem convencionais. As enzimas calicreínas teciduais (KLKs, do inglês *kallikreins*) e ciclooxigenases (COXs) humanas desempenham papel importante em diversos processos fisiopatológicos no organismo. A desregulação na expressão e/ou atividade das KLKs, por exemplo, tem sido associada a diversas patologias como doenças de pele, distúrbios neurológicos e câncer, o que tem despertado considerável interesse na busca de inibidores de KLK. Já as COXs estão envolvidas na biossíntese de prostaglandinas, e são alvos de interesse nos estudos de desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios. Considerando a importância desta temática, este trabalho descreve a imobilização covalente da enzima KLK pancreática de porco em matriz de Sepharose-NHS, produzindo os biorreatores KLK-Sepharose-NHS. A enzima KLK imobilizada foi empregada em uma metodologia de ensaio *off-line* em formato multi-poços com detecção por fluorescência. KLK-Sepharose-NHS apresentou elevada atividade recuperada e manteve a habilidade de reconhecer o substrato sintético Z-Phe-Arg-AMC. Foram realizados estudos de inibição utilizando leupeptina como inibidor de referência para determinação da potência inibitória ($IC_{50} = 0,13 \pm 0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$) e mecanismo de inibição. Também avaliamos várias matrizes complexas (extratos de plantas e meios microbiológicos) para demonstrar a aplicabilidade de KLK-Sepharose-NHS. Outra proposta deste trabalho foi o desenvolvimento de ensaio *off-line* baseado em microcolunas de KLK imobilizada (IMER-KLK-Sepharose-NHS) com detecção por espectrometria de massas. Utilizando tal método foi possível determinar as condições ótimas do ensaio enzimático e os parâmetros cinéticos ($K_M = 16,3 \pm 2,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) para a enzima imobilizada, bem como realizar os estudos de inibição utilizando leupeptina como inibidor de referência ($IC_{50} = 0,89 \pm 0,12 \mu\text{mol L}^{-1}$). De maneira geral, a enzima KLK imobilizada mostrou ótima capacidade de reutilização e foi capaz de reconhecer o inibidor de referência (leupeptina), demonstrando que os modelos de ensaio propostos podem ser aplicados na triagem de inibidores. Este trabalho também descreve os esforços para imobilização da enzima COX-2 humana em capilares de sílica fundida e o estudo das condições de uso dos biorreatores em metodologia de ensaio *on-line* por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas.

Palavras-chave: Enzimas imobilizadas. Triagem de ligantes. Calicreínas. Ciclooxigenase. Inibidores enzimáticos.

ABSTRACT

CARVALHO, D. R. **Immobilized kallikrein and cyclooxygenase enzymes: Study of conditions for screening inhibitors**. 2021. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Química) – Departamento de Química – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The identification of compounds that specifically bind to biological targets and act as enzyme inhibitors is of great importance in studies of new drug development. This paradigm stimulates the development of new screening methods to facilitate and reduce the time taken to identify such substances. In this context, immobilized enzyme bioreactors or IMERs have emerged as a promising alternative to conventional screening assays. Human tissue kallikreins (KLKs) and cyclooxygenases (COXs) enzymes play an important role in various pathophysiological processes. The deregulation of KLK expression and activity, for example, has been associated with several pathologies such as skin diseases, neurological disorders and cancer, which has aroused considerable interest in the search for KLK inhibitors. COXs enzymes are involved in the prostaglandin biosynthesis, and they are targets of interest in studies on the development of new anti-inflammatory drugs. In this context, this work describes the covalent immobilization of the enzyme KLK from porcine pancreas in a Sepharose-NHS matrix, producing the KLK-Sepharose-NHS bioreactors. The immobilized enzyme was used in an off-line fluorescent microplate assay. KLK-Sepharose-NHS showed high recovered activity and maintained the ability to recognize the synthetic substrate Z-Phe-Arg-AMC. Inhibition studies were performed using leupeptin as a reference inhibitor to determine inhibitory potency ($IC_{50} = 0,13 \pm 0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$) and inhibition mechanism. We also evaluated several complex matrixes (plant crude extract and microbiological media) to demonstrate the KLK-Sepharose-NHS applicability. This work also describes the development of an off-line assay based on immobilized KLK microcolumns (IMER-KLK-Sepharose-NHS) with detection by mass spectrometry. Using such method, it was possible to determine the optimal conditions of the enzyme assay and the kinetic parameters ($K_M = 16,3 \pm 2,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) for the immobilized enzyme, as well as performing the inhibition studies using leupeptin as standard inhibitor ($IC_{50} = 0,89 \pm 0,12 \mu\text{mol L}^{-1}$). In general, the immobilized enzyme showed excellent reusability and was able to recognize the standard inhibitor (leupeptin), demonstrating that the proposed assay models can be applied in the inhibitors screening. This work also describes the immobilization of human recombinant COX-2 enzyme in fused silica capillaries and the study of the conditions of use of bioreactors in online assay methodology by using high performance liquid chromatography and mass spectrometry.

Keywords: Immobilized enzymes. Ligand screening. Kallikreins. Cyclooxygenase. Enzyme inhibitors.

SUMÁRIO

1. Introdução	9
2. Revisão bibliográfica	11
2.1. Calicreínas teciduais humanas	11
2.2. Ciclooxygenases	15
2.3. Ensaio enzimático para triagem de inibidores de KLK e COX.....	20
2.4. Imobilização de enzimas	21
2.5. Enzimas imobilizadas e ensaios de triagem de inibidores	25
3. Objetivos	29
4. Conclusão – PARTE I	30
5. Conclusão – PARTE II	31
6. Referências	32

1. Introdução

As enzimas desempenham papel fisiológico fundamental nos organismos e são consideradas importantes alvos biológicos para o desenvolvimento de fármacos, o que é bem representado pelos vários fármacos em uso clínico que atuam como inibidores enzimáticos. Os anti-inflamatórios não esteroidais como diclofenaco e ibuprofeno, por exemplo, atuam por inibição das enzimas ciclooxigenases (COXs), enquanto que os inibidores da enzima conversora de angiotensina são importantes medicamentos para o tratamento de hipertensão (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009; COPELAND; HARPEL; TUMMINO, 2007; HOLDGATE; MEEK; GRIMLEY, 2017). Assim, a identificação de novos compostos que se liguem especificamente a alvos biológicos e que atuem como inibidores enzimáticos é um passo crítico no desenvolvimento de novos fármacos.

A busca por novos compostos promissores é comumente realizada por ensaios bioquímicos *in-vitro* empregando a enzima alvo purificada ou recombinante para a triagem de inibidores em bibliotecas de compostos sintéticos ou de origem natural (meios microbiológicos e extratos de plantas). Tais ensaios referem-se à utilização de enzimas em solução e envolvem métodos colorimétricos ou fluorimétricos, geralmente utilizando o formato multi-poços (ALDEWACHI et al., 2021; CARDOSO; MORAES; CASS, 2009). Os ensaios de triagem de alto desempenho (HTS, do inglês *high-throughput screening*) permitem a análise de um grande número de compostos contra a enzima alvo através de ensaios miniaturizados e automatizados (FERREIRA; GLAUCIUS; ANDRICOPULO, 2011; HUGHES et al., 2011; SZYMAŃSKI; MARKOWICZ; MIKICIUK-OLASIK, 2012). Embora amplamente difundidos, o uso destes ensaios em solução envolve algumas limitações, principalmente com relação à baixa estabilidade e o alto custo de purificação das enzimas alvo. Além disso, muitos ensaios de triagem são realizados através de métodos indiretos de análise, o que promove a ocorrência de falsos positivos, especialmente ao se trabalhar com misturas complexas de compostos (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009; TRINDADE XIMENES et al., 2021).

Análises por espectrometria de massa (MS, do inglês *mass spectrometry*) também têm sido aplicadas como um método de detecção alternativo na triagem de novos compostos inibitórios. Nesse contexto, vários grupos têm descrito estudos envolvendo reações enzimáticas em solução, seguido por análises por MS para a

avaliação da atividade enzimática (BURKHARDT et al., 2015; CAO et al., 2011; DO AMARAL et al., 2019; LIU et al., 2014; XU; LIU; GUAN, 2017; ZHU et al., 2014). No entanto, como desvantagem, esses sistemas exigem alíquotas de enzimas frescas para cada análise, o que torna esses ensaios utilizando enzimas em solução uma etapa pouco viável para triagem de alto desempenho.

Nos últimos anos, grande interesse tem sido direcionado para desenvolvimento e a aplicação de novos ensaios de triagem que permitam a descoberta e identificação de moléculas bioativas de uma maneira mais rápida e mais eficiente. Nesse contexto, os ensaios baseados em enzimas imobilizadas têm se destacado como uma ferramenta promissora para a triagem de ligantes (DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019; GUO et al., 2019; TRINDADE XIMENES et al., 2021; WOUTERS et al., 2021). Em comparação com as enzimas livres em solução, as enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes às mudanças reacionais, e são facilmente separadas da mistura reacional, permitindo a sua recuperação e reutilização em vários ciclos de reação (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009; HOMAEI et al., 2013; MOHAMAD et al., 2015). Além disso, as enzimas imobilizadas permitem uma variedade de formatos de ensaios e podem ser utilizadas em reatores de processo contínuo em ensaios em fluxo para a triagem rápida de novos ligantes para a enzima alvo (DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019; DE SIMONE et al., 2019; FANG et al., 2012; WOUTERS et al., 2021).

Considerando a importância desta temática, as enzimas alvo selecionadas para esse trabalho foram as COX e calicreínas (KLKs, do inglês *kallikreins*). Essas enzimas desempenham um papel importante na fisiologia humana e estão relacionadas a várias condições patológicas, e por isso, são consideradas alvos atrativos para a busca de novos compostos que sejam candidatos a fármacos (PRASSAS et al., 2015; REGULSKI et al., 2016). Neste trabalho apresentamos os estudos de condições de utilização das enzimas COX e KLK imobilizadas em novas metodologias de ensaio para serem aplicadas na triagem de inibidores.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Calicreínas teciduais humanas

As proteases ou peptidases são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações peptídicas presentes em proteínas e são divididas de acordo com seus mecanismos de catálise em: serina proteases, cisteína protease, aspártica protease, treonina protease e metaloproteases (DRAG; SALVESEN, 2010; YOUSEF; DIAMANDIS, 2003). Dentre elas, destacam-se as serina proteases, que representam mais de um terço das proteases humanas, e estão envolvidas em diversos processos fisiológicos incluindo a digestão, a coagulação sanguínea, a resposta imune, entre outros (SOUALMIA; EL AMRI, 2018; YOUSEF; DIAMANDIS, 2003). A desregulação destas enzimas está, portanto, envolvida em uma ampla variedade de patologias e são consideradas alvos biológicos muito atraentes para a identificação de compostos que possam modular sua atividade (DRAG; SALVESEN, 2010; SOUALMIA; EL AMRI, 2018).

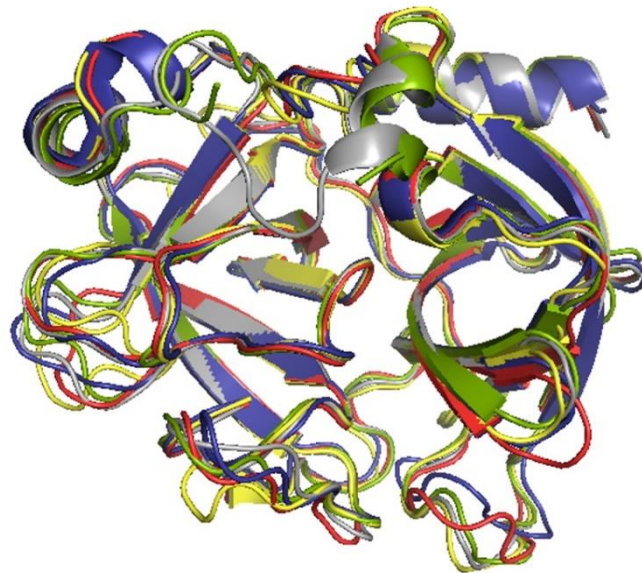
As KLKs teciduais humanas compreendem uma família de quinze serina proteases que são expressas em vários tecidos do corpo humano, incluindo a pele, os rins, o pâncreas, a próstata, as mamas e o sistema nervoso central, e estão envolvidas nos mecanismos regulatórios de muitos processos biológicos (KRYZA et al., 2016; PRASSAS et al., 2015; STEFANINI et al., 2015). A primeira KLK tecidual descrita foi denominada KLK1 e as quatorze restantes são chamadas de peptidases relacionadas à calicreína (KLK2-KLK15) (KALINSKA et al., 2016; PRASSAS et al., 2015; SOUALMIA; EL AMRI, 2018).

As KLKs são enzimas de cadeia única composta de 244 – 253 resíduos de aminoácidos, compartilham cerca de 40% de identidade e possuem estruturas tridimensionais semelhantes (Figura 1) (KALINSKA et al., 2016; SOTIROPOULOU; PAMPALAKIS; DIAMANDIS, 2009; STEFANINI et al., 2015). As KLKs são sintetizadas na forma de precursores inativos (zimogênios) chamados de pre-pro-KLKs, que são secretados para o meio extracelular após a remoção proteolítica do peptídeo sinal (pre-peptídeo). A pro-KLK é, então, ativada extracelularmente pela remoção proteolítica do pro-peptídeo, por autocatálise ou pela ação de outras proteases, formando a KLK madura e ativa (KALINSKA et al., 2016; MELLA et al.,

2020; PRASSAS et al., 2015; SOTIROPOULOU; PAMPALAKIS; DIAMANDIS, 2009; STEFANINI et al., 2015).

Figura 1. Estrutura tridimensional de diferentes KLKs.

Representação em *cartoon* da KLK1 (verde; PDB: 1SPJ), KLK3 (cinza, PDB: 2ZCL), KLK5 (vermelho; PDB: 2PSX), KLK6 (amarelo; PDB: 1L2E) e KLK7 (azul; PDB: 2QXH).

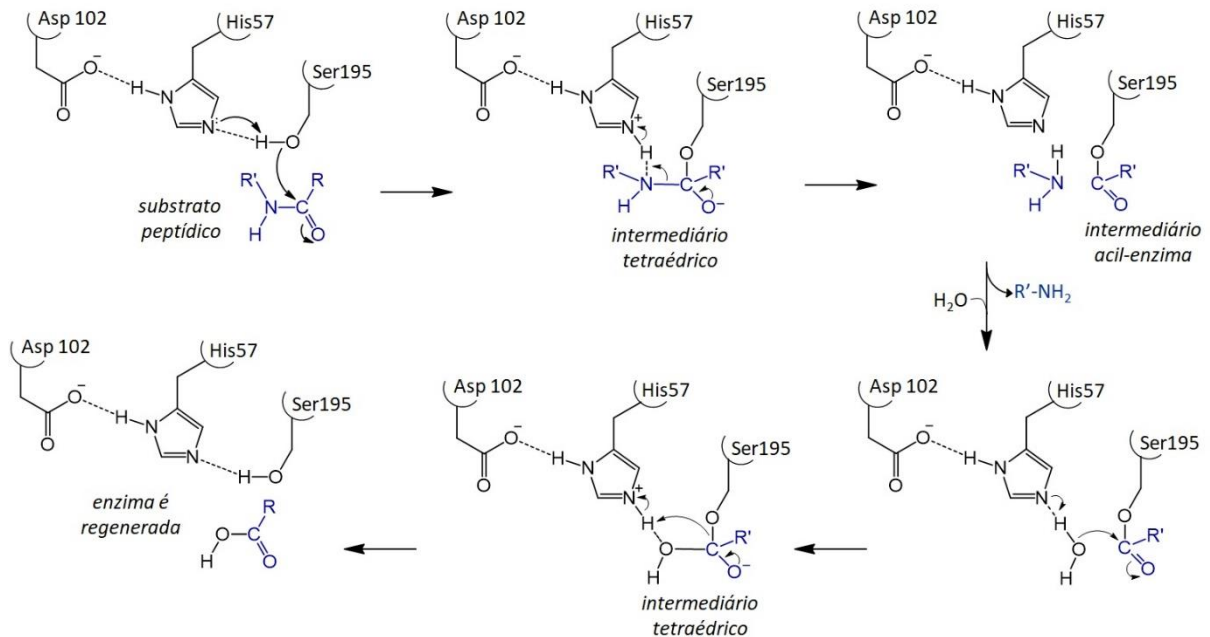


Fonte: o autor.

Uma vez ativada, as KLKs empregam o mecanismo clássico das serinas proteases (Figura 2). As KLKs apresentam três aminoácidos no sítio ativo que são essenciais para catálise: His57, Asp102 e Ser195, com o resíduo de histidina atuando como doador de prótons, o resíduo de aspartato orientando o anel imidazólico da His57, e o resíduo de serina atuando como um nucleófilo (PRASSAS et al., 2015). Estes três resíduos interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio e são denominados como tríade catalítica.

Figura 2. Mecanismo geral de reação das serina proteases.

O mecanismo das serina proteases pode ser resumido nas etapas de acilação seguida por um processo de desacilação. Na etapa de acilação, o grupo hidroxila de Ser195 ataca o grupo carbonila da ligação peptídica do substrato, formando um intermediário tetraédrico covalente entre a enzima e o substrato. O intermediário tetraédrico é desfeito com a liberação do segmento N-terminal e formação do intermediário acil-enzima. Em seguida, na etapa de desacilação, uma molécula de água é desprotonada e promove o ataque nucleofílico, formando um novo intermediário tetraédrico, que se desfaz com a liberação do segmento C-terminal e a regeneração da hidroxila da Ser195.



Fonte: Adaptado de PODDAR; MAURYA; SAXENA, 2017.

Tradicionalmente, a família das KLKs é conhecida pelo papel da KLK1 no sistema caliceína-cinina e pelo uso da KLK3 como biomarcador de câncer de próstata (PRASSAS et al., 2015; SOUALMIA; EL AMRI, 2018). A partir de diversos estudos desenvolvidos com essa classe de enzimas, grandes avanços foram feitos na compreensão da localização, regulação e funções fisiológicas da maioria das KLKs teciduais (KRYZA et al., 2016; PRASSAS et al., 2015; SOUALMIA; EL AMRI, 2018; STEFANINI et al., 2015). Atualmente, é bem conhecido que as KLK teciduais humanas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos como, por exemplo, descamação da pele, liquefação do sêmen, função renal, plasticidade neuronal e funcionamento do cérebro. Assim, a expressão e atividade desreguladas das KLKs tem sido associada a diversas patologias (KRYZA et al., 2016; MELLA et al., 2020; PRASSAS et al., 2015; SOTIROPOULOU; PAMPALAKIS, 2012; SOUALMIA; EL AMRI, 2018; STEFANINI et al., 2015).

Nas doenças respiratórias, a KLK1 é considerada como um potencial alvo terapêutico devido a sua elevada expressão em indivíduos com asma ou bronquite

crônica. A KLK1 é responsável pela liberação da cinica Lisil-bradicinina (calidina - um peptídeo composto de dez aminoácidos) a partir da clivagem do cininogênio de baixo peso molecular, resultando na ativação do receptor de bradicinina B₂, que induz a broncoconstrição das vias aéreas e hipersecreção de muco (KALINSKA et al., 2016; PRASSAS et al., 2015; SOTIROPOULOU; PAMPALAKIS, 2012). Além do sistema das vias aéreas, a KLK1 medeia papéis cruciais no sistema renal e cardiovascular (KALINSKA et al., 2016; PRASSAS et al., 2015).

As KLK5 e KLK7 desempenham um papel central no processo de descamação da pele e atuam na degradação de proteínas adesivas (desmogleína e desmocolina) na camada mais externa da pele humana (KISHIBE, 2019). Assim, atividades desreguladas de KLK5 e KLK7 tem sido associadas a doenças da pele como rosácea, dermatite atópica e psoríase (DE SOUZA et al., 2019; KISHIBE, 2019; PRASSAS et al., 2015; SOUALMIA; EL AMRI, 2018). Além disso, outros estudos também relacionaram as KLK5 e KLK7 à Síndrome de Netherton, uma doença rara caracterizada por disfunção da barreira epidérmica (KISHIBE, 2019; PRASSAS et al., 2015; SOTIROPOULOU; PAMPALAKIS, 2012).

A desregulação das KLKs também tem sido observada em distúrbios neurodegenerativos. A KLK6 é a calicreína mais abundante no sistema nervoso central, mas sua função fisiológica no cérebro ainda não é completamente compreendida. Estudos demonstraram níveis alterados de KLK6 no cérebro de pessoas afetadas pela doença de Alzheimer, apontando sua função no metabolismo amilóide (DONG et al., 2014; MELLA et al., 2020; YOUSEF; DIAMANDIS, 2003). A esclerose múltipla é um outro exemplo de distúrbio neurodegenerativo em que os níveis de KLK6 são alterados. Em pacientes com este distúrbio, a KLK6 é abundantemente expressa e cliva proteínas de mielina, resultando na desmielinização (DONG et al., 2014; STEFANINI et al., 2015). Por outro lado, o aumento da expressão de KLK8 também foi implicado na esquizofrenia, transtorno bipolar e depressão (MELLA et al., 2020).

As KLKs também tem sido implicada em casos de câncer como, por exemplo, em câncer de próstata, câncer de mama, e câncer de ovário (KRYZA et al., 2016; STEFANINI et al., 2015). Devido a expressão desregulada das KLKs em vários tipos de câncer, essas enzimas são consideradas potenciais biomarcadores tumorais (FIGUEROA et al., 2018; HONG, 2014; STEFANINI et al., 2015; WANG et al., 2018). Dentro desse contexto, a mais conhecida é a KLK3, ou antígeno específico da

próstata (PSA do inglês *prostate-specific antigen*), que é utilizada como marcador para o diagnóstico e monitoramento do câncer de próstata (PRASSAS et al., 2015; SOTIROPOULOU; PAMPALAKIS, 2012). A KLK3/PSA é produzida por células epiteliais da próstata e é responsável por degradar as proteínas que formam o coágulo seminal (seminogelinas I e II), resultando na liquefação do sêmen; e níveis elevados de PSA no sangue são observados em pacientes com câncer de próstata (HONG, 2014; PRASSAS et al., 2015).

O potencial das KLKs como alvos terapêuticos em uma variedade de doenças tem despertado considerável interesse na identificação de inibidores de KLKs (DE SOUZA et al., 2019; MURAFUJI et al., 2019; SANTOS et al., 2016; TAN et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2011; WALKER et al., 2019). Entretanto, devido à similaridade estrutural das KLKs, um dos principais desafios é a dificuldade em projetar inibidores com alta especificidade. Assim, a maioria dos inibidores de KLKs exibem baixa ou média seletividade contra o seu alvo específico (PRASSAS et al., 2015).

2.2. Ciclooxygenases

As COXs humanas ou prostaglandina-endoperóxido sintases (EC 1.14.99.1) são enzimas envolvidas na biossíntese de mediadores lipídicos chamados de prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) que estão envolvidos em diversos processos fisiológicos e patológicos (ALEXANIAN; SOROKIN, 2017; BHARDWAJ et al., 2017; LI et al., 2020; REGULSKI et al., 2016; ZARGHI; ARFAEI, 2011).

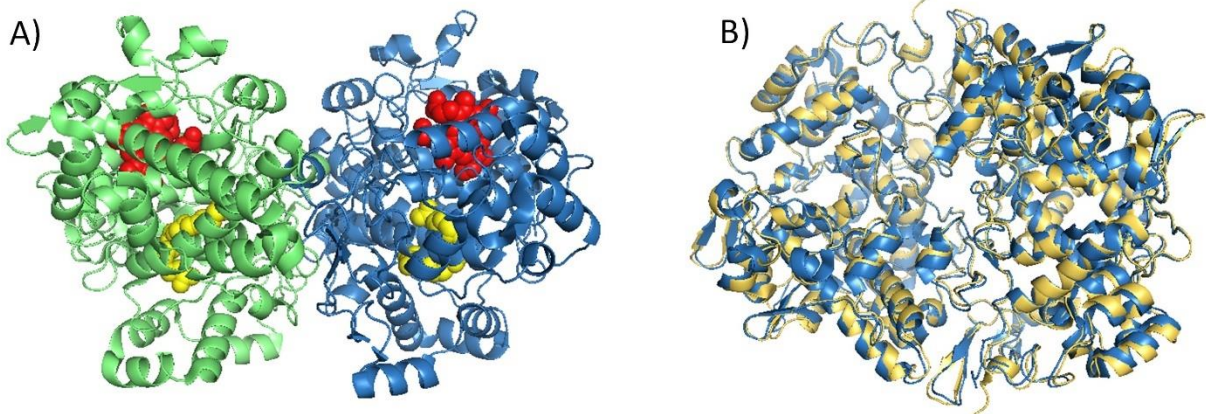
Sabe-se que existem três isoformas da enzima ciclooxygenase, chamadas de COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1, a primeira isoforma a ser descoberta, é classificada como uma enzima constitutiva que é expressa na maioria dos tecidos do organismo, principalmente no trato gastrointestinal, rins e plaquetas, sendo responsável pela produção de prostaglandinas que controlam os processos fisiológicos normais, como, por exemplo, a manutenção da homeostase vascular, função renal e integridade da mucosa gástrica (BANSAL et al., 2014; BHARDWAJ et al., 2017; HASSAN et al., 2014; REGULSKI et al., 2016; TEWARI et al., 2014). Em contraste, a COX-2 é expressa em níveis muito baixos em tecidos e órgãos saudáveis, mas sua expressão é rapidamente elevada em resposta a diversos estímulos pró-inflamatórios, participando na biossíntese de prostaglandinas que

medeiam processos patofisiológicos, tais como dor, inflamação, febre e carcinogênese (BHARDWAJ et al., 2017; HASHEMI GORADEL et al., 2019; LI et al., 2020; LIU; XU; TAN, 2015; MITCHELL et al., 2021; REGULSKI et al., 2016). Recentemente descoberta, a isoforma COX-3 (possivelmente uma variante da COX-1) é expressa principalmente no córtex cerebral e no coração, porém sua função ainda não é totalmente compreendida (BHARDWAJ et al., 2017; MITCHELL et al., 2021; REGULSKI et al., 2016).

Estruturalmente, as isoformas COX-1 e COX-2 humanas são homodímeros de 599 e 604 aminoácidos, respectivamente, com peso molecular de aproximadamente 70 kDa por monômero. Apresentam cerca de 60% de identidade na sua sequência de aminoácidos e possuem estruturas tridimensionais semelhantes (Figura 3) (ALEXANIAN; SOROKIN, 2017; BHARDWAJ et al., 2017; BLOBAUM; MARNETT, 2007; REGULSKI et al., 2016; ROUZER; MARNETT, 2009; ZARGHI; ARFAEI, 2011). Cada monômero possui três domínios: um domínio de ligação à membrana composto por uma série de quatro α -hélices anfipáticas que ancoram a proteína à superfície da membrana; um domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico (EFG); e o domínio catalítico, que compreende a maior parte da proteína (representando cerca de 80% da proteína), que contém dois sítios catalíticos: o sítio ciclooxigenase (um canal hidrofóbico no interior da proteína) e o sítio peroxidase que contém um cofator heme (ALEXANIAN; SOROKIN, 2017; BLOBAUM; MARNETT, 2007; REGULSKI et al., 2016; ROUZER; MARNETT, 2009; SMITH; MALKOWSKI, 2019).

Figura 3. Estrutura tridimensional das enzimas COXs.

(A) Representação em *cartoon* do homodímero da COX-2 com o ácido araquidônico (esferas em amarelo) ligado ao sítio ativo ciclooxigenase e o grupo heme (esferas vermelhas) na base do sítio ativo peroxidase. (B) Sobreposição de COX-1 (azul; PDB: 1CQE) e COX-2 (amarelo; PDB: 3HS5).

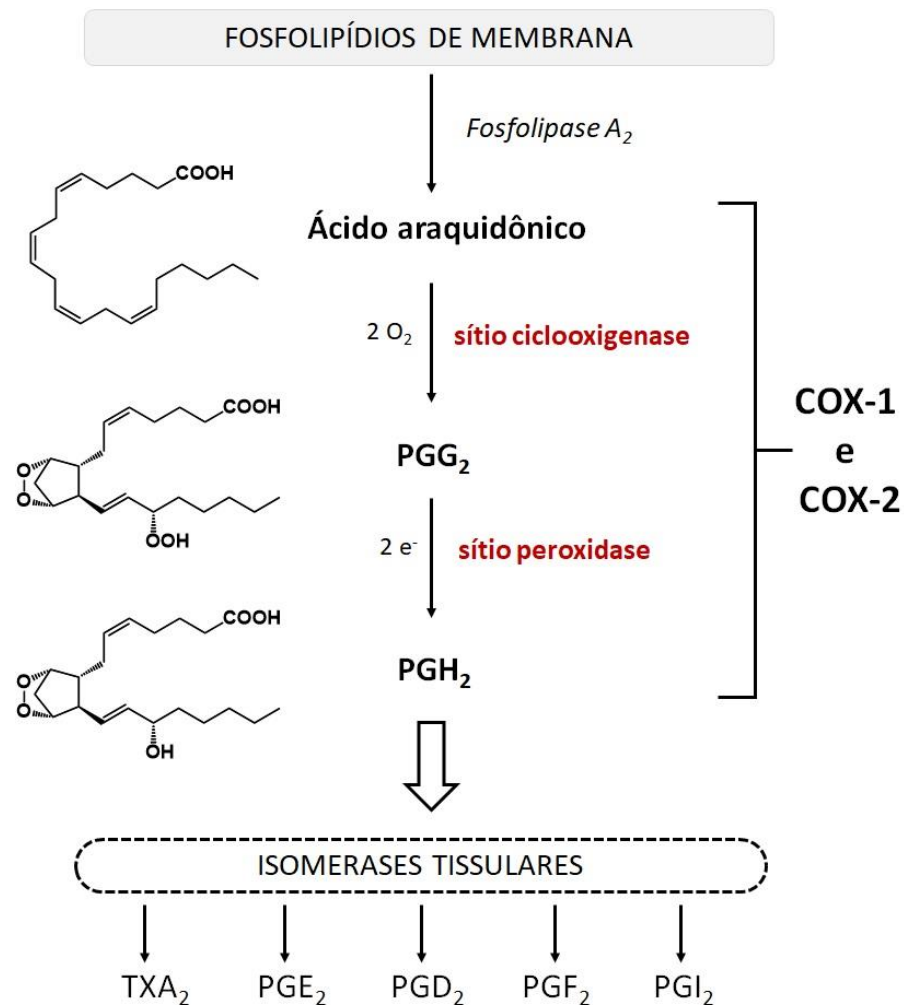


Fonte: o autor.

Apesar destas semelhanças, as isoformas COX-1 e COX-2 apresentam algumas diferenças estruturais importantes, principalmente no que diz respeito ao sítio ativo. Nesse contexto, existem três aminoácidos no sítio ativo da COX-2 que o distingue da COX-1: Valina na posição 523 e 343 (Val523 e Val 343) e Arginina na posição 513 (Arg513). No sítio ativo da COX-1, estes aminoácidos são substituídos por Isoleucina (Ile523 e Ile434) e Histidina (His513) (BHARDWAJ et al., 2017; BLOBAUM; MARNETT, 2007; KUMMER; COELHO, 2002; REGULSKI et al., 2016; ZARGHI; ARFAEI, 2011). Estas diferenças contribuem para a ampliação em cerca de 20% do sítio catalítico de COX-2, bem como o aumento da sua hidrofiliidade, permitindo à COX-2 reconhecer uma variedade maior de substratos em comparação com a COX-1 (KUMMER; COELHO, 2002; SMITH; MALKOWSKI, 2019; VECCHIO et al., 2012).

As enzimas COXs atuam na síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo poli-insaturado de vinte carbonos liberado a partir de fosfolípidios de membrana pela ação da enzima fosfolipase A₂ (Figura 4). Ambas isoformas são enzimas bifuncionais e apresentam dois sítios catalíticos independentes (ciclooxigenase e peroxidase) que estão localizados em lados opostos do domínio catalítico. Apesar de distintos, estes dois sítios são estruturalmente e funcionalmente interconectados (ALEXANIAN; SOROKIN, 2017; BLOBAUM; MARNETT, 2007; LUCIDO et al., 2016; WANG; BAI; ZHU, 2010; YANG et al., 2020; ZARGHI; ARFAEI, 2011). No sítio ciclooxigenase ocorre a conversão do substrato AA em prostaglandina G₂ (PGG₂), que é então reduzida, no sítio peroxidase, ao intermediário prostaglandina H₂ (PGH₂). PGH₂ é, então, convertida enzimaticamente por isomerases específicas em outras prostaglandinas (PGD₂, PGE₂ e PGF₂), prostacilinas (PGI₂) ou tromboxanos (TXA₂) (BLOBAUM; MARNETT, 2007; LIU; XU; TAN, 2015; REGULSKI et al., 2016; SMITH; MALKOWSKI, 2019).

Figura 4. Esquema da biossíntese de prostaglandinas catalisada pelas enzimas COXs.



Fonte: Adaptado de SMITH; MALKOWSKI, 2019.

As prostaglandinas estão envolvidas em diversos processos fisiopatológicos e desempenham papel fundamental na geração da resposta inflamatória (JIANG et al., 2021; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2012). A PGE₂ é um dos principais mediadores lipídicos produzidos a partir do AA pela ação das enzimas COXs (WOOLBRIGHT; PILBEAM; TAYLOR, 2020). Na inflamação, a PGE₂ está envolvida nos processos que levam aos sinais clássicos de inflamação: vermelhidão, inchaço e dor (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2012). Além disso, a PGE₂ também participa dos mecanismos de proliferação celular, apoptose e metástase, contribuindo para a progressão de vários tipos de câncer como, por exemplo, o câncer de cólon, câncer de mama e câncer de pulmão (HASHEMI GORADEL et al., 2019; REGULSKI et al., 2016). Neste contexto, a isoforma induzível COX-2 é a principal responsável pela

produção de prostaglandinas inflamatórias, tornando-se um importante alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) constituem uma classe de fármacos com propriedades analgésica, anti-inflamatória e antipirética, que são utilizados no tratamento em diversas doenças inflamatórias como artrite e reumatismo, bem como outras doenças associadas à dor e inflamação. Entretanto, o uso prolongado desses fármacos está associado a efeitos colaterais indesejados, como úlcera gastrointestinal, disfunção renal e hepatotoxicidade (BANERJEE et al., 2016; BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020; FERRER et al., 2018; TEWARI et al., 2014).

Os AINEs são compostos quimicamente distintos que exercem seus efeitos farmacológicos pela inibição das enzimas COXs, levando a uma diminuição na produção de prostaglandinas (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020; HERMANSON et al., 2014; REGULSKI et al., 2016; SMITH; MALKOWSKI, 2019). Alguns AINEs como por exemplo, aspirina, ibuprofeno e indometacina (chamados de AINEs convencionais) são inibidores não seletivos e, portanto, inibem ambas isoformas COX-1 e COX-2. Apesar da sua eficácia terapêutica, o uso destes fármacos torna-se limitado devido aos seus efeitos colaterais comuns, principalmente pelo surgimento de úlcera gastrointestinal. (BHARDWAJ et al., 2017; FERRER et al., 2018; TEWARI et al., 2014). A toxicidade gastrointestinal associada ao uso dos AINEs convencionais é atribuída à inibição da isoforma constitutiva COX-1, uma vez que essa isoforma está envolvida na produção de prostaglandinas gastroprotetoras (FERRER et al., 2018; REGULSKI et al., 2016).

Com base no pressuposto de que a inibição seletiva da COX-2 poderia reduzir os efeitos colaterais dos AINEs convencionais, foi desenvolvida uma nova geração de AINEs chamados de coxibes (celecoxibe, rofecoxibe, parecoxibe, valdecoxibe) (FERRER et al., 2018; GARRET A. FITZGERALD; CARLO PATRONO, 2001; GIERSE et al., 2005; REGULSKI et al., 2016). A chave para o desenvolvimento dos novos AINEs foi a descoberta das diferenças estruturais entre as duas isoformas das COXs: ampliação do sítio ativo da COX-2 em relação ao da COX-1 e o aumento da sua hidrofobicidade (FERRER et al., 2018; MONTE et al., 2015; TEWARI et al., 2014). Deste modo, a concepção de novos fármacos concentrou-se em moléculas maiores e com impedimento estérico, evitando que o inibidor formasse interações indesejadas com a COX-1 (REGULSKI et al., 2016). No

entanto, apesar de seletivos à isoforma COX-2, o uso prolongado destes fármacos foi associado ao aumento do risco de eventos cardiovasculares, incluindo ataque cardíaco ou acidente vascular cerebral, o que levou à remoção de alguns desses fármacos do mercado (BANERJEE et al., 2016; BANSAL et al., 2014; FERRER et al., 2018; MITCHELL et al., 2021; RAYAR et al., 2018). Assim, atualmente, há um grande interesse na descoberta de novos compostos que atuem de forma seletiva e segura na inibição da COX-2 e que possam contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos (ABDELALL; KAMEL, 2016; BAI et al., 2021; BANERJEE et al., 2016; BANSAL et al., 2014; BHARDWAJ et al., 2017; CONSALVI et al., 2016; RAYAR et al., 2018; SAVJANI et al., 2017).

2.3. Ensaios enzimáticos para triagem de inibidores de KLK e COX

Os ensaios enzimáticos são métodos fundamentais para a identificação de novos inibidores enzimáticos. Em relação as enzimas KLKs, a triagem de inibidores é comumente realizada por meio de ensaios fluorimétricos empregando substratos peptídicos sintéticos (ARAMA et al., 2015; DE SOUZA et al., 2019; SANTOS et al., 2016; TAN et al., 2015). Já os ensaios de inibição de COXs podem ser realizados através de diferentes métodos. Os mais utilizados são ensaios colorimétricos ou fluorimétricos baseados na oxidação de co-substratos durante a redução de PGG₂ a PGH₂ no sítio peroxidase (BANERJEE et al., 2016; BANSAL et al., 2014; BHARDWAJ et al., 2017; PETROVIC; MURRAY, 2010; SAVJANI et al., 2017). A quantificação de prostaglandinas por meio de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA do inglês *enzyme linked immunosorbent assay*) também é bastante empregada para triagem de novos inibidores de COXs (ALANAZI et al., 2015; CONSALVI et al., 2016; CUENDET et al., 2006; RAYAR et al., 2018).

Apesar de disponíveis, estes ensaios apresentam certas desvantagens, principalmente no que diz respeito a baixa estabilidade e alto custo das enzimas alvo, como é o caso das enzimas KLK e COX humanas, limitando a sua aplicação em ensaios de triagem. Além disso, a determinação de atividade COX estimando-se a produção de prostaglandinas por ELISA, por exemplo, requer longas etapas de incubação, tornando a técnica dispendiosa e morosa. Já o ensaio de oxidação de co-substrato peroxidase não mede diretamente a atividade da COX e pode ser

ineficiente quando o inibidor a ser testado é um antioxidante, resultando em falso-positivos (CAO et al., 2011).

Nesse contexto, novas abordagens têm sido desenvolvidas para a triagem de inibidores de COX, como por exemplo, a determinação da atividade COX por quantificação de PGE₂ por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS do inglês *liquid chromatography-mass spectrometry*), o que proporciona ensaios mais rápidos e sensíveis (CAO et al., 2011; ZHU et al., 2014). Em outros trabalhos foram reportados novas metodologias para triagem de ligantes de COX-2 em amostras complexas de extratos de plantas, empregando ensaios de bioafinidade por ultrafiltração (CHEN et al., 2018; HUAI et al., 2019; JIAO et al., 2019; ZHANG et al., 2021). Neste processo, a enzima alvo é misturada com o extrato de interesse, e os compostos que não apresentam qualquer interação com a biomolécula são removidos do meio por ultrafiltração, enquanto os ligantes capturados pela enzima são avaliados via LC-MS/MS. No entanto, estes ensaios também se referem à utilização de enzimas em solução, necessitando de novas alíquotas de enzimas a cada análise.

Assim, para superar as limitações dos ensaios existentes, novas abordagens têm sido desenvolvidas, como por exemplo, o uso de enzimas imobilizadas. Nesse contexto, os ensaios baseados em enzimas imobilizadas têm se destacado como uma alternativa promissora aos ensaios de triagem convencionais (DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019; DE SIMONE et al., 2019; FU et al., 2019; TRINDADE XIMENES et al., 2021; ZHUO et al., 2016).

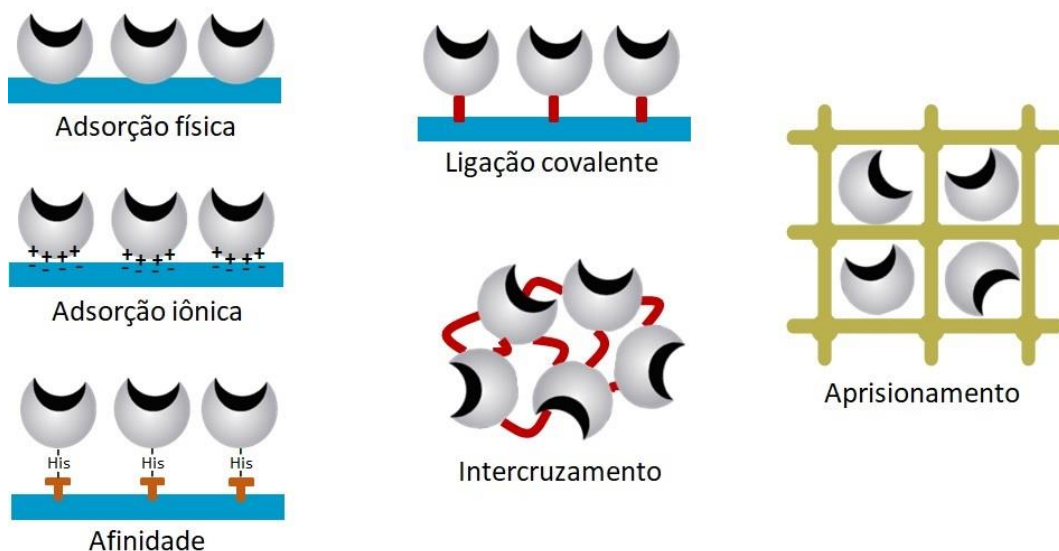
2.4. Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas refere-se ao processo pelo qual as enzimas são fixadas a um suporte sólido, criando um sistema heterogêneo de enzimas imobilizadas chamados de biorreatores ou IMERs (do inglês *immobilized enzyme reactors*) (HOMAEI et al., 2013). Em comparação às enzimas livres em solução, a utilização das enzimas imobilizadas apresenta diversas vantagens, como por exemplo, o aumento da estabilidade da enzima em relação à temperatura, presença de solventes orgânicos e variação de pH sem perda considerável da atividade catalítica (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009; HOMAEI et al., 2013; MOHAMAD et al., 2015). Além disso, os sistemas heterogêneos de enzimas imobilizadas permitem

a fácil recuperação e reutilização das enzimas em vários ciclos de reação, representando uma economia significativa em processos que requerem enzimas caras (DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019; HOMAEI et al., 2013; MOHAMAD et al., 2015). Deste modo, a técnica de imobilização enzimática têm sido amplamente empregada nas mais diversas áreas de pesquisa, como por exemplo, na produção de biocombustíveis, na área de alimentos, na degradação de corantes, bem como na área médica para diagnósticos de doenças e pesquisa por novos fármacos, entre outras (BASSO; SERBAN, 2019; HOMAEI et al., 2013).

A seleção do método de imobilização adequado é uma parte muito importante do processo de imobilização da enzima alvo. As enzimas podem ser imobilizadas por diferentes métodos, tais como a imobilização por ligação ao suporte (ligações covalentes e não-covalentes), confinamento em matriz porosa, e inter cruzamento (Figura 5). Os diferentes métodos de imobilização baseiam-se nos diferentes tipos de ligações e/ou interações que podem ser feitas entre a biomolécula e o suporte (FURLANI et al., 2020; GUI SAN, 2006; SHELDON; PELT, 2013).

Figura 5 - Esquema representativo dos métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: o autor.

A imobilização por ligação covalente é amplamente utilizada para a produção de IMERs (DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019; DE SIMONE et al., 2019; TRINDADE XIMENES et al., 2021). É considerada como um método de imobilização irreversível, no qual a enzima é fixada a um suporte sólido através da reação

química entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte com os grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos da enzima, tais como lisina (grupo amino), cisteína (grupo tiol), ácido aspártico e ácido glutâmico (grupo carboxílico) (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009; FURLANI et al., 2020; MOHAMAD et al., 2015). Este método apresenta como principal vantagem a elevada estabilidade dos biorreatores preparados devido à forte ligação entre enzima e suporte, evitando assim, a perda da enzima durante a sua utilização.

Os métodos não-covalentes tais como, adsorção física e iônica, baseiam-se nas interações fracas (forças de van der Waals e interações eletrostáticas) entre a biomolécula e o suporte, sendo, portanto, considerados como métodos reversíveis (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). Proteínas recombinantes contendo cauda de poli-histidina (*his-tag*) também podem ser imobilizadas empregando reagentes de afinidade, como por exemplo, o níquel-ácido nitrilotriacético (Ni^{2+} -NTA), através de ligações de coordenação entre o íon metálico e os aminoácidos de histidina da porção *his-tag* (DWEVEDI, 2016; HOMAEI et al., 2013). A principal vantagem é a pequena perturbação na conformação da enzima, resultando em uma alta retenção da atividade enzimática após a imobilização. No entanto, apresenta como desvantagem um menor tempo de vida útil dos biorreatores, uma vez que a enzima pode ser desorvida do suporte durante a sua utilização (HOMAEI et al., 2013; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; MOHAMAD et al., 2015).

As enzimas também podem ser imobilizadas pelo método de aprisionamento. Esta técnica é baseada no aprisionamento da biomolécula em uma matriz polimérica (poliacrilamida ou sílica sol-gel) de forma que a enzima tenha sua mobilidade dominada pela matriz (imobilização por inclusão) (HOMAEI et al., 2013; MOHAMAD et al., 2015; SHELDON; PELT, 2013). A rede polimérica deve apresentar porosidade controlada a fim de evitar a perda de enzima e, ao mesmo tempo, permitir o livre movimento do substrato e produtos (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).

Em contraste, a imobilização por intercruzamento ou ligação cruzada é livre de suporte. Neste caso, a imobilização é realizada pela formação de ligações cruzadas entre as moléculas de enzima através do uso de reagentes bifuncionais, como o glutaraldeído, formando uma estrutura tridimensional complexa insolúvel ao meio reacional (DWEVEDI, 2016; MOHAMAD et al., 2015; SHELDON; PELT, 2013). Apesar de efetivo, este método de imobilização apresenta como principal desvantagem a perda da atividade enzimática devido às alterações conformacionais

provocadas pelo processo de imobilização e baixa reprodutibilidade (FURLANI et al., 2020).

Outro fator muito importante no processo de imobilização da enzima alvo é a escolha do suporte. Nesse âmbito, alguns fatores essenciais devem ser levados em consideração, tais como a porosidade, disponibilidade de grupos reativos e baixo custo de produção do suporte. Além disso, uma vez que a enzima é devidamente imobilizada, o material do suporte deve apresentar poucas interações inespecíficas com os componentes da amostra (ACIKARA, et al., 2013; CARDOSO; MORAES; CASS, 2009; DWEVEDI, 2016).

Uma variedade de suportes encontra-se disponível comercialmente, entre estes podemos destacar os polissacarídeos (celulose, a dextrana e a agarose), polímeros sintéticos (poliestireno e poliácridatos) e materiais inorgânicos (sílica e partículas magnéticas) (ACIKARA et al., 2013; DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013; DWEVEDI, 2016; SHELDON; PELT, 2013; TRINDADE XIMENES et al., 2021). Os suportes podem ainda ser modificados previamente a imobilização através do uso de agentes modificadores, tornando possível a utilização de uma variedade de suportes com diferentes grupos funcionais (grupos amino, aldeídos ou epóxidos; trocadores iônicos; agentes quelantes; etc.) visando à melhoria da interação da enzima-suporte e aumentando a atividade e estabilidade dos biorreatores preparados (DE MELO et al., 2017; VILELA; CARDOSO; MATEO, 2019). Nesse contexto, suportes de sílica ativados com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) e glutaraldeído são amplamente empregados nos processos de imobilização covalente de enzimas, devido à simplicidade e eficiência de imobilização.

A diversidade de métodos e suportes é refletida nos diferentes tipos de reação e configuração final dos biorreatores, o que gera a necessidade do desenvolvimento de procedimentos específicos de imobilização para cada proteína. Assim, a escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá, principalmente, da aplicação final da enzima imobilizada, e as vantagens e desvantagens entre os métodos devem ser consideradas em cada caso específico.

2.5. Enzimas imobilizadas e ensaios de triagem de inibidores

Nos últimos anos, os reatores de enzimas imobilizadas têm sido considerados como uma ferramenta promissora na busca e identificação de novas moléculas bioativas. Os diferentes métodos de imobilização e a grande variedade de suportes disponíveis ampliam as possibilidades de utilização das enzimas imobilizadas em diferentes formatos e configurações. Assim, os biorreatores enzimáticos podem ser utilizados em ensaios de triagem de ligantes nos modos *on-line* e *off-line* (DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019; DE SIMONE et al., 2019; GUO et al., 2019; TRINDADE XIMENES et al., 2021; WOUTERS et al., 2021).

A abordagem de ensaios *off-line* abrange os ensaios enzimáticos nos quais a enzima alvo é covalentemente imobilizada, por exemplo, em suportes como agarose, partículas magnéticas ou sílica mesoporosa. Neste caso, as enzimas imobilizadas podem ser utilizadas em substituição as enzimas livres em condições muito semelhantes aos ensaios convencionais. Após a etapa de incubação, a enzima pode ser facilmente separada do meio reacional (por centrifugação, filtração ou separação magnética) e o sobrenadante ou eluente pode ser analisado pelos vários tipos de detecção UV-Vis, fluorescência e MS (LIU; CHEN; SHI, 2017; SHI et al., 2015; TANG et al., 2019; VILELA; CARDOSO; MATEO, 2019). Após etapas de lavagens adequadas, a enzima recuperada pode, então, ser novamente utilizada em novos ensaios de triagem. Essa alternativa torna-se interessante pois as condições do ensaio podem ser mantidas e apresenta como principal vantagem a possibilidade de recuperação e reutilização da enzima em múltiplos ensaios de triagem.

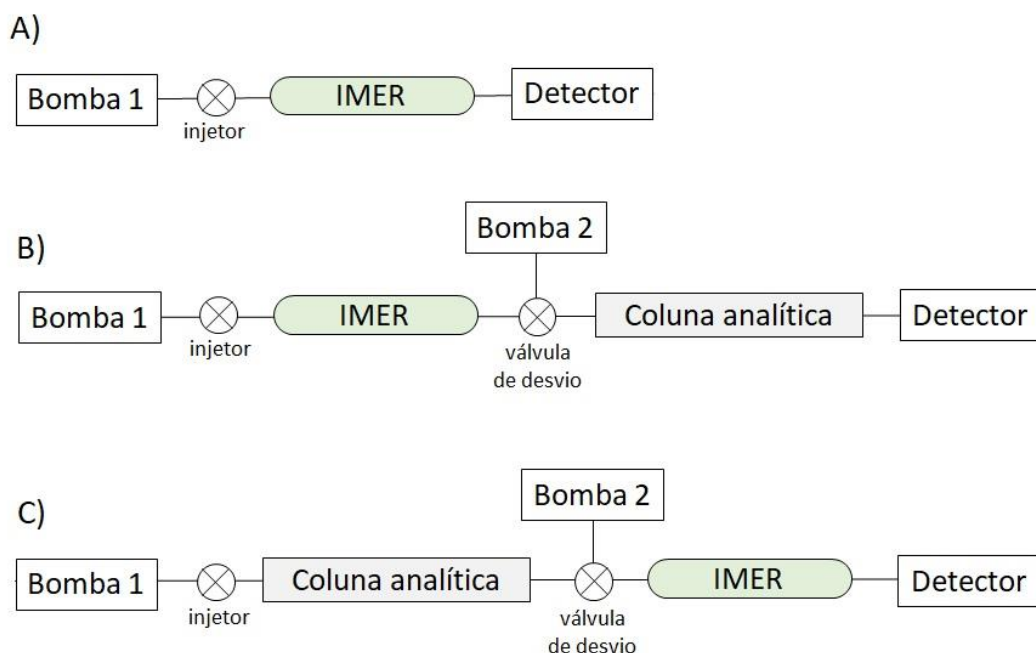
Além disso, a abordagem de ensaio *off-line* é amplamente aplicada nos ensaios baseados em bioafinidade para a triagem de ligantes em amostras complexas de produtos naturais (FU et al., 2019; GUO et al., 2019; TRINDADE XIMENES et al., 2021; ZHUO et al., 2016). Nesse contexto, as partículas magnéticas têm sido amplamente utilizadas para a imobilização enzimática, uma vez que possuem elevada área superficial, facilidade de modificação da superfície, além da rápida e simples separação do meio reacional (DO AMARAL et al., 2021; LIMA et al., 2020; TRINDADE XIMENES et al., 2021; WUBSHET et al., 2015; ZHANG et al., 2019). Em outros trabalhos, o suporte comercial de Sepharose (CNBr-Sepharose e NHS-Sepharose) foi utilizado para imobilização enzimática e aplicação em estudos de bioafinidade (DENG; XIA; XIAO, 2014; VILLADÓNIGA; CANTERA, 2019). Estes

ensaios representam uma alternativa interessante aos ensaios de bioafinidade que utilizam enzimas em solução.

Os biorreatores enzimáticos também podem ser preparados em formatos de colunas e utilizados em sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) para ensaios de triagem em fluxo contínuo, denominados de ensaios *on-line*. Sistemas desse tipo requerem apenas uma pequena quantidade de amostra por injeção, apresentam alta reprodutibilidade e sensibilidade de detecção, permitindo análises automatizadas e ensaios em fluxo para a triagem rápida de novos ligantes para a enzima alvo (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009; DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019; DE SIMONE et al., 2019; FANG et al., 2012).

Nos ensaios *on-line*, os biorreatores enzimáticos podem ser utilizados acoplados a sistemas cromatográficos em diferentes configurações como pré-coluna, pós-coluna ou até mesmo como a coluna do sistema cromatográfico (DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019; DE SIMONE et al., 2019; WOUTERS et al., 2021) (Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática das diferentes configurações de uso dos IMERs em sistemas em fluxo contínuo.



Fonte: Adaptado de CARDOSO; MORAES, 2009.

Os IMERs podem ser usados em sistemas de HPLC acoplados aos diferentes sistemas de detecção, como UV-vis, fluorescência e MS (Figura 6A). Nesta configuração, os experimentos de triagem são realizados em fluxo através da injeção de alíquotas da mistura reacional (contendo o substrato e o candidato a inibidor), e a porcentagem de inibição é calculada com base nos valores da área do pico do produto obtido na presença e na ausência do inibidor testado (DA SILVA et al., 2013; VANZOLINI et al., 2013; VILELA; CARDOSO, 2017). Os IMERs também podem ainda ser acoplados a colunas analíticas e utilizados em ensaios *on-line* bidimensionais através do uso de válvulas de desvio (Figura 6B e 6C). Quando utilizado como pré-coluna, os compostos provenientes da catálise enzimática do IMER são transferidos diretamente para a coluna analítica, onde o excesso de substrato e o produto formado são separados na coluna analítica (CALIL et al., 2016; CORNELIO et al., 2018; LIMA et al., 2019). Em análises em que o IMER é utilizado como pós-coluna os analitos da amostra são inicialmente separados na coluna analítica e, em seguida, os compostos de interesse são transferidos para o biorreator, onde a atividade inibitória é avaliada (YUAN et al., 2020). Essa estratégia de ensaio se torna interessante para a avaliação biológica de amostras complexas como extrato de plantas, por exemplo. Desta forma a triagem de inibidores pode ser feita de forma rápida e com uma quantidade pequena de amostra.

A imobilização por ligação covalente é o método de imobilização mais utilizado na produção de IMERs para aplicação em ensaios *on-line*, uma vez que previne o fenômeno de dessorção da enzima durante o uso em fluxo no sistema cromatográfico e proporciona um maior tempo de vida útil dos biorreatores preparados (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009; DE SIMONE et al., 2019). Em relação aos suportes, o material do suporte sólido deve ser mecanicamente e quimicamente estável, e possuir uma baixa-pressão de volta no sistema de HPLC. Os suportes mais utilizados incluem os capilares tubulares abertos de sílica fundida e os suportes de materiais monolíticos (de sílica ou polímeros orgânicos) como os discos monolíticos de material polimérico macroporoso (nome comercial: CIM® *disk monolithic column*) (DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019; DE SIMONE et al., 2019).

Para o desenvolvimento de uma metodologia de ensaio *on-line* com enzima imobilizada, alguns fatores importantes devem ser levados em consideração, como, por exemplo, a composição da fase móvel (porcentagem de solvente orgânico,

solução tampão e aditivos), a vazão utilizada e o tempo de reação. As condições utilizadas devem ser favoráveis às enzimas, mas também devem ser compatíveis ao tipo de detecção. No que diz respeito aos ensaios acoplados a MS, por exemplo, torna-se necessária a utilização de tampões voláteis, resultando em condições não fisiológicas (BURKHARDT et al., 2015). Devido à modificação das condições dos ensaios convencionais, todos esses parâmetros devem ser criteriosamente avaliados durante o desenvolvimento do ensaio.

A utilização de enzimas imobilizadas tem se mostrado, portanto, como uma ferramenta eficiente para triagem de novos inibidores enzimáticos. Em relação as enzimas COX, Shi e colaboradores reportaram a imobilização a enzima COX-2 em suporte de sílica pelo método de ligação covalente via amino-glutaraldeído, porém, a enzima imobilizada não foi aplicada em ensaios de triagem de inibidores (SHI et al., 2015). Em outros trabalhos, a enzima COX-2 foi imobilizada em partículas magnéticas funcionalizadas utilizando diferentes métodos de imobilização, incluindo a imobilização covalente via amino-glutaraldeído (DENG et al., 2014; HOU et al., 2019), imobilização por afinidade com íons Ni^{2+} e imobilização covalente via polidopamina (HOU et al., 2019). Nestes trabalhos a imobilização foi efetiva e a enzima imobilizada foi utilizada com sucesso em ensaios de bioafinidade do tipo *ligand-fishing* (pesca de ligantes) para a triagem de ligantes de COX-2 em amostras complexas de extratos de plantas. No entanto, vale destacar que os ensaios de atividade inibitória dos compostos ativos foram realizados empregando a enzima livre em solução por meio de ensaios colorimétricos ou fluorimétricos convencionais. Já em relação as enzimas KLKs, um método inédito com a sua imobilização e aplicação na triagem de inibidores foi publicado recentemente (CARVALHO et al., 2021). Este trabalho faz parte desta tese de doutorado.

3. Objetivos

Os objetivos principais deste trabalho foram:

- I. Estudo de condições de imobilização das enzimas COX-2 humana e KLK pancreática de porco em capilar de sílica fundida e em matriz de Sepharose, respectivamente.
- II. Desenvolvimento de ensaios *off-line* e *on-line* baseados em enzimas imobilizadas para o monitoramento da atividade enzimática de COX-2 e KLK.
- III. Avaliação do potencial de aplicação de KLK imobilizada na triagem de inibidores em coleções de amostras sintéticas e de origem natural (meios microbiológicos e extratos de plantas).

4. Conclusão – PARTE I

- A enzima KLK pancreática de porco foi imobilizada com sucesso em suporte de Sepharose-NHS. O método de imobilização mostrou-se bastante simples e rápido, envolvendo um pequeno número de etapas, e a enzima imobilizada exibiu alta atividade recuperada.
- A enzima KLK imobilizada foi empregada em diferentes metodologias de ensaio *off-line*: ensaio em formato multi-poços com detecção por fluorescência e ensaio baseado em microcolunas de KLK imobilizada com detecção por espectrometria de massas. Em ambos os ensaios, a enzima imobilizada foi capaz de identificar o inibidor de referência, leupeptina, e mostrou-se eficaz na determinação da potência inibitória (IC_{50}). Além disso, os estudos de triagem realizados com amostras de produtos naturais (extratos de plantas e meios microbiológicos) demonstraram a aplicabilidade do ensaio proposto.
- A KLK imobilizada também apresentou excelente capacidade de reutilização e estabilidade de armazenamento, o que é uma propriedade valiosa para sua aplicação em ensaios de triagem de inibidores.
- Em conjunto, a KLK imobilizada em suporte de Sepharose é uma ferramenta versátil tornando possível a sua aplicação em ensaios com diferentes formatos e sistemas de detecção. Os estudos apresentados neste trabalho contribuem para o desenvolvimento de outras metodologias de ensaio, como, por exemplo, o desenvolvimento de ensaios *on-line* acoplados a sistemas LC-MS, bem como metodologias para outras KLKs humanas de interesse.

5. Conclusão – PARTE II

- O sistema de ensaio descrito neste trabalho possibilitou o monitoramento da atividade dos ICERs-huCOXII através de uma metodologia de ensaio *on-line* com detecção por MS.
- A enzima COX-2 humana foi imobilizada de maneira ativa, tanto em suportes capilares de sílica fundida quanto em partículas magnéticas.
- Os ICERs-COXII apresentaram baixa estabilidade, afetando a reprodutibilidade das análises e limitando a sua aplicação no ensaio *on-line* inicialmente proposto.
- O processo de auto-inativação irreversível das enzimas COXs durante a catálise *in vitro* é um fator crucial e que deve ser levado em consideração para o desenvolvimento de metodologias com a enzima imobilizada em ensaios baseados em atividade.
- Apesar disso, os estudos realizados neste trabalho contribuíram para um melhor entendimento das condições de imobilização da enzima alvo e novas abordagens podem ser realizadas em trabalhos futuros a fim de melhorar a estabilidade dos biorreatores de COX-2.

6. Referências

ABDELALL, E. K. A.; KAMEL, G. M. Synthesis of new thiazolo-celecoxib analogues as dual cyclooxygenase-2/15-lipoxygenase inhibitors: Determination of regio-specific different pyrazole cyclization by 2D NMR. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 118, p. 250–258, 2016.

ACIKARA, Ö. B. et al. Affinity Chromatography and Importance in Drug Discovery. In: **Column Chromatography**, IntechOpen, 2013.

ALANAZI, A. M. et al. Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors : Anti-inflammatory and analgesic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 115–123, 2015.

ALDEWACHI, H. et al. High-throughput screening platforms in the discovery of novel drugs for neurodegenerative diseases. **Bioengineering**, v. 8, n. 2, p. 1–20, 2021.

ALEXANIAN, A.; SOROKIN, A. Cyclooxygenase 2: Protein-protein interactions and posttranslational modifications. **Physiological Genomics**, v. 49, n. 11, p. 667–681, 2017.

ARAMA, D. P. et al. Pyrido-imidazodiazepinones as a new class of reversible inhibitors of human kallikrein 7. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 93, p. 202–213, 2015.

BAI, H. W. et al. Inhibition of cyclooxygenase by blocking the reducing cosubstrate at the peroxidase site: Discovery of galangin as a novel cyclooxygenase inhibitor. **European Journal of Pharmacology**, v. 899, p. 174036, 2021.

BANERJEE, A. G. et al. Design, synthesis, evaluation and molecular modelling studies of some novel 5,6-diphenyl-1,2,4-triazin-3(2H)-ones bearing five-member heterocyclic moieties as potential COX-2 inhibitors: A hybrid pharmacophore approach. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 102–120, 2016.

BANSAL, S. et al. Design and synthesis of novel 2-phenyl-5-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,4-oxadiazoles as selective COX-2 inhibitors with potent anti-inflammatory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 167–174, 2014.

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, 2019.

BHARDWAJ, A. et al. In situ click chemistry generation of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2017.

- BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, p. 114147, 2020.
- BLOBAUM, A. L.; MARNETT, L. J. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 1425–1441, 2007.
- BURKHARDT, T. et al. Enzymatic Assays Coupled with Mass Spectrometry with or without Embedded Liquid Chromatography. **ChemBioChem**, v. 16, n. 14, p. 1985–1992, 2015.
- CALIL, F. A. et al. Immobilization of NTPDase-1 from trypanosoma cruzi and development of an online label-free assay. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, 2016.
- CAO, H. et al. Measurement of cyclooxygenase inhibition using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 1, p. 230–235, 2011.
- CARDOSO, C. L. et al. 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**, v. 1120, n. 1–2, p. 151–157, 7 jul. 2006.
- CARDOSO, C. L. et al. The development of an immobilized enzyme reactor containing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi: The effect of species' specific differences on the immobilization. **Analyst**, v. 133, n. 1, p. 93–99, 2008.
- CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. Immobilized enzymes in the identification of new ligands. In: **Analytical Chemistry for Pharmaceutical and Medical Sciences**, 1 ed. Kerala, India: Transworld Research Network, 2009.
- CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. DE; CASS, Q. B. Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175–187, 2009.
- CARNEIRO, L. A. B. C.; WARD, R. J. Functionalization of paramagnetic nanoparticles for protein immobilization and purification. **Analytical Biochemistry**, v. 540–541, p. 45–51, 2018.
- CARVALHO, D. R. et al. Ligand screening assay for the enzyme kallikrein immobilized on NHS-activated Sepharose. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 199, p. 114026, 2021.

- CHEN, G. et al. Screening for anti-proliferative and anti-inflammatory components from *Rhamnus davurica* Pall. using bio-affinity ultrafiltration with multiple drug targets. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 15, p. 3587–3595, 2018.
- CONSALVI, S. et al. A Series of COX-2 Inhibitors Endowed with NO-Releasing Properties: Synthesis, Biological Evaluation, and Docking Analysis. **ChemMedChem**, p. 1804–1811, 2016.
- COPELAND, R. A.; HARPEL, M. R.; TUMMINO, P. J. Targeting enzyme inhibitors. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 11, n. 7, p. 967–978, 2007.
- CORNELIO, V. E. et al. Cathepsin D immobilized capillary reactors for on-flow screening assays. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 151, p. 252–259, 2018.
- CUENDET, M. et al. An ELISA method to measure inhibition of the COX enzymes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1915–1921, 2006.
- DA SILVA, J. I. et al. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 44–52, 2013.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.
- DE MELO, R. R. et al. New heterofunctional supports based on glutaraldehyde-activation: A tool for enzyme immobilization at neutral pH. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1088, 2017.
- DE MORAES, M. C.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B. Solid-Supported Proteins in the Liquid Chromatography Domain to Probe Ligand-Target Interactions. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 752, 2019.
- DE SIMONE, A. et al. Immobilized Enzyme Reactors: an Overview of Applications in Drug Discovery from 2008 to 2018. **Chromatographia**, v. 82, n. 1, p. 425–441, 2019.
- DE SOUZA, A. S. et al. 3-Acyltetramic acids as a novel class of inhibitors for human kallikreins 5 and 7. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 9, p. 1094–1098, 2019.
- DENG, S.; XIA, L.; XIAO, H. Screening of α -glucosidase inhibitors from green tea extracts using immobilized enzymes affinity capture combined with UHPLC-QTOF MS analysis. **Chemical Communications**, v. 50, n. 20, p. 2582–2584, 2014.

- DENG, X. et al. Magnetic ligand fishing combination with high-performance liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry to screen and characterize cyclooxygenase-2 inhibitors from green tea. **Journal of Chromatography B**, v. 973, p. 55–60, 2014.
- DO AMARAL, B. S. et al. Direct assay to evaluate phosphoenolpyruvate carboxykinase activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 10, p. 2105–2113, 2019.
- DO AMARAL, B. S. et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase from *T. cruzi* magnetic beads affinity-based screening assays on crude plant extracts from Brazilian Cerrado. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 193, p. 113710, 2021.
- DONG, Y. et al. Activation of membrane-bound proteins and receptor systems: A link between tissue kallikrein and the KLK-related peptidases. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 9, p. 977–990, 2014.
- DRAG, M.; SALVESEN, G. S. Emerging principles in protease-based drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 690–701, 2010.
- DWEVEDI, A. **Enzyme immobilization: Advances in industry, agriculture, medicine, and the environment**. 1. ed., Springer International Publishing, 2016.
- FANG, S. M. et al. Immobilized enzyme reactors in HPLC and its application in inhibitor screening: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 2, p. 83–89, 2012.
- FERREIRA, R. S.; GLAUCIUS, O.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770–1778, 2011.
- FERRER, M. D. et al. Cyclooxygenase-2 Inhibitors as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 18, p. 3225–3241, 2018.
- FIGUEROA, C. D. et al. Overview of tissue kallikrein and kallikrein-related peptidases in breast cancer. **Biological Chemistry**, v. 399, n. 9, p. 937–957, 2018.
- FU, Y. et al. Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 168, p. 189–200, 2019.
- FURLANI, I. L. et al. Imobilização enzimática: conceitos e efeitos na proteólise. **Química Nova**, v. 43, n. 4, p. 463–473, 2020.

GARRET A. FITZGERALD; CARLO PATRONO, M. D. The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. **Drug Therapy**, v. 345, n. 6, p. 433–442, 2001.

GIERSE, J. K. et al. Valdecoxib: Assessment of cyclooxygenase-2 potency and selectivity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 3, p. 1206–1212, 2005.

GIERSE, J. K.; KOBOLDT, C. M. Cyclooxygenase assays. **Current Protocols in Pharmacology**, p. Unit 3.1, 2001.

GOLTSOV, A. et al. Cycle network model of prostaglandin H synthase-1. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 10, p. 1–21, 2020.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. 2. ed., Totowa, New Jersey:Humana Press, 2006.

GUO, J. et al. Recent advances in bio-affinity chromatography for screening bioactive compounds from natural products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 165, p. 182–197, 2019.

HASHEMI GORADEL, N. et al. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 5, p. 5683–5699, 2019.

HASSAN, G. S. et al. Celecoxib analogs bearing benzofuran moiety as cyclooxygenase-2 inhibitors: Design, synthesis and evaluation as potential anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 76, p. 482–493, 2014.

HERMANSON, D. J. et al. Substrate-selective COX-2 inhibition as a novel strategy for therapeutic endocannabinoid augmentation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 7, p. 358–367, 2014.

HOLDGATE, G. A.; MEEK, T. D.; GRIMLEY, R. L. Mechanistic enzymology in drug discovery: a fresh perspective. **Nature Publishing Group**, v. 17, n. 2, p. 115–132, 2017.

HOMAEI, A. A. et al. Enzyme immobilization: An update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p. 185–205, 2013.

HONG, S. K. Kallikreins as Biomarkers for Prostate Cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 526341, 2014.

HOU, W. et al. Screening and isolation of cyclooxygenase-2 inhibitors from *Trifolium pratense* L. via ultrafiltration, enzyme-immobilized magnetic beads, semi-preparative high-performance liquid chromatography and high-speed counter-current chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 6, p. 1133–1143, 2019.

- HSUANYU, Y.; DUNFORD, H. B. Prostaglandin H synthase kinetics. The effect of substituted phenols on cyclooxygenase activity and the substituent effect on phenolic peroxidatic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 25, p. 17649–17657, 1992.
- HUAI, J. et al. Characterization and screening of cyclooxygenase-2 inhibitors from Zi-shen pill by affinity ultrafiltration-ultra performance liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 241, p. 111900, 2019.
- HUGHES, J. P. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239–1249, 2011.
- JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, v. 20, p. 801–821, 2014.
- JIANG, X. et al. Mechanism of action and potential applications of selective inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1-mediated PGE2 biosynthesis by sonlicromanol's metabolite KH176m. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2021.
- JIAO, J. et al. Screening cyclooxygenase-2 inhibitors from *Andrographis paniculata* to treat inflammation based on bio-affinity ultrafiltration coupled with UPLC-Q-TOF-MS. **Fitoterapia**, v. 137, p. 104259, 2019.
- KALINSKA, M. et al. Kallikreins - The melting pot of activity and function. **Biochimie**, v. 122, p. 270–282, 2016.
- KISHIBE, M. Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis. **Journal of Dermatological Science**, v. 95, n. 2, p. 50–55, 2019.
- KRYZA, T. et al. The kallikrein-related peptidase family: Dysregulation and functions during cancer progression. **Biochimie**, v. 122, p. 283–299, 2016.
- KUKK, K.; JÄRVING, R.; SAMEL, N. Purification and characterization of the recombinant human prostaglandin H synthase-2 expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 83, n. 2, p. 182–189, 2012.
- KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498–512, 2002.
- LARINI, M. et al. Surfactina : Estrutura , Aplicações E Fatores envolvidos em sua produção. **Evidência - Ciência e Tecnologia**, v. 17, p. 105–118, 2017.
- LI, D. et al. Screening and analysis of cyclooxygenase-2 inhibitors from the complex matrix: A case study to illustrate the important effect of immobilized enzyme activity in magnetic ligand fishing. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 175, p. 112795, 2019.

- LI, S. et al. Combined chemotherapy with cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in treating human cancers: Recent advancement. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 129, p. 110389, 2020.
- LIMA, J. M. et al. Label-free offline versus online activity methods for nucleoside diphosphate kinase b using high performance liquid chromatography. **The Analyst**, v. 141, n. 15, p. 4733–41, 2016.
- LIMA, J. M. et al. On-Flow Ligand Screening Assay Based on Immobilized Nucleoside Diphosphate Kinase B from Homo sapiens. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 11, p. 2308–2317, 2019.
- LIMA, J. M. et al. Micro and nano-sized amine-terminated magnetic beads in a ligand fishing assay. **Analytical Methods**, v. 12, n. 33, p. 4116–4122, 2020.
- LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. α -Glucosidase immobilization on chitosan-enriched magnetic composites for enzyme inhibitors screening. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 308–316, 2017.
- LIU, R.; XU, K. P.; TAN, G. S. Cyclooxygenase-2 inhibitors in lung cancer treatment: Bench to bed. **European Journal of Pharmacology**, v. 769, p. 127–133, 2015.
- LIU, W. et al. Rapid and sensitive detection of the inhibitive activities of acetyl- and butyryl-cholinesterases inhibitors by UPLC-ESI-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 94, p. 215–220, 2014.
- LUCIDO, M. J. et al. Crystal Structure of Aspirin-Acetylated Human Cyclooxygenase-2: Insight into the Formation of Products with Reversed Stereochemistry. **Biochemistry**, v. 55, n. 8, p. 1226–1238, 2016.
- MASURIER, N. et al. Inhibitors of kallikrein-related peptidases: An overview. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 2, p. 655–683, 2018.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.
- MELLA, C. et al. Involvement of Kallikrein-Related Peptidases in Nervous System Disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, p. 166, 2020.
- MITCHELL, J. A. et al. Cyclooxygenases and the cardiovascular system. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 217, p. 107624, 2021.
- MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

- MONTE, C. DE et al. Dual Cyclooxygenase and Carbonic Anhydrase Inhibition by Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for the Treatment of Cancer. **Current Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 2812–2818, 2015.
- MURAFUJI, H. et al. Discovery and structure-activity relationship of imidazolinyndole derivatives as kallikrein 7 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 2, p. 334–338, 2019.
- MURPHY, R. C. et al. Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. **Analytical Biochemistry**, v. 346, n. 1, p. 1–42, 2005.
- PETROVIC, N.; MURRAY, M. Using N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) to assay cyclooxygenase activity in vitro. In: **Advanced Protocols in Oxidative Stress II**. Totowa, NJ:Humana Press, 2010. v. 594, p. 129–140.
- PODDAR, N. K. .; MAURYA, S. K. .; SAXENA, V. Proteases in physiology and pathology. In: **Proteases in Physiology and Pathology**. Singapura:Springer, 2017. p. 257–287.
- PRASSAS, I. et al. Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 3, p. 183–202, 2015.
- RAYAR, A. M. et al. New selective cyclooxygenase-2 inhibitors from cyclocoumarol: Synthesis, characterization, biological evaluation and molecular modeling. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 577–587, 2018.
- REGULSKI, M. et al. COX-2 inhibitors: A novel strategy in the management of breast cancer. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 4, p. 598–615, 2016.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandin and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 2012.
- ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. 29–34, 2009.
- SANTOS, J. A. N. et al. The natural flavone fukugetin as a mixed-type inhibitor for human tissue kallikreins. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 5, p. 1485–1489, 2016.
- SAVJANI, J. K. et al. Molecular docking, synthesis and biological screening of mefenamic acid derivatives as anti-inflammatory agents. **European Journal of Pharmacology**, v. 801, p. 28–34, 2017.
- SECUNDO, F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6250–6261, 2013.

SEGEL I. H. **Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems**. John Wiley & Sons; 1975.

SHELDON, R. A.; PELT, S. VAN. Enzyme immobilisation on biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223–6235, 2013.

SHI, Q. et al. Immobilization of cyclooxygenase-2 on silica gel microspheres: Optimization and characterization. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 19971–19983, 2015.

SMITH, W. L.; MALKOWSKI, M. G. Interactions of fatty acids, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and coxibs with the catalytic and allosteric subunits of cyclooxygenases-1 and -2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 5, p. 1697–1705, 2019.

SONG, I.; BALL, T. M.; SMITH, W. L. Different suicide inactivation processes for the peroxidase and cyclooxygenase activities of prostaglandin endoperoxide H synthase-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 4, p. 869–875, 2001.

SOTIROPOULOU, G.; PAMPALAKIS, G. Targeting the kallikrein-related peptidases for drug development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 12, p. 623–634, 2012.

SOTIROPOULOU, G.; PAMPALAKIS, G.; DIAMANDIS, E. P. Functional roles of human Kallikrein-related peptidases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 48, p. 32989–32994, 2009.

SOUALMIA, F.; EL AMRI, C. Serine protease inhibitors to treat inflammation: a patent review (2011-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 28, n. 2, p. 93–110, 2018.

STEFANINI, A. C. B. et al. Involvement of kallikrein-related peptidases in normal and pathologic processes. **Disease Markers**, v. 2015, p. 946572, 2015.

SZYMAŃSKI, P.; MARKOWICZ, M.; MIKICIUK-OLASIK, E. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 427–452, 2012.

TAN, X. et al. Toward the first class of suicide inhibitors of kallikreins involved in skin diseases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 598–612, 22 jan. 2015.

TANG, W. et al. A method using angiotensin converting enzyme immobilized on magnetic beads for inhibitor screening. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 164, p. 223–230, 2019.

- TEIXEIRA, T. S. P. et al. Biological evaluation and docking studies of natural isocoumarins as inhibitors for human kallikrein 5 and 7. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 20, p. 6112–6115, 2011.
- TEWARI, A. K. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of pyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors and anti-inflammatory agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 56, p. 8–15, 2014.
- TRINDADE XIMENES, I. A. et al. Magnetic particles for enzyme immobilization: A versatile support for ligand screening. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 204, p. 114286, 2021.
- VAN DER DONK, W. A.; TSAI, A. L.; KULMACZ, R. J. The cyclooxygenase reaction mechanism. **Biochemistry**, v. 41, n. 52, p. 15451–15458, 2002.
- VANZOLINI, K. L. et al. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors-tandem mass spectrometry: An on-flow tool for ligand screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 2038–2044, 2013.
- VECCHIO, A. J. et al. Investigating substrate promiscuity in cyclooxygenase-2 the role of Arg-120 and residues lining the hydrophobic groove. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 29, p. 24619–24630, 2012.
- VILELA, A. F. L. et al. Immobilized cholinesterases capillary reactors on-flow screening of selective inhibitors. **Journal of Chromatography B**, v. 968, p. 87–93, 2014.
- VILELA, A. F. L.; CARDOSO, C. L. An on-flow assay for screening of β -secretase ligands by immobilised capillary reactor-mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 9, n. 14, p. 2189–2196, 2017.
- VILELA, A. F. L.; CARDOSO, C. L.; MATEO, C. An immobilized acetylcholinesterase as test system to screen new inhibitor drugs to treat Alzheimer's disease. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 278, p. 196–201, 2019.
- VILLADÓNIGA, C.; CANTERA, A. M. B. New ACE-inhibitory peptides derived from α -lactalbumin produced by hydrolysis with *Bromelia antiacantha* peptidases. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101258, 2019.
- WALKER, A. L. et al. Structure guided drug design to develop kallikrein 5 inhibitors to treat Netherton syndrome. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 12, p. 1454–1458, 2019.
- WANG, P. et al. Kallikrein-related peptidases 4, 5, 6 and 7 regulate tumour-associated factors in serous ovarian cancer. **British Journal of Cancer**, v. 119, n. 7, p. 823–831, 2018.

- WANG, P.; BAI, H. W.; ZHU, B. T. Structural basis for certain naturally occurring bioflavonoids to function as reducing co-substrates of cyclooxygenase I and II. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. e12316, 2010.
- WOOLBRIGHT, B. L.; PILBEAM, C. C.; TAYLOR, J. A. Prostaglandin E2 as a therapeutic target in bladder cancer: From basic science to clinical trials. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 148, p. 106409, 2020.
- WOUTERS, B. et al. Immobilized-enzyme reactors integrated into analytical platforms: Recent advances and challenges. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 144, p. 116419, 2021.
- WU, G. et al. A mechanistic study of self-inactivation of the peroxidase activity in prostaglandin H synthase-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 14, p. 9231–9237, 1999.
- WUBSHET, S. G. et al. Magnetic Ligand Fishing as a Targeting Tool for HPLC-HRMS-SPE-NMR: α -Glucosidase Inhibitory Ligands and Alkylresorcinol Glycosides from *Eugenia catharinae* HHS Public Access. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 11, p. 2657–2665, 2015.
- XU, Z.; LIU, R.; GUAN, H. Dual-target inhibitor screening against thrombin and factor Xa simultaneously by mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 990, p. 1–10, 2017.
- YANG, C. et al. Mechanism for the reactivation of the peroxidase activity of human cyclooxygenases: investigation using phenol as a reducing cosubstrate. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.
- YOUSEF, G. M.; DIAMANDIS, E. P. An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: Emerging candidate tumour markers. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 443–452, 2003.
- YUAN, Y. et al. Online acetylcholinesterase inhibition evaluation by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry hyphenated with an immobilized enzyme reactor. **Journal of Chromatography A**, v. 1609, p. 460506 Contents, 2020.
- ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. **Iranian journal of pharmaceutical research**, v. 10, n. 4, p. 655–83, 2011.
- ZHANG, X. Y. et al. Discovery of cyclooxygenase-2 inhibitors from *Kadsura coccinea* by affinity ultrafiltration mass spectrometry and the anti-inflammatory activity. **Fitoterapia**, v. 151, p. 104872, 2021.

ZHANG, Y. et al. Rapid screening and identification of monoamine oxidase-A inhibitors from Corydalis Rhizome using enzyme-immobilized magnetic beads based method. **Journal of Chromatography A**, v. 1592, p. 1–8, 2019.

ZHAO, H. et al. Biological activity of lipopeptides from Bacillus. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 5951–5960, 2017.

ZHU, H. et al. Ultrahigh-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for evaluating enzyme activity and screening inhibitors of cyclooxygenase-2. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 28, n. 16, p. 1792–1800, 2014.

ZHUO, R. et al. Ligand fishing: A remarkable strategy for discovering bioactive compounds from complex mixture of natural products. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1516, 2016.

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1–25, 2016.