

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

Camila Loreta Rocha

Imobilização de calicreína para aplicação na triagem de ligantes

Ribeirão Preto
2023

Camila Loreta Rocha

Imobilização de calicreína para aplicação na triagem de ligantes

Versão resumida

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

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso

Ribeirão Preto

2023

RESUMO

As enzimas são catalisadores altamente eficientes e desempenham um papel crucial na manutenção da vida e em diversas reações. No entanto, seu alto custo, baixa estabilidade em condições adversas (como presença de solvente orgânico e variações de temperatura e pH) e dificuldade de recuperação e reutilização limitam suas aplicações. A imobilização enzimática ameniza, ou até mesmo, supera essas limitações, oferecendo maior estabilidade, reutilização e facilitando a separação e recuperação após as reações. A imobilização covalente em partículas magnéticas (MP) apresenta vantagens adicionais, como alta área superficial e manipulação por um campo magnético externo.

Além disso, a utilização de enzimas imobilizadas na triagem de ligantes permite a exposição a condições mais adversas (quando comparado aos ensaios em solução), ampliando as possibilidades de identificação de ligantes. A triagem de ligantes é importante porque possibilita a identificação de compostos que se ligam seletivamente às enzimas, levando à descoberta de inibidores ou ativadores enzimáticos. Isso desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de terapias direcionadas a doenças causadas por disfunções enzimáticas. No caso das calicreínas (KLKs), a descoberta de ligantes é de extrema importância, visto que essas enzimas estão presentes em diversos tecidos e fluidos biológicos e suas disfunções estão associadas a várias doenças, incluindo cânceres, doenças cardiovasculares, doenças de pele e distúrbios neurodegenerativos.

Neste estudo, um biorreator de KLK de pâncreas de porco imobilizada em MP foi desenvolvido como uma ferramenta ativa, estável e útil para a triagem de ligantes, representando uma abordagem inédita. Além disso, foi explorada a imobilização da KLK em capilares de sílica fundida, resultando na obtenção de KLK-ICERs, também uma inovação. Essas abordagens proporcionam avanços significativos na busca por ligantes, com potencial para desenvolver terapias relacionadas às KLKs.

Palavras-chave: Imobilização de enzimas; Calicreína; Triagem de ligantes; Pesca de ligantes; Partículas magnéticas.

ABSTRACT

Enzymes are highly efficient catalysts that play a crucial role in sustaining life and facilitating various reactions. However, their high cost, low stability under adverse conditions (such as organic solvents and variations in temperature and pH), and challenges in recovery and reuse limit their application. Enzyme immobilization mitigates or even overcomes these limitations by providing greater stability, reusability, and ease of separation and recovery after reactions. Covalent immobilization on magnetic particles (MP) offers additional advantages, including high surface area and manipulation through an external magnetic field.

Furthermore, the use of immobilized enzymes in ligand screening allows exposure to more adverse conditions compared to solution-based assays, thereby expanding the possibilities for ligand identification. Ligand screening is important as it enables the identification of compounds that selectively bind to enzymes, leading to the discovery of enzyme inhibitors or activators. This plays a fundamental role in developing therapies targeting diseases caused by enzymatic dysfunctions. In the case of kallikreins (KLKs), the discovery of ligands is of utmost importance, given that these enzymes are present in various tissues and biological fluids, and their dysfunctions are associated with several diseases, including cancers, cardiovascular diseases, skin disorders, and neurodegenerative disorders.

In this study, a porcine pancreatic KLK immobilized in MP bioreactor was developed as an active, stable, and useful tool for ligand screening of porcine pancreatic KLK, representing a novel approach. Furthermore, the immobilization of KLK on fused silica capillaries, resulting in KLK-ICERs, was explored as well, representing another innovation. These approaches provide significant advancements in search for ligands, with the potential to develop therapies related to KLKs.

Keywords: Enzyme immobilization, Kallikrein, Ligand screening, Ligand fishing, Magnetic particles.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENZIMAS

As enzimas são macromoléculas proteicas biocatalisadoras extremamente eficientes e indispensáveis para a manutenção da vida (KENAKIN, 2022). Elas catalisam a grande maioria das reações que ocorrem nas células e são compostas por diversas cadeias peptídicas (SINGH; SINGH; PANDEY, 2019). A ação enzimática é altamente dependente das condições do meio, como pH, temperatura e força iônica, e geralmente ocorre em condições mais amenas comparada com catalisadores químicos (KERMASHA; ESKIN, 2021a)

Um exemplo notável que evidencia a importância e a eficiência das enzimas é o processo de conversão de adenosina em inosina. Sem a catálise enzimática, essa transformação levaria aproximadamente 120 anos para ocorrer. No entanto, na presença da enzima adenosina desaminase, essa mesma reação é completada em apenas 370 segundos (RUFER, 2021).

A estrutura das enzimas é composta por uma sequência de aminoácidos ligados por ligações peptídicas, formando estruturas secundárias como folhas dobradas (folha β pregueada) e hélices (α -hélice). A estrutura terciária é formada pelo entrelaçamento das estruturas secundárias e mantida por ligações de hidrogênio, ligações iônicas, interações hidrofóbicas e ligações dissulfeto. O sítio ativo das enzimas é a parte responsável pela reação catalítica (KERMASHA; ESKIN, 2021a; PALMER; BONNER, 2011a).

A catálise enzimática apresenta diversas vantagens em relação aos catalisadores químicos, como alta especificidade e estereosseletividade (SCOTT *et al.*, 2022) e menores toxicidade ambiental e fisiológica (KERMASHA; ESKIN, 2021b). Algumas enzimas possuem especificidade de grupos químicos, atuando em substratos que contenham esse grupo, enquanto outras possuem especificidade absoluta, agindo apenas sobre um único substrato (PALMER; BONNER, 2011b).

Além de desempenharem um papel fundamental nos organismos, as enzimas têm ampla utilização em diversas aplicações, como pesquisas científicas (BATTELLI *et al.*, 2023), tratamento de água (WANG *et al.*, 2023), biorremediação (SOMU *et al.*, 2022), diagnósticos clínicos (MALIK; PUNDIR, 2002) e em diversos setores industriais (GAUTAM *et al.*, 2023; MADENDE; MADENDE, 2023; SUTAY KOCABAŞ; LYNE; USTUNOL, 2022). Além disso, as enzimas são importantes alvos no desenvolvimento de fármacos (RUFER, 2021).

No entanto, a utilização de enzimas apresenta algumas desvantagens, como a baixa estabilidade em condições operacionais específicas, como altas temperaturas, variações de pH

e presença de solventes orgânicos, além da dificuldade de recuperação e reutilização. Contudo, essas limitações podem ser amenizadas, ou até mesmo superadas, por meio da imobilização enzimática (KERMASHA; GILL, 2021; MOHAMAD *et al.*, 2015; SOMU *et al.*, 2022).

1.2 MODULADORES ENZIMÁTICOS: INIBIDORES E ATIVADORES

1.2.1 Inibidores enzimáticos

1.2.1.1 Importância dos inibidores enzimáticos no desenvolvimento de fármacos

Embora as enzimas sejam essenciais para a existência da vida, em vários casos, elas podem apresentar expressão desregulada e estar relacionadas a diversas doenças. Por isso, elas são importantes alvos no desenvolvimento de fármacos (COPELAND, 2013). A principal abordagem no desenvolvimento desses fármacos é a inibição enzimática (KENAKIN, 2017). Um exemplo de fármaco que tem como alvo enzimas humanas é o lapatinibe, um inibidor de tirosina quinase utilizado no tratamento de câncer de mama avançado ou metastático com superexpressão da proteína HER2 (TRIDENTE, 2017).

Além disso, diversos fármacos atuam inibindo enzimas essenciais para a vida de agentes patógenos, como bactérias, fungos, vírus e parasitas. Por exemplo, os fármacos atazanavir, darunavir, lopinavir e tipranavir são antirretrovirais inibidores de protease administrados no tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (DUBEY, 2017).

Os inibidores enzimáticos despertam interesse na pesquisa de desenvolvimento de fármacos, impulsionados pela importância das enzimas nos organismos, suas relações com patologias e sua suscetibilidade à inibição por moléculas de baixo peso molecular (COPELAND, 2013; KENAKIN, 2022). Uma fonte rica de fármacos são as plantas medicinais, que incluem os inibidores enzimáticos (MUKHERJEE *et al.*, 2020). Um exemplo notável é a aspirina, derivada da salicilina encontrada no salgueiro branco. A salicilina foi quimicamente modificada para produzir o ácido salicílico, que serviu como base para o desenvolvimento da aspirina (GRIPPE, 2016). A aspirina possui como princípio ativo o ácido acetilsalicílico que atua inibindo a enzima ciclooxigenase (KENAKIN, 2017). Essa descoberta destaca o potencial das plantas medicinais como fonte de inibidores enzimáticos para o desenvolvimento de fármacos.

1.2.1.2 Tipos de inibição enzimática

As enzimas são proteínas sensíveis e possuem uma flexibilidade conformacional sutil, o que as torna suscetíveis à modulação de sua atividade por meio de diversas condições ambientais ou ligantes inibidores (PUNEKAR, 2018). Os inibidores enzimáticos são compostos capazes de reduzir (inibidores parciais) ou interromper completamente a atividade catalítica de uma enzima (inibidores lineares) ao interagir com a enzima livre (E), o complexo enzima-substrato (ES) ou ambos (CORNISH-BOWDEN, 1979).

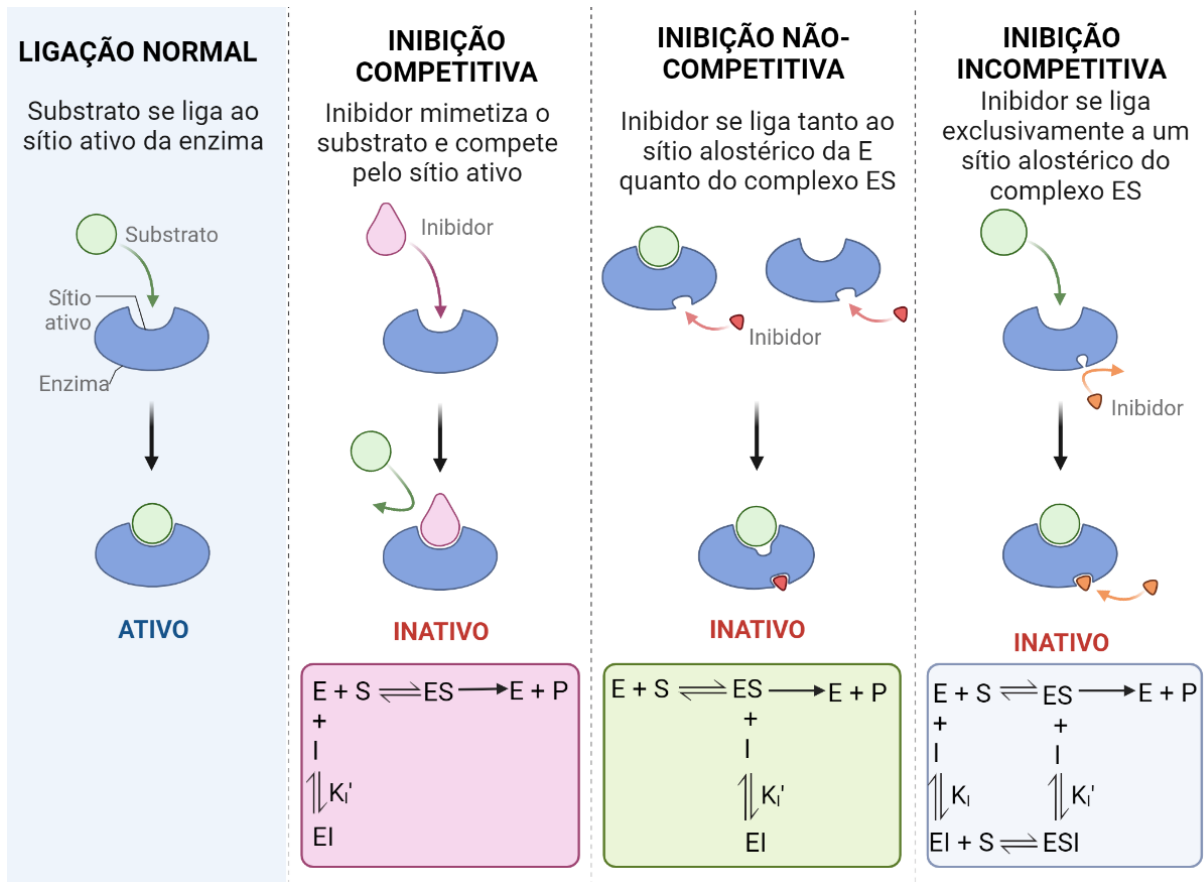
Os inibidores enzimáticos podem ser classificados como irreversíveis ou reversíveis. Na inibição irreversível, os inibidores não se dissociam ou se dissociam de forma muito lenta da enzima. Eles podem se ligar covalentemente a grupos funcionais essenciais para a atividade enzimática ou induzir uma alteração conformacional na enzima, formando um complexo altamente estável. Por outro lado, na inibição enzimática reversível, a atividade catalítica da enzima pode ser restaurada ao remover o inibidor do sistema (KENAKIN, 2017). Dentre os tipos de inibição reversível, destacam-se a inibição competitiva, incompetitiva, mista e não competitiva (NELSON; COX, 2014).

Na inibição competitiva, o inibidor se liga ao sítio ativo da enzima, impedindo a formação do complexo ES. Muitos inibidores competitivos possuem uma estrutura semelhante à do substrato, formando um complexo enzima-inibidor (EI), mas não são catalisados (NELSON; COX, 2014).

Já na inibição enzimática incompetitiva, o inibidor se liga exclusivamente ao complexo ES (BUKER; BORIACK-SJODIN; COPELAND, 2019). Nesse caso, a ligação entre o substrato e a enzima cria o sítio de ligação para o inibidor. Ou seja, somente quando o substrato está ligado à enzima é que o inibidor pode se unir ao complexo formado (BERG *et al.*, 2015).

Na inibição mista, o inibidor apresenta afinidade tanto pela E quanto pelo complexo ES. Essas afinidades não são iguais, e o inibidor pode se ligar tanto à E quanto ao complexo ES (BERG *et al.*, 2015). Esse tipo de inibição ocorre em um local alostérico da enzima. Um caso especial dessa inibição é a inibição não competitiva, que ocorre quando o inibidor possui a mesma afinidade tanto pela E quanto pelo complexo ES (BUKER; BORIACK-SJODIN; COPELAND, 2019). No entanto, esse tipo de inibição é raramente observado experimentalmente (NELSON; COX, 2014). As representações das inibições enzimáticas estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1 - Tipos de inibição enzimática



Fonte: Autora, 2023

1.2.2 Ativadores enzimáticos

Os ativadores enzimáticos são capazes de aumentar a capacidade catalítica das enzimas, desempenhando um papel fundamental na regulação da atividade enzimática e na manutenção do equilíbrio metabólico dentro das células (NELSON; COX, 2014; PALMER; BONNER, 2011c). Existem diferentes mecanismos pelos quais os ativadores enzimáticos atuam.

Um exemplo de ativação enzimática por ligação direta é a ativação da tripsina pelo tripsinogênio. O tripsinogênio, uma forma inativa da tripsina, se liga diretamente à tripsina, causando uma mudança em sua estrutura. Isso leva à clivagem do tripsinogênio e à formação da tripsina ativa, permitindo que ela desempenhe suas funções no processo de digestão de proteínas (GARCÍA-MORENO *et al.*, 1991).

Outros ativadores atuam por modulação alostérica, ligando-se a sítios regulatórios específicos na enzima e induzindo mudanças conformacionais que aumentam sua atividade

(KENAKIN, 2017). Um exemplo disso é a regulação alostérica da piruvato carboxilase pela acetil-CoA, que aumenta sua atividade na manutenção da homeostase metabólica (CHAI *et al.*, 2022).

Além disso, existem ativadores que promovem modificações covalentes na enzima, adicionando grupos químicos que ampliam sua atividade. Um exemplo é a fosforilação da glicogênio-fosforilase muscular pela fosforilase-cinase, resultando em sua ativação e aumento da degradação do glicogênio (NELSON; COX, 2014).

A ativação enzimática tem sido explorada em diversas pesquisas científicas, incluindo aplicações na indústria petroquímica (AYALA; TORRES, 2004), tratamento anticâncer (LIU *et al.*, 2023) e complicações metabólicas induzidas por Covid-19 (CHEN *et al.*, 2022).

Um exemplo de fármaco que utiliza ativadores enzimáticos é o Tenecteplase, usado no tratamento de ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais (AVCs). O Tenecteplase atua convertendo o plasminogênio em plasmina, uma enzima responsável pela dissolução de coágulos sanguíneos associados a essas condições (MURPHY *et al.*, 2023).

1.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização enzimática é um processo que envolve a fixação de enzimas em suportes sólidos, permitindo sua reutilização em múltiplas reações (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Essa tecnologia já é empregada na biocatálise de fluxo (ROMERO-FERNÁNDEZ; PARADISI, 2020) e tem despertado crescente interesse em sua aplicação em larga escala em diversos outros setores, incluindo a produção de biodiesel e bioetanol (FEDERSEL; MOODY; TAYLOR, 2021).

A imobilização enzimática apresenta diversas vantagens em relação aos ensaios utilizando enzimas livres. Uma das principais vantagens é a melhoria na estabilidade e vida útil das enzimas. A imobilização confere às enzimas uma maior estabilidade a condições adversas, como mudanças de temperatura, variações de pH e presença de solventes orgânicos e contaminantes, o que aumenta sua resistência e prolonga sua atividade catalítica (CAO, 2005a).

Outra vantagem é a facilidade de recuperação e reutilização das enzimas imobilizadas. Ao contrário das enzimas livres, que geralmente são perdidas ou necessitam de etapas complexas de separação e purificação, as enzimas imobilizadas podem ser facilmente recuperadas do sistema, permitindo sua reutilização em múltiplas reações. Isso reduz os custos e o tempo de produção, tornando a imobilização enzimática uma opção mais econômica e

eficiente (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Existem diversos métodos de imobilização, cada um com suas próprias vantagens e desvantagens.

A imobilização por adsorção física é um método simples e reversível de imobilização, onde as enzimas se ligam ao suporte sólido por meio de interações não covalentes, como interações iônicas, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals (CAO, 2005b). A principal desvantagem do método é que a ligação fraca entre as enzimas e o suporte pode resultar em lixiviação das proteínas ao longo do tempo (ATTIQUE *et al.*, 2023).

A imobilização por encapsulamento consiste na inclusão das enzimas em matrizes poliméricas. Esse método de imobilização é eficaz em evitar alterações na estrutura da enzima (LAU; YIU, 2022) e oferece uma proteção efetiva contra fatores externos, aumentando sua estabilidade. No entanto, é importante destacar que a difusão restrita do substrato e dos produtos pode limitar a aplicação desse método (ZDARTA *et al.*, 2018).

A imobilização por aprisionamento é um método que consiste na oclusão de enzimas dentro de uma rede polimérica, permitindo a passagem do substrato e dos produtos. Essa técnica apresenta diversas vantagens, como facilidade de execução, preservação da estrutura da enzima, proteção da enzima (aumentando sua estabilidade e prolongando sua atividade), além de ser aplicável a diferentes tipos de enzimas. No entanto, a aplicação dessa técnica pode ser limitada devido a restrições na transferência de massa (SASSOLAS; HAYAT; MARTY, 2013).

Os CLEAs (*Cross-Linked Enzyme Aggregates*) e CLECs (*Cross-Linked Enzyme Crystals*) são métodos de imobilização por reticulação, onde as enzimas são ligadas umas às outras utilizando principalmente glutaraldeído. Os CLECs são cristais enzimáticos reticulados, enquanto os CLEAs são agregados enzimáticos reticulados obtidos pela precipitação seguida de reticulação, combinando purificação e imobilização em uma única etapa. Ambos oferecem alta estabilidade e produtividade, mas a cristalização necessária para os CLECs pode ser um processo trabalhoso que requer enzimas de alta pureza (SHELDON, 2007). Por isso, os CLEAs têm sido preferidos em várias aplicações (SHELDON; VAN PELT, 2013).

A imobilização por ligação covalente é amplamente empregada para conectar enzimas a um suporte através de ligações químicas irreversíveis. Esse método oferece benefícios como maior estabilidade e resistência a condições adversas, como variações de temperatura, pH e presença de solventes orgânicos. No entanto, as ligações covalentes entre a enzima e o suporte podem causar diminuição na atividade catalítica devido a alterações na estrutura tridimensional, restrições de mobilidade e impedimentos estéricos (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013).

Para minimizar esses efeitos, é crucial que os sítios ativos da enzima não estejam envolvidos na ligação covalente ao suporte, para isso, pode-se empregar análogos de substrato (como inibidores competitivos) durante a imobilização (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Além disso, a utilização de agentes espaçadores proporciona uma melhoria na atividade enzimática, conferindo maior flexibilidade conformacional à enzima. A natureza desses espaçadores também pode otimizar o desempenho das enzimas, adicionando características ao microambiente em que a proteína está localizada (CAO, 2005c).

A imobilização covalente de enzimas em partículas magnéticas (MP), ou nanopartículas magnéticas, oferece vantagens significativas devido à sua fácil recuperação utilizando um campo magnético externo (LAU; YIU, 2022; SHELDON; VAN PELT, 2013). Essas MP podem ser funcionalizadas com grupos químicos para permitir a ligação covalente das enzimas. Além disso, as MP possuem uma ampla área de superfície, o que proporciona uma alta capacidade de carga enzimática, juntamente com uma baixa resistência à transferência de massa (SHARMA *et al.*, 2022).

Logo, a imobilização enzimática é uma técnica que oferece vantagens significativas, mas também apresenta desafios específicos. A escolha do método de imobilização adequado depende da aplicação e das propriedades desejadas da enzima imobilizada.

1.4 ENSAIOS DE TRIAGEM DE LIGANTES UTILIZANDO ENZIMAS IMOBILIZADAS

Os produtos naturais são uma fonte valiosa de substâncias ativas. No entanto, é frequente encontrar essas substâncias em concentrações reduzidas nos extratos. Embora o fracionamento guiado por bioensaio seja eficaz, o processo é consideravelmente trabalhoso. Com o intuito de contornar as etapas laboriosas do fracionamento guiado por bioensaio, têm sido relatados diversos estudos que exploram ensaios de triagem de ligantes como alternativas promissoras (DE FARIA *et al.*, 2022).

A utilização de IMERs (*Immobilized-enzyme reactors*) na triagem de ligantes apresenta diversas vantagens, pois as enzimas podem ser utilizadas repetidamente e com maior estabilidade (VILELA; DOS REIS; CARDOSO, 2021), sendo que a imobilização por ligação covalente é a técnica mais utilizada para fins de triagem (XIMENES *et al.*, 2021). A triagem de ligantes se baseia em interações de afinidade específicas e reversíveis entre a enzima e os

ligantes e tem sido referida como cromatografia de bioafinidade (DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019).

Os ensaios de triagem podem ser conduzidos através de duas abordagens bioanalíticas: *on-flow* ou *off-flow*. Nos ensaios *on-flow*, a interação entre o ligante e a proteína, bem como a detecção desse evento, ocorre em tempo real dentro de um sistema de fluxo contínuo (ZHUO *et al.*, 2016). Diversas configurações de IMERs foram acopladas ao LC-MS para aplicação da triagem de ligantes *on-flow*, como por exemplo: ICERs (*immobilized capillary enzyme reactors*) (SEIDL *et al.*, 2019; VILELA; CARDOSO, 2017) e suportes monolíticos (KUBOTA *et al.*, 2017).

Já nos ensaios *off-flow*, a interação entre o ligante e a enzima, bem como a detecção desse evento, ocorre em etapas separadas. A amostra é primeiramente incubada com a enzima imobilizada, e posteriormente a interação é analisada (ZHUO *et al.*, 2016). Os ensaios *off-flow* desempenham um papel significativo na triagem de ligantes, e estudos têm sido conduzidos utilizando diferentes abordagens. Alguns exemplos incluem enzimas imobilizadas em sepharose-NHS (CARVALHO *et al.*, 2021), MP (LIU; CHEN; SHI, 2017) e agarose (VILELA; CARDOSO; MATEO, 2019).

Além das diferentes abordagens bioanalíticas (*on-flow* ou *off-flow*), os ensaios de triagem de ligantes podem ser divididos em dois grupos principais: ensaios de afinidade e ensaios de atividade. Os ensaios de atividade são conduzidos quando se conhece a atividade da enzima imobilizada e deseja-se investigar a modulação de sua atividade causada por um ligante (XIMENES *et al.*, 2021). Uma grande vantagem dessa abordagem é que ela permite identificar inibidores ou ativadores enzimáticos. Esse feito pode ser realizado monitorando-se o produto formado, por exemplo, e esse ensaio pode fornecer informações importantes, como IC₅₀ e mecanismo e constante de inibição (K_i) (DE MORAES *et al.*, 2014; XIMENES *et al.*, 2021).

Os ICERs são exemplos de biorreatores utilizados em ensaios de triagem de ligantes por atividade. Eles consistem em enzimas imobilizadas na superfície interna de um suporte capilar, como sílica fundida, utilizando um agente espaçador. O monitoramento da atividade dos ICERs pode ser realizado em fluxo contínuo (*on-flow*), através do acoplamento desses biorreatores com LC-MS, LC-UV, LC acoplado a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS). Ainda é possível haver ICERs com duas ou mais enzimas coimobilizadas (VILELA; DOS REIS; CARDOSO, 2021).

Os ICERs são exemplos de biorreatores utilizados em ensaios de triagem de ligantes por atividade. Eles consistem em enzimas imobilizadas na superfície interna de um suporte capilar,

como sílica fundida, utilizando um agente espaçador. O monitoramento da atividade dos ICERs pode ser realizado em fluxo contínuo (*on-flow*), através do acoplamento desses biorreatores com diferentes técnicas analíticas. Estudos demonstraram o sucesso no acoplamento de ICERs a: LC-MS (VILELA *et al.*, 2018), LC-UV (DA SILVA *et al.*, 2013) e LC acoplado à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) (VANZOLINI *et al.*, 2013). Além disso, é importante destacar a coimobilização de enzimas em capilares de sílica fundida, ampliando as possibilidades de aplicação desses biorreatores (VILELA; DOS REIS; CARDOSO, 2021).

Por outro lado, nos ensaios de afinidade com IMERs, busca-se identificar os compostos que apresentam afinidade pela enzima imobilizada, independentemente da modulação da atividade. Nesse caso, os ligantes são primeiramente identificados e, posteriormente, eles são caracterizados e sua capacidade de modulação de atividade é avaliada (XIMENES *et al.*, 2021). Os ensaios de afinidade apresentam vantagens em termos de especificidade, velocidade e seletividade. Dentre os ensaios de afinidade, destaca-se a técnica de “pesca de ligantes”, também chamada de ensaio “*ligand fishing*”, por ser uma técnica prática e eficaz na descoberta de ligantes (ZHUO *et al.*, 2016).

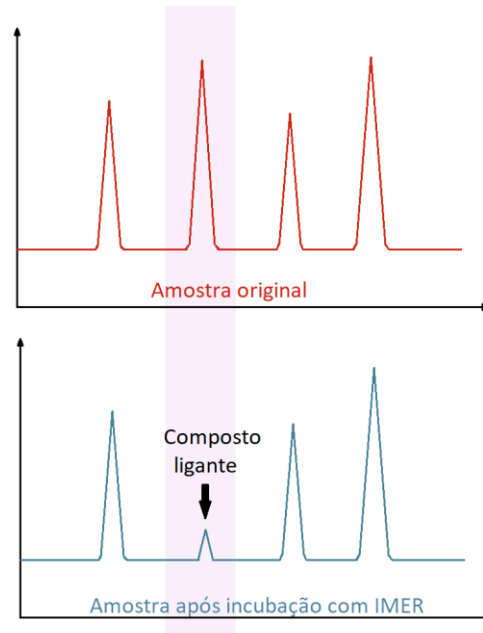
Nesse ensaio, as enzimas são imobilizadas em um suporte sólido, e o IMER é diretamente incubado com uma matriz complexa contendo possíveis ligantes e não ligantes, o que diminui a necessidade de laboriosas etapas de pré-tratamento de amostra. Assim, os ligantes se ligarão à proteína, enquanto os não ligantes permanecerão na solução e serão lavados. A separação entre os ligantes ligados ao IMER e os não ligantes depende do suporte e pode ocorrer por ultrafiltração, diálise, cromatografia de exclusão de tamanho, separação magnética e outros (DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019; ZHUO *et al.*, 2016).

No ensaio de pesca de ligantes, a identificação dos compostos é realizada através de duas abordagens (que podem ser empregadas de maneira complementar): análise direta dos ligantes eluídos do IMER (DE MORAES *et al.*, 2014; ZHUO *et al.*, 2016) (onde em muitos casos, para que essa eluição ocorra, o IMER é submetido a solventes orgânicos e alterações de pH, por exemplo) e através da abordagem do “pico ausente” ou “*missing peak*”.

Pico ausente trata-se da ausência de eluição de um pico na análise cromatográfica, uma técnica baseada no método primeiramente relatado por Cieśła e Moaddel (2016). Para aplicação dessa técnica, o cromatograma da matriz original deve ser obtido. Depois, na análise da matriz após incubação com o IMER, o pico ausente indica a retenção seletiva do ligante pela enzima imobilizada, permitindo a posterior identificação desse ligante (DE FARIA *et al.*, 2022). Logo,

a retenção do composto pela enzima resultará em um pico ausente ou em menor intensidade, conforme a representação na Figura 2.

Figura 2 - Identificação de ligante através da análise de pico ausente ou *missing peak*



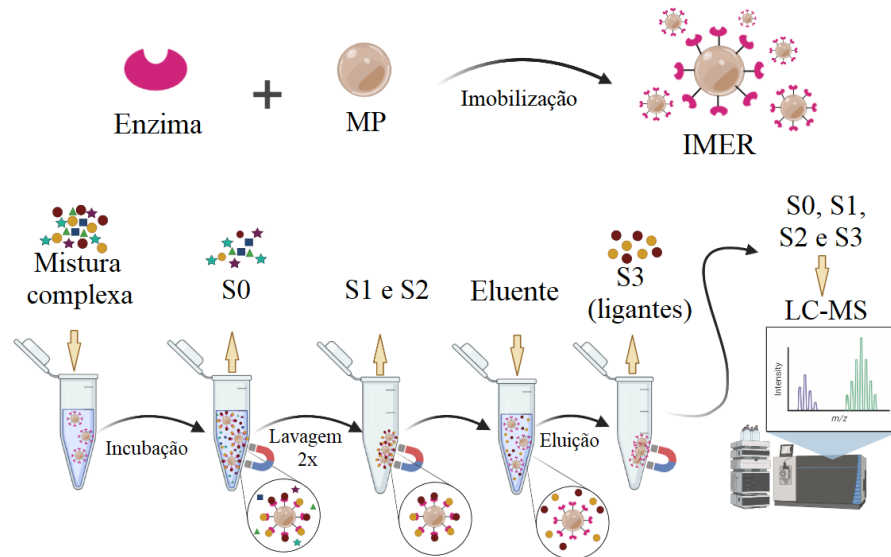
Fonte: Autora, 2023

Os mais diversos suportes foram relatados para imobilização de biomoléculas para aplicação na técnica de pesca de ligantes. Dentre eles estão coluna monolítica revestida por membrana celular de glóbulos brancos (ZHANG *et al.*, 2021), grânulos de agarose imobilizados com DNA triplex (XU *et al.*, 2012) e lipase adsorvida em nanotubos de halosita (WANG *et al.*, 2015) e em fibras ocas de polipropileno (TAO *et al.*, 2013). A enzima tirosina fosfatase 1B (PTP1B) foi até mesmo ancorada em células de *Escherichia coli* para aplicação do ensaio (YUAN *et al.*, 2021).

Em 2007, foi a primeira vez em que as MP foram utilizadas para aplicação no ensaio de pesca de ligantes, sendo imobilizada nelas a proteína albumina de soro humano (HSA) (MOADDEL *et al.*, 2007). Desde então, as MP se tornaram o suporte mais explorado na pesca de ligantes (ZHANG *et al.*, 2019). Tal efeito se deve às diversas vantagens na utilização das MP, como: manipulação por um ímã externo, variedade de tamanho, fácil funcionalização de superfície (DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019) e grande área superficial (XIMENES *et al.*, 2021). Além disso, foi relatado que a imobilização de enzimas em MP não afetou a atividade e os parâmetros cinéticos da proteína, como constante de Michaelis-Menten aparente (K_{Map}) e

velocidade máxima (V_{\max}) e que as MP possibilitam um acesso eficiente ao substrato (ADALBERTO *et al.*, 2012). Na Figura 3 está representado o ensaio *ligand fishing* utilizando enzimas imobilizadas em MP.

Figura 3 - Ensaio *ligand fishing* utilizando MP



Fonte: Autora, 2023

Diversos estudos utilizaram as MP no ensaio de pesca de ligantes empregando diferentes métodos de monitoramento, como: LC-MS (LI *et al.*, 2014), infusão direta em MS (ZHANG *et al.*, 2014), eletroforese capilar equipado com arranjo de diodo (CE-DAD) (LIU; CHEN; SHI, 2017), cromatografia líquida de ultra alta eficiência em combinação com espectrometria de massa de alta resolução em tandem (UHPLC-HRMS/MS) (DE FARIA *et al.*, 2022) e LC-MS/MS (ZHANG *et al.*, 2019).

Assim, independentemente das técnicas bioanalíticas empregadas, os ensaios de triagem de ligantes empregando IMERs são valiosos na descoberta de novos compostos bioativos, oferecendo confiabilidade, eficiência e seletividade. Além disso, reduzem o tempo e os recursos necessários, uma vez que empregam matrizes complexas sem purificação prévia (DE MORAES; CARDOSO; CASS, 2019). Portanto, essas ferramentas desempenham um papel importante na busca por substâncias ativas com potencial terapêutico, como inibidores de enzimas relacionadas a doenças.

1.5 CALICREÍNAS

As KLKs são um grupo de serino proteases que desempenham papéis importantes em diversos tecidos e fluidos biológicos. Elas são inicialmente secretadas como zimogênios inativos e requerem ativação proteolítica por meio da clivagem de um pró-peptídeo N-terminal para exercerem suas funções. Essa ativação geralmente é realizada por outras proteases (BRATTSAND *et al.*, 2005; DE VEER *et al.*, 2017). Além disso, a função catalítica das KLKs no organismo é finamente regulada por inibidores de proteases (MEYER-HOFFERT *et al.*, 2010). As KLKs são divididas em dois grupos: o primeiro grupo compreende a KLK plasmática (KLK 1B), e o segundo grupo compreende as KLKs teciduais (KLK1 – 15) (PRASSAS *et al.*, 2015).

A KLK plasmática é expressa exclusivamente pelas células hepáticas e desempenha funções importantes no organismo humano, como fibrinólise, coagulação sanguínea e inflamação. No entanto, essa enzima também está associada a algumas patologias, como câncer e doenças cardiovasculares (COSTA-NETO *et al.*, 2008; SCHMAIER; MCCRAE, 2007).

As KLKs teciduais estão envolvidas em processos fisiológicos fundamentais no organismo humano. A KLK1 é a enzima com funções mais bem compreendidas entre as KLKs teciduais. Ela desempenha um papel fundamental no sistema calicreína-cinina, que atua em processos como inflamação, vasodilatação, contração de músculo liso, controle da pressão sanguínea, fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular. Ademais, a KLK1 participa da indução de broncoconstrição e hipersecreção de muco e desempenha papéis importantes em outros tecidos, especialmente nos sistemas renal, cardiovascular e pancreático. Além disso, a KLK1 já foi encontrada em outros tecidos, como glândulas salivares, sistema nervoso central, granulócitos e miocárdio (ANDREAS; SEBASTIAN; PETER, 1999; KASHUBA *et al.*, 2013; KRYZA *et al.*, 2016; PRASSAS *et al.*, 2015).

As KLKs desempenham um papel importante nas camadas granulares e cornificadas da epiderme, principalmente as KLKs 5, 7, 14 e 8. Elas estão envolvidas em processos de descamação, inflamação, contribuição para a defesa microbiana e na maturação gradual da filagrina (DE VEER *et al.*, 2017).

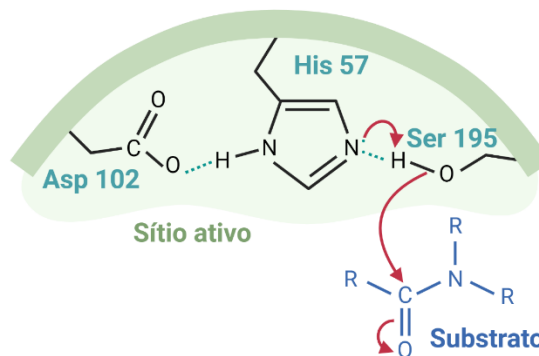
Outras KLKs, como a KLK3 e a KLK2, estão envolvidas em uma importante função na fertilização, que é a liquefação do fluido seminal (ADAMOPOULOS; KONTOS; SCORILAS, 2019). É importante ressaltar que no organismo algumas KLKs participam de processos em cascata, podendo ter funções sobrepostas em diferentes contextos fisiológicos, e uma KLK pode

até mesmo ativar outra (BRATTSAND *et al.*, 2005). As pesquisas sobre as KLKs continuam descobrindo mais detalhes sobre suas funções e interações ainda desconhecidas (DE VEER *et al.*, 2017).

As KLKs teciduais compartilham semelhanças genéticas e proteicas em sua estrutura terciária, com a identidade de aminoácidos variando de 40% a 80% entre elas (YOUSEF; DIAMANDIS, 2001).

Assim como a maioria das serino proteases, as KLKs possuem uma tríade catalítica composta por histidina (His57), serina (Ser195) e ácido aspártico (Asp102) em seu sítio ativo (representado na Figura 4) (PODDAR; MAURYA; SAXENA, 2017).

Figura 4 - Tríade catalítica das serino proteases

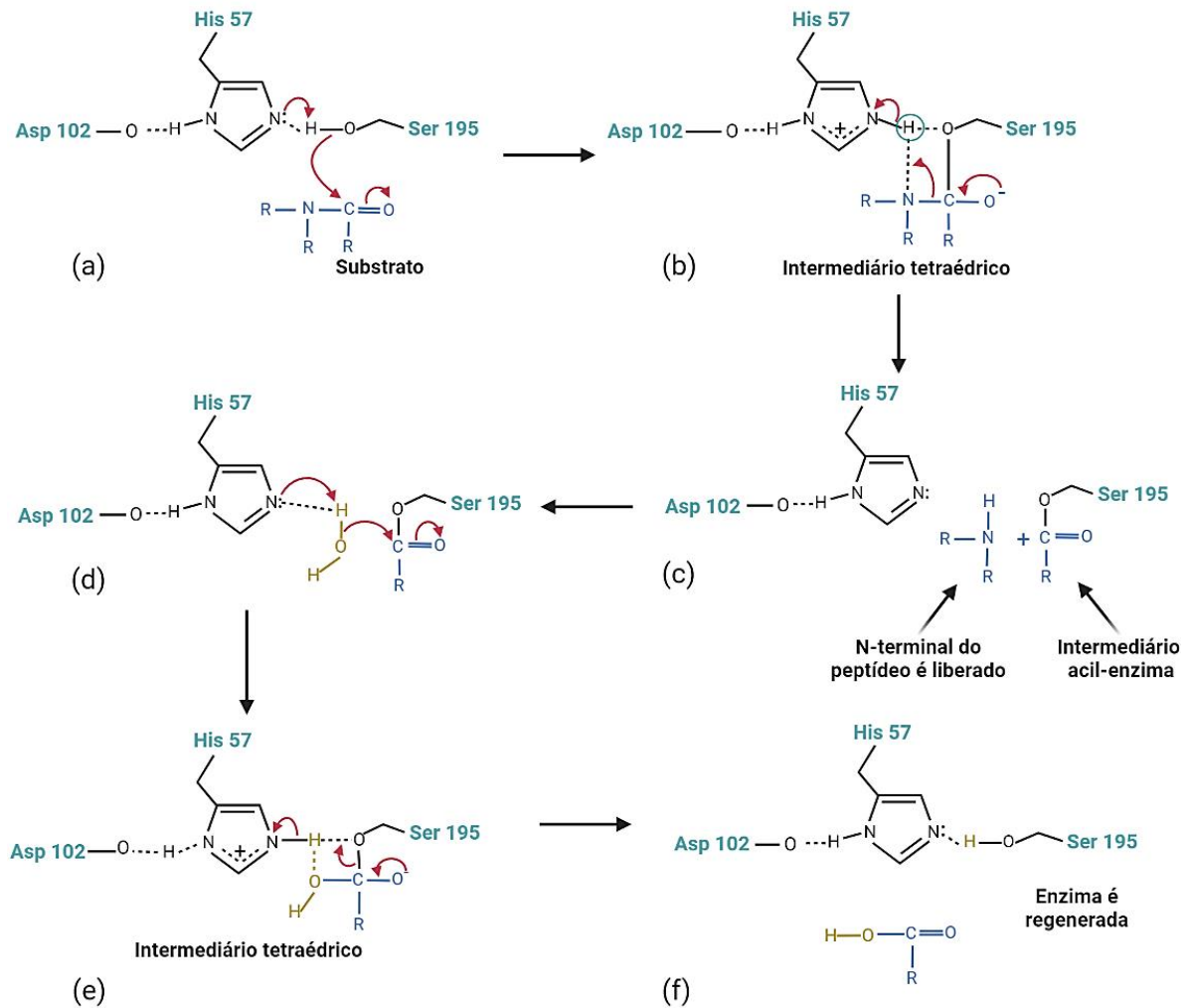


Fonte: Autora, 2023

O mecanismo catalítico das serino proteases pode ser visualizado na Figura 5. Primeiramente, na etapa de acilação, o substrato se une ao sítio ativo da enzima (a). Em seguida, ocorre a formação do intermediário tetraédrico quando a serina realiza um ataque nucleofílico na porção carbonilada do peptídeo (b). Na sequência, ocorre a formação do intermediário acil-enzima, no qual a ligação peptídica do substrato é rompida, resultando na separação dos fragmentos peptídicos e na formação de uma ligação covalente entre o carbono carbonilado do peptídeo e a serina no sítio ativo da enzima (c).

Em seguida, na etapa de desacilação, a água age como nucleófilo, estabilizando o peptídeo clivado do carbono carbonílico e gerando um novo intermediário tetraédrico com o nitrogênio da histidina (d-e). Por fim, ocorre a regeneração do sítio ativo pela liberação do peptídeo clivado (f). Esse processo de permite que a serino protease esteja pronta para se ligar a um novo substrato e iniciar um novo ciclo catalítico.

Figura 5 - Mecanismo catalítico das serino proteases



Fonte: Autora, 2023

Como mencionado, as KLKs estão sujeitas a um delicado equilíbrio de ativação e inibição em diferentes tecidos e contextos, a fim de regular adequadamente suas atividades (DE VEER *et al.*, 2017; MEYER-HOFFERT *et al.*, 2010). No entanto, diversos estudos demonstram que a expressão e atividade desreguladas das KLKs estão relacionadas a várias doenças. Sendo que, as KLKs teciduais apresentam desregulação na maioria dos tumores sólidos, principalmente em tumores hormônio-dependentes (KRYZA *et al.*, 2016).

A KLK6, por exemplo, apresenta expressão diminuída no tecido cerebral de pacientes com doença de Alzheimer e doença de Parkinson (BAYANI; DIAMANDIS, 2012; DIAMANDIS *et al.*, 2000; YOUSEF; DIAMANDIS, 2001) e desempenha um papel fundamental na inflamação epidérmica na síndrome de Netherton (ZINGKOU *et al.*, 2019). A KLK3, também conhecida como PSA (Antígeno Específico da Próstata), é utilizada como biomarcador para o câncer de próstata por meio da medição de seus níveis no sangue através

de um imunoensaio. A elevação desses níveis indica a possibilidade de câncer de próstata (MCCLURE *et al.*, 2018; SZYMAŃSKA; HAINAUT, 2018). Além disso, alterações na expressão ou atividade da KLK2 também estão relacionadas ao câncer de próstata (GRABOWSKI *et al.*, 2004). A superexpressão da KLK7 em tecidos de câncer de cólon está envolvida na proliferação de células cancerosas (WALKER *et al.*, 2014). Alterações na expressão da KLK1 estão relacionadas ao tumor estromal gastrointestinal (GIST) (DOMINEK *et al.*, 2010), obstrução crítica da artéria carótida (PORCU *et al.*, 2002), ateroma e doença arterial coronariana (YAO *et al.*, 2013).

Devido ao envolvimento dessas enzimas em patologias que afetam a humanidade, é importante buscar moléculas que possam inibi-las, oferecendo tratamento ou cura para essas condições (COPELAND, 2013). Pesquisas estão sendo realizadas para sintetizar e avaliar o potencial de inibição de compostos sobre as KLKs, utilizando métodos tradicionais de ensaio de inibição em solução e estudos de *docking* molecular (DE SOUZA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2011). Logo, é de grande importância a existência de recursos que possibilitem a triagem de ligantes para as KLKs. Sendo assim, o desenvolvimento de ensaios de triagem de ligantes para essas enzimas são extremamente relevantes para identificar compostos com potencial terapêutico para as doenças causadas por suas disfunções.

Um exemplo de recurso terapêutico que tem como alvo as KLKs é a vacina Prostavac, desenvolvida para o tratamento do câncer de próstata, que é direcionada à KLK3 (PSA) e múltiplas moléculas coestimuladoras de células T (TRICOM) (MADAN *et al.*, 2009).

Devido às semelhanças estruturais dentro da família das KLKs, neste estudo, a KLK do pâncreas de porco foi utilizada como uma enzima modelo no desenvolvimento de uma ferramenta ativa, estável e aplicável na triagem de ligantes para a KLK. Essa seleção foi feita levando em consideração a maior disponibilidade e menor custo dessa enzima. Além disso, estudos indicaram que tanto a KLK humana quanto a de porco possuem a capacidade de clivar peptídeos derivados da cininogenina humana e bovina (DEL NERY *et al.*, 1999).

2 OBJETIVOS

- Investigar as condições ideais de imobilização da KLK de pâncreas de porco em MP visando a aplicação do IMER obtido na triagem de ligantes em misturas complexas, utilizando a técnica ensaio de pesca de ligantes. Monitorar os ligantes e a atividade do biorreator de forma *off-flow* por meio de metodologia LC-MS.
- Avaliar as condições de imobilização da KLK de pâncreas de porco em capilares de sílica fundida para a produção ICERs, permitindo o monitoramento *on-flow* da atividade enzimática por meio de metodologia LC-MS.

3 CONCLUSÕES

3.1 PARTE I

O IMER-KLK-MP demonstrou ser altamente ativo e estável mesmo após 11 meses de armazenamento. O biorreator exibiu uma alta estabilidade operacional, permitindo a reutilização da mesma alíquota por pelo menos 10 ciclos consecutivos de atividade. A enzima imobilizada demonstrou uma excelente estabilidade na presença de solvente orgânico, com uma recuperação de mais de 60% da atividade após incubação em 70% de metanol e 10% da atividade após incubação em 100% de metanol por 15 minutos. Além disso, os parâmetros K_{Map} e IC_{50} para leupeptina confirmaram que a enzima imobilizada manteve sua capacidade de reconhecimento do substrato e do inibidor de referência. O método LC-MS desenvolvido e qualificado mostrou-se adequado e confiável para monitorar a atividade do IMER-KLK-MP, superando os desafios de supressão iônica e contaminação da fonte ESI causados pelo substrato.

3.2 PARTE II

A aplicação do IMER-KLK-MP no ensaio de pesca de ligantes demonstrou que o biorreator é uma ferramenta útil e aplicável na busca por ligantes para a KLK ativa em matrizes complexas de origem sintética ou natural. Através dessa ferramenta foi possível identificar 6 ligantes dentre uma coleção de 38 compostos sintéticos. Além disso, a aplicação do ensaio em extratos vegetais resultou na identificação de diversos ligantes, dentre os quais estão presentes compostos com elevadas razões de afinidade.

A identificação de compostos ligantes desempenha um papel crucial na descoberta de moduladores enzimáticos. Nesse sentido, o IMER-KLK-MP mostra-se adequado para essa finalidade: dos ligantes presentes na mistura sintética, dois demonstraram ser capazes de inibir a atividade da KLK imobilizada em mais de 40%, enquanto outros dois foram capazes de aumentar a atividade da enzima. Essas descobertas são particularmente relevantes considerando-se o envolvimento das KLKs em diversas doenças, onde essas enzimas podem apresentar expressão aumentada ou diminuída, e podem até mesmo servir como biomarcadores. Portanto, a descoberta de ligantes, inibidores e ativadores para as KLKs tem o potencial de contribuir para o desenvolvimento de fármacos ou biomarcadores para o tratamento e/ou identificação dessas doenças.

3.3 PARTE III

Neste estudo, foi desenvolvido um método LC-MS eficiente para análise da atividade dos ICERs-KLK *on-flow* utilizando uma pré-coluna C18 para a separação dos produtos da catálise. A estratégia de lavagem da pré-coluna permitiu eliminar o excesso de substrato do sistema, garantindo maiores precisão e confiabilidade dos resultados. A imobilização do ICER-KLK-1U foi avaliada, resultando em um rendimento de 89%, porém, não foi observada atividade nas condições testadas. Diante disso, foram investigadas outras condições de imobilização, incluindo a presença de substrato e inibidor, mas os ICERs obtidos também não apresentaram atividade. Estudos posteriores no GCBPN podem ser conduzidos para otimizar as condições de imobilização e o ensaio de atividade dos ICERs, além de investigar as razões para a falta de atividade observada. Outras estratégias como o empacotamento do IMER-KLK-Sepharose-NHS e do IMER-KLK-MP para acoplar no sistema *on-flow* foram iniciadas.

REFERÊNCIAS

- ADALBERTO, P. R.; JOSÉ DOS SANTOS, F.; GOLFETO, C. C.; COSTA IEMMA, M. R.; FERREIRA DE SOUZA, D. H.; CASS, Q. B. Immobilization of pectinase from *Leucoagaricus gongylophorus* on magnetic particles. **The Analyst**, v. 137, n. 20, p. 4855, 2012.
- ADAMOPOULOS, P. G.; KONTOS, C. K.; SCORILAS, A. Discovery of novel transcripts of the human tissue kallikrein (KLK1) and kallikrein-related peptidase 2 (KLK2) in human cancer cells, exploiting Next-Generation Sequencing technology. **Genomics**, v. 111, n. 4, p. 642–652, jul. 2019.
- ANDREAS, D.; SEBASTIAN, W.; PETER, D. Pharmacology and Cardiovascular Implications of the Kinin-Kallikrein System. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 79, n. 4, p. 403–426, 1999.
- ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003**, 2003.
- ATTIQUE, S. A.; QURAT UL AIN; HUSSAIN, N.; BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Enzyme immobilization approaches. *Em*: **Biocatalyst Immobilization**. [s.l.] Elsevier, 2023. p. 37–54.
- AYALA, M.; TORRES, E. Enzymatic activation of alkanes: constraints and prospective. **Applied Catalysis A: General**, v. 272, n. 1–2, p. 1–13, set. 2004.
- BATTELLI, M. G.; BORTOLOTTI, M.; POLITO, L.; BOLOGNESI, A. The fundamental contribution of prof. Stirpe (and his research group) to the broadening of the scientific

perspective on xanthine oxidoreductase. **Advances in Redox Research**, v. 7, p. 100055, abr. 2023.

BAYANI, J.; DIAMANDIS, E. P. The physiology and pathobiology of human kallikrein-related peptidase 6 (KLK6). **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 50, n. 2, 1 jan. 2012.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; GATTO, G. J.; STRYER, L. Enzymes: Basic Concepts and Kinetics. *Em: Biochemistry*. 8. ed. New York, USA: W. H. Freeman, 2015. p. 215–245.

BRATTSAND, M.; STEFANSSON, K.; LUNDH, C.; HAASUM, Y.; EGELRUD, T. A Proteolytic Cascade of Kallikreins in the Stratum Corneum. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, n. 1, p. 198–203, jan. 2005.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Em: GUISAN, J. Immobilization of Enzymes and Cells*. 2. ed. Totowa: Humana Press, 2013. p. 15–31.

BUKER, S. M.; BORIACK-SJODIN, P. A.; COPELAND, R. A. Enzyme–Inhibitor Interactions and a Simple, Rapid Method for Determining Inhibition Modality. **SLAS Discovery**, v. 24, n. 5, p. 515–522, jun. 2019.

CAO, L. Introduction: Immobilized Enzymes: Past, Present and Prospects. *Em: Carrier-bound Immobilized Enzymes*. [s.l.] Wiley, 2005a. p. 1–52.

CAO, L. Adsorption-based Immobilization. *Em: Carrier-bound Immobilized Enzymes*. [s.l.] Wiley, 2005b. p. 53–168.

CAO, L. Covalent Enzyme Immobilization. *Em: Carrier-bound Immobilized Enzymes*. [s.l.] Wiley, 2005c. p. 169–316.

CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; CASS, Q. B. **Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: Uma ferramenta na busca por substâncias bioativas** *Quimica Nova* 2009.

CARMONA, F.; CONEGLIAN, F. S.; BATISTA, P. A.; ARAGON, D. C.; ANGELUCCI, M. A.; MARTINEZ, E. Z.; PEREIRA, A. M. S. *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) powdered leaves are effective in treating anxiety symptoms: A phase-2, randomized, placebo-controlled clinical trial. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 242, p. 112060, out. 2019.

CARVALHO, D. R. de. **Enzimas calicreína e ciclooxigenase imobilizadas: Estudo de condições para triagem de inibidores**. 2021. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

CARVALHO, D. R. de; FARIAS XIMENES, V.; GROppo, M.; CARDOSO, C. L. Ligand screening assay for the enzyme kallikrein immobilized on NHS-activated Sepharose. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 199, p. 114026, 30 maio 2021.

CARVALHO, D. R. De; LAURENTINO, B. B.; ROCHA, C. L.; KOOL, J.; SOMSEN, G.; AMSTALDEN VAN HOVE, E.; CARDOSO, C. L. Activity assay based on the immobilized enzyme kallikrein and mass spectrometry. **Frontiers in Analytical Science**, v. 2, 19 out. 2022.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

CHAI, P.; LAN, P.; LI, S.; YAO, D.; CHANG, C.; CAO, M.; SHEN, Y.; GE, S.; WU, J.; LEI, M.; FAN, X. Mechanistic insight into allosteric activation of human pyruvate carboxylase by acetyl-CoA. **Molecular Cell**, v. 82, n. 21, p. 4116- 4130.e6, nov. 2022.

CHEN, P.; LIU, C.; ZHANG, Z.; LI, Z.; CHEN, S.; LU, Y. Protocol for high-throughput screening of ACE2 enzymatic activators to treat COVID-19-induced metabolic complications. **STAR Protocols**, v. 3, n. 3, p. 101641, set. 2022.

CIEŚLA, Ł.; MOADDEL, R. Comparison of analytical techniques for the identification of bioactive compounds from natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 10, p. 1131–1145, 2016.

COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. Hoboken: Wiley, 2013.

CORNISH-BOWDEN, A. Inhibitors and activators. *Em: Fundamentals of Enzyme Kinetics*. [s.l.] Elsevier, 1979. p. 73–98.

COSTA-NETO, C. M.; DILLENBURG-PILLA, P.; HEINRICH, T. A.; PARREIRAS-E-SILVA, L. T.; PEREIRA, M. G. A. G.; REIS, R. I.; SOUZA, P. P. C. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 135–142, fev. 2008.

CRISTANCHO ORTIZ, C. J.; DE FREITAS SILVA, M.; PRUCCOLI, L.; FONSECA NADUR, N.; DE AZEVEDO, L. L.; KÜMMERLE, A. E.; GUEDES, I. A.; DARDENNE, L. E.; LEOMIL COELHO, L. F.; GUIMARÃES, M. J.; DA SILVA, F. M. R.; CASTRO, N.; GONTIJO, V. S.; ROJAS, V. C. T.; DE OLIVEIRA, M. K.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A.; BARBOSA, G.; LIMA, L. M.; PINHEIRO, G. B.; VERAS, L. G.; MORTARI, M. R.; TAROZZI, A.; VIEGAS, C. Design, synthesis, and biological evaluation of new thalidomide–donepezil hybrids as neuroprotective agents targeting cholinesterases and neuroinflammation. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 568–584, 2022. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=D1MD00374G>>.

DA SILVA, J. I.; DE MORAES, M. C.; VIEIRA, L. C. C.; CORRÊA, A. G.; CASS, Q. B.; CARDOSO, C. L. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 44–52, jan. 2013.

DAS, M.; CHOUDHURY, M.; SARMA, B. P. *Dillenia indica* L. *Em: Himalayan Fruits and Berries*. [s.l.] Elsevier, 2023. p. 111–123.

DE FARIA, R. A.; OLIVEIRA, P. C. O.; DE CARVALHO, M. D. P.; PEIXOTO, B. S.; SEVERINO, V. G. P.; TINOCO, L. W.; RODRIGUES, S. V.; DE MORAES, M. C. High-resolution inhibition profiling and ligand fishing for screening of nucleoside hydrolase ligands in *Moringa oleifera* Lamarck. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 211, p. 114614, mar. 2022.

DE MELO, N. C.; SÁNCHEZ-ORTIZ, B. L.; DOS SANTOS SAMPAIO, T. I.; MATIAS PEREIRA, A. C.; PINHEIRO DA SILVA NETO, F. L.; RIBEIRO DA SILVA, H.; ALVES SOARES CRUZ, R.; KEITA, H.; SOARES PEREIRA, A. M.; TAVARES CARVALHO, J. C. Anxiolytic and Antidepressant Effects of the Hydroethanolic Extract from the Leaves of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke: A Study on Zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 3, p. 106, 11 jul. 2019.

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, 15 nov. 2019.

DE MORAES, M. C.; VANZOLINI, K. L.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B. New trends in LC protein ligand screening. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 87, p. 155–66, jan. 2014.

DE SOUZA, A. S.; PACHECO, B. D. C.; PINHEIRO, S.; MURI, E. M. F.; DIAS, L. R. S.; LIMA, C. H. S.; GARRETT, R.; DE MORAES, M. B. M.; DE SOUZA, B. E. G.; PUZER, L. 3-Acyltetramic acids as a novel class of inhibitors for human kallikreins 5 and 7. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 9, p. 1094–1098, maio 2019.

DE VEER, S. J.; FURIO, L.; SWEDBERG, J. E.; MUNRO, C. A.; BRATTSAND, M.; CLEMENTS, J. A.; HOVNANIAN, A.; HARRIS, J. M. Selective Substrates and Inhibitors for Kallikrein-Related Peptidase 7 (KLK7) Shed Light on KLK Proteolytic Activity in the Stratum Corneum. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 2, p. 430–439, fev. 2017.

DEL NERY, E.; CHAGAS, J. R.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Comparison of human and porcine tissue kallikrein substrate specificities. **Immunopharmacology**, v. 45, n. 1–3, p. 151–157, dez. 1999.

DIAMANDIS, E. P.; YOUSEF, G. M.; PETRAKI, C.; SOOSAIPIILLAI, A. R. Human Kallikrein 6 as a Biomarker of Alzheimer's Disease. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 663–667, nov. 2000.

DOMINEK, P.; CAMPAGNOLO, P.; H-ZADEH, M.; KRÄNKEL, N.; CHILOSI, M.; SHARMAN, J. A.; CAPORALI, A.; MANGIALARDI, G.; SPINETTI, G.; EMANUELI, C.; PIGNATELLI, M.; MADEDDU, P. Role of human tissue kallikrein in gastrointestinal stromal tumour invasion. **British Journal of Cancer**, v. 103, n. 9, p. 1422–1431, 21 out. 2010.

DUBEY, S. Studies on HIV-1 Protease and its Inhibitors. *Em: Viral Proteases and Their Inhibitors*. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 221–261.

ESTEVEES, A. T.; JUNIOR, P. C. de O.; MARANGONI, J. A.; MARIANO DOS SANTOS, S.; MAURINO DOS SANTOS, J.; SILVA, R. M. M. F.; PEREIRA, Z. V.; FORMAGIO, A. S. N. Constituent content and allelopathic potential of eighteen extracts for the control of *Urochloa decumbens* under laboratory conditions. **South African Journal of Botany**, v. 158, p. 197–202, jul. 2023.

FEDERSEL, H.-J.; MOODY, T. S.; TAYLOR, S. J. C. Recent Trends in Enzyme Immobilization—Concepts for Expanding the Biocatalysis Toolbox. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2822, 10 maio 2021.

GANDHI, D.; MEHTA, P. *Dillenia indica* Linn. and *Dillenia pentagyna* Roxb.: Pharmacognostic, Phytochemical and Therapeutic aspects. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 134–142, 2013.

GARCIA, M. The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 825, n. 2, p. 111–123, 25 out. 2005.

GARCÍA-MORENO, M.; HAVSTEEN, B. H.; VARÓN, R.; RIX-MATZEN, H. Evaluation of the kinetic parameters of the activation of trypsinogen by trypsin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1080, n. 2, p. 143–147, out. 1991.

GAUTAM, R. L.; BHARADWAJ, A. K.; KUMAR, S.; NARAIAN, R. Microbial enzymes for the variable applications of textile industry processing. *Em: Valorization of Biomass to Bioproducts*. [s.l.] Elsevier, 2023. p. 297–321.

GRABOWSKI, A. C.; NAM, R. K.; TRACHTENBERG, J.; JEWETT, M. A. S.; NAROD, S. 1663: The Combination of the Klk2 Polymorphisms and Serum Hk2 Levels Identifies Patients with High Grade Prostate Cancer at Diagnosis. **Journal of Urology**, v. 171, n. 4S, p. 440–440, abr. 2004.

GRIPPE, T. C. Ácido acetilsalicílico: AAS, a “droga maravilhosa”. **Revista Ser Médico**, v. 74, p. 28–32, 2016.

GUIMARÃES, C. C.; OLIVEIRA, D. D.; VALDEVITE, M.; SALTORATTO, A. L. F.; PEREIRA, S. I. V.; FRANÇA, S. de C.; PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, P. S. The glycosylated flavonoids vitexin, isovitexin, and quercetrin isolated from *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) leaves protect PC12 cells against amyloid- β 25-35 peptide-induced toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 86, p. 88–94, dez. 2015.

JAIN, H. Inhibition and attenuation of pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* by leupeptin: A review. **Frontiers in Biology**, v. 12, n. 3, p. 192–198, 25 jun. 2017.

KASHUBA, E.; BAILEY, J.; ALLSUP, D.; CAWKWELL, L. The kinin–kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. **Biomarkers**, v. 18, n. 4, p. 279–296, 1 jun. 2013.

KENAKIN, T. P. Enzymes as Drug Targets. *Em: Pharmacology in Drug Discovery and Development*. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 131–156.

KENAKIN, T. P. Drug targets and drug-target molecules. *Em: A Pharmacology Primer*. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 97–149.

KERMASHA, S.; ESKIN, M. N. A. Enzymes. *Em: Enzymes*. [s.l.] Elsevier, 2021a. p. 15–44.

KERMASHA, S.; ESKIN, M. N. A. Introduction. *Em: Enzymes*. [s.l.] Elsevier, 2021b. p. 1–13.

KERMASHA, S.; GILL, J. K. Immobilization of enzymes and their use in biotechnological applications. *Em: Enzymes*. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 133–170.

KRYZA, T.; SILVA, M. L.; LOESSNER, D.; HEUZÉ-VOURC'H, N.; CLEMENTS, J. A. The kallikrein-related peptidase family: Dysregulation and functions during cancer progression. *Biochimie*, v. 122, p. 283–299, mar. 2016.

KUBOTA, K.; KUBO, T.; TANIGAWA, T.; NAITO, T.; OTSUKA, K. New platform for simple and rapid protein-based affinity reactions. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 178, 14 mar. 2017.

LAU, E. C. H. T.; YIU, H. H. P. Enzyme immobilization on magnetic nanoparticle supports for enhanced separation and recycling of catalysts. *Em: Nanomaterials for Biocatalysis*. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 301–321.

LI, Y.; CHEN, Y.; XIAO, C.; CHEN, D.; XIAO, Y.; MEI, Z. Rapid screening and identification of α -amylase inhibitors from *Garcinia xanthochymus* using enzyme-immobilized magnetic nanoparticles coupled with HPLC and MS. *Journal of Chromatography B*, v. 960, p. 166–173, jun. 2014.

LIMA, L. B. **Triagem da atividade antioxidante e anticolinesterásica de extratos naturais: seleção e estudo químico biomonitorado de *Streptomyces* sp. e de *Psychotria carthagenensis***. 2011. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

LIU, D.-M.; CHEN, J.; SHI, Y.-P. Screening of enzyme inhibitors from traditional Chinese medicine by magnetic immobilized α -glucosidase coupled with capillary electrophoresis. *Talanta*, v. 164, p. 548–555, mar. 2017.

LIU, Y.; JIANG, M.; ZHAO, Z.; WANG, N.; WANG, K.; YUAN, Y. Cyclic amplification of intracellular ROS boosts enzymatic prodrug activation for enhanced chemo-immunotherapy. *Acta Biomaterialia*, maio 2023.

LOPES, S. O.; MORENO, P. R. H.; HENRIQUES, A. T. Growth characteristics and chemical analysis of *Psychotria carthagenensis* cell suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, n. 2–4, p. 259–264, fev. 2000.

MADAN, R. A.; ARLEN, P. M.; MOHEBTASH, M.; HODGE, J. W.; GULLEY, J. L. Prostvac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, n. 7, p. 1001–1011, 24 jul. 2009.

MADENDE, M.; MADENDE, P. Application of enzymes in producing bioactive oligosaccharides and peptides for the beverage industry. *Em: Value-Addition in Beverages through Enzyme Technology*. [s.l.] Elsevier, 2023. p. 235–250.

MALIK, V.; PUNDIR, C. S. Determination of total cholesterol in serum by cholesterol esterase and cholesterol oxidase immobilized and co-immobilized on to arylamine glass. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 191–197, jun. 2002.

MARCHETTI, L.; PELLATI, F.; GRAZIOSI, R.; BRIGHENTI, V.; PINETTI, D.; BERTELLI, D. Identification and determination of bioactive phenylpropanoid glycosides of *Aloysia polystachya* (Griseb. et Moldenke) by HPLC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 166, p. 364–370, mar. 2019.

MCCLURE, T.; BASOURAKOS, S. P.; SANDHU, J. S.; SCHLEGEL, P. N.; COLT, J. J. Prostate Cancer. *Em: Encyclopedia of Endocrine Diseases*. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 784–792.

MEYER-HOFFERT, U.; WU, Z.; KANTYKA, T.; FISCHER, J.; LATENDORF, T.; HANSMANN, B.; BARTELS, J.; HE, Y.; GLÄSER, R.; SCHRÖDER, J.-M. Isolation of SPINK6 in Human Skin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 42, p. 32174–32181, out. 2010.

MOADDEL, R.; MARSZAŁŁ, M. P.; BIGHI, F.; YANG, Q.; DUAN, X.; WAINER, I. W. Automated ligand fishing using human serum albumin-coated magnetic beads. **Analytical chemistry**, v. 79, n. 14, p. 5414–7, 15 jul. 2007.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 4 mar. 2015.

MORAIS, M. G.; SALDANHA, A. A.; AZEVEDO, L. S.; MENDES, I. C.; RODRIGUES, J. P. C.; AMADO, P. A.; FARIAS, K. de S.; ZANUNCIO, V. S. S.; CASSEMIRO, N. S.; SILVA, D. B. da; SOARES, A. C.; LIMA, L. A. R. dos S. Antioxidant and anti-inflammatory effects of fractions from ripe fruits of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) and putative identification of bioactive compounds by GC-MS and LC-DAD-MS. **Food Research International**, v. 156, p. 111145, jun. 2022.

MORAIS, M. G.; SALDANHA, A. A.; COSTA RODRIGUES, J. P.; COTTA MENDES, I.; FERREIRA, L. M.; AVELAR AMADO, P.; DE SOUZA FARIAS, K.; SAMÚDIO SANTOS ZANUNCIO, V.; BRENTAN DA SILVA, D.; CARMO HORTA PINTO, F.; SOARES, A. C.; ALVES RODRIGUES DOS SANTOS LIMA, L. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanol extract of ripe fruits of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 262, p. 113125, nov. 2020.

MUKHERJEE, P. K.; HARWANSH, R. K.; BAHADUR, S.; CHANDA, J.; BISWAS, S.; BANERJEE, S. Enzyme inhibition assay for metabolic disorders—exploring leads from medicinal plants. *Em: Animal Biotechnology*. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 631–653.

MURPHY, L. R.; HILL, T. P.; PAUL, K.; TALBOTT, M.; GOLOVKO, G.; SHALTONI, H.; JEHL, D. Tenecteplase Versus Alteplase for Acute Stroke: Mortality and Bleeding Complications. *Annals of Emergency Medicine*, maio 2023.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzymes. *Em: Princípios de Bioquímica Lehninger*. 6. ed. [s.l.: s.n.]p. 189–234.

NETO, J. A. R.; PIMENTA TARÔCO, B. R.; BATISTA DOS SANTOS, H.; THOMÉ, R. G.; WOLFRAM, E.; MACIEL DE A RIBEIRO, R. I. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 260, p. 112547, out. 2020.

OLIVEIRA, J. P. C.; FREITAS, R. F.; MELO, L. S. de; BARROS, T. G.; SANTOS, J. A. N.; JULIANO, M. A.; PINHEIRO, S.; BLABER, M.; JULIANO, L.; MURI, E. M. F.; PUZER, L. Isomannide-Based Peptidomimetics as Inhibitors for Human Tissue Kallikreins 5 and 7. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 5, n. 2, p. 128–132, 13 fev. 2014.

ORTIZ, C. J. C.; DAMASIO, C. M.; PRUCCOLI, L.; NADUR, N. F.; DE AZEVEDO, L. L.; GUEDES, I. A.; DARDENNE, L. E.; KÜMMERLE, A. E.; TAROZZI, A.; VIEGAS, C. Cinnamoyl-N-Acylhydrazone-Donepezil Hybrids: Synthesis and Evaluation of Novel Multifunctional Ligands Against Neurodegenerative Diseases. *Neurochemical Research*, v. 45, n. 12, p. 3003–3020, 20 dez. 2020.

PALMER, T.; BONNER, P. L. The Structure of Proteins. *Em: Enzymes*. [s.l.] Elsevier, 2011a. p. 14–43.

PALMER, T.; BONNER, P. L. An Introduction to Enzymes. *Em: Enzymes*. [s.l.] Elsevier, 2011b. p. 2–13.

PALMER, T.; BONNER, P. L. The Significance of Sigmoidal Behaviour. *Em: Enzymes*. [s.l.] Elsevier, 2011c. p. 255–272.

PODDAR, N. K.; MAURYA, S. K.; SAXENA, V. Role of Serine Proteases and Inhibitors in Cancer. *Em: Proteases in Physiology and Pathology*. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 257–287.

PORCU, P.; EMANUELI, C.; KAPATSORIS, M.; CHAO, J.; CHAO, L.; MADEDDU, P. Reversal of Angiogenic Growth Factor Upregulation by Revascularization of Lower Limb Ischemia. *Circulation*, v. 105, n. 1, p. 67–72, jan. 2002.

PRASSAS, I.; EISSA, A.; PODA, G.; DIAMANDIS, E. P. Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, n. 3, p. 183–202, 20 mar. 2015.

PUNEKAR, N. S. Enzyme Inhibition Analyses. *Em: ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 231–236.

RIBEIRO, M. M. de S.; DOS SANTOS, L. C.; DE NOVAIS, N. S.; VIGANÓ, J.; VEGGI, P. C. An evaluative review on *Stryphnodendron adstringens* extract composition: Current and future perspectives on extraction and application. **Industrial Crops and Products**, v. 187, p. 115325, nov. 2022.

ROMERO-FERNÁNDEZ, M.; PARADISI, F. Protein immobilization technology for flow biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 55, p. 1–8, abr. 2020.

RUFER, A. C. Drug discovery for enzymes. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 4, p. 875–886, abr. 2021.

SAIKUMAR, A.; NICKHIL, C.; BADWAIK, L. S. Physicochemical characterization of elephant apple (*Dillenia indica* L.) fruit and its mass and volume modeling using computer vision. **Scientia Horticulturae**, v. 314, p. 111947, abr. 2023.

SASSOLAS, A.; HAYAT, A.; MARTY, J.-L. Enzyme Immobilization by Entrapment Within a Gel Network. *Em: [s.l: s.n.]p. 229–239.*

SCHMAIER, A. H.; MCCRAE, K. R. The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 12, p. 2323–2329, dez. 2007.

SCOTT, K. A.; ROPEK, N.; MELILLO, B.; SCHREIBER, S. L.; CRAVATT, B. F.; VINOGRADOVA, E. V. Stereochemical diversity as a source of discovery in chemical biology. **Current Research in Chemical Biology**, v. 2, p. 100028, 2022.

SEIDL, C.; VILELA, A. F. L.; LIMA, J. M.; LEME, G. M.; CARDOSO, C. L. A novel on-flow mass spectrometry-based dual enzyme assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 1072, p. 81–86, set. 2019.

SHARMA, S.; GUPTA, S.; PRINCY; ARYA, S. K.; KAUR, A. Enzyme immobilization: Implementation of nanoparticles and an insight into polystyrene as the contemporary immobilization matrix. **Process Biochemistry**, v. 120, p. 22–34, set. 2022.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 4 jun. 2007.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 27 mar. 2013.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; PANDEY, A. Microbial Enzymes—An Overview. *Em: Advances in Enzyme Technology*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 1–40.

SOBOTTKA, A. M.; TESSARO, E.; SILVA, S. M. da; PEDRON, M.; SEFFRIN, L. T. POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *Allophylus edulis* (A.

St.-Hil. et al.) Hieron. ex Niederl. AND Cupania vernalis Cambess. (SAPINDACEAE). **Revista Árvore**, v. 45, 2021.

SOMU, P.; NARAYANASAMY, S.; GOMEZ, L. A.; RAJENDRAN, S.; LEE, Y. R.; BALAKRISHNAN, D. Immobilization of enzymes for bioremediation: A future remedial and mitigating strategy. **Environmental Research**, v. 212, p. 113411, set. 2022.

SUTAY KOCABAŞ, D.; LYNE, J.; USTUNOL, Z. Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 467–475, jan. 2022.

SZYMAŃSKA, K.; HAINAUT, P. Prostate Cancer: Diagnosis and Treatment. *Em: Reference Module in Biomedical Sciences*. [s.l.] Elsevier, 2018.

TAO, Y.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; CHENG, Y. Hollow fiber based affinity selection combined with high performance liquid chromatography–mass spectroscopy for rapid screening lipase inhibitors from lotus leaf. **Analytica Chimica Acta**, v. 785, p. 75–81, jun. 2013.

TEIXEIRA, T. S. P.; FREITAS, R. F.; ABRAHÃO, O.; DEVIENNE, K. F.; DE SOUZA, L. R.; BLABER, S. I.; BLABER, M.; KONDO, M. Y.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; PUZER, L. Biological evaluation and docking studies of natural isocoumarins as inhibitors for human kallikrein 5 and 7. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 20, p. 6112–6115, out. 2011.

TRIDENTE, G. Lapatinib. *Em: Adverse Events and Oncotargeted Kinase Inhibitors*. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 243–264.

U.S. FDA. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Bioanalytical Method Validation**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://cir.nii.ac.jp/crid/1571135650822060800>>.

VANZOLINI, K. L.; VIEIRA, L. C. C.; CORRÊA, A. G.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B. Acetylcholinesterase Immobilized Capillary Reactors–Tandem Mass Spectrometry: An On-Flow Tool for Ligand Screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 2038–2044, 14 mar. 2013.

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, jan. 2019.

VILELA, A. F. L.; DOS REIS, V. E. Na.; CARDOSO, C. L. Co-Immobilized Capillary Enzyme Reactor Based on Beta-Secretase1 and Acetylcholinesterase: A Model for Dual-Ligand Screening. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 8 jul. 2021.

VILELA, A. F. L.; SEIDL, C.; LIMA, J. M.; CARDOSO, C. L. An improved immobilized enzyme reactor-mass spectrometry-based label free assay for butyrylcholinesterase ligand screening. **Analytical Biochemistry**, v. 549, p. 53–57, maio 2018.

WALKER, F.; NICOLE, P.; JALLANE, A.; SOOSAIPILLAI, A.; MOSBACH, V.; OIKONOMOPOULOU, K.; DIAMANDIS, E. P.; MAGDOLEN, V.; DARMOUL, D. Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) is a proliferative factor that is aberrantly expressed in human colon cancer. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 9, p. 1075–1086, 1 set. 2014.

WANG, H.; ZHAO, X.; WANG, S.; TAO, S.; AI, N.; WANG, Y. Fabrication of enzyme-immobilized halloysite nanotubes for affinity enrichment of lipase inhibitors from complex mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 1392, p. 20–27, maio 2015.

WANG, J.; ZHAO, Y.; PENG, R.; WANG, Y.; ZHANG, J.; ZHU, X.; KANG, H.; GUO, C.; MAO, Y.; KIM, J.; WANG, C. When enzyme meet MOFs: Emerging opportunities toward water treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 466, p. 142993, jun. 2023.

XIMENES, I. A. T.; DE OLIVEIRA, P. C. O.; WEGERMANN, C. A.; DE MORAES, M. C. **Magnetic particles for enzyme immobilization: A versatile support for ligand screening** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2021.

XU, N.; YANG, H.; CUI, M.; WAN, C.; LIU, S. High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry Ligand Fishing Assay: A Method for Screening Triplex DNA Binders from Natural Plant Extracts. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 5, p. 2562–2568, 6 mar. 2012.

YAO, Y.; FU, C.; MA, G.; FENG, Y.; SHEN, C.; WU, G.; ZHANG, X.; DING, J.; TANG, C.; CHEN, Z.; DAI, Q.; TONG, J.; LUO, D.; ZHU, J.; ZHI, H.; LI, Y.; JU, C.; LU, J.; CHAO, J.; CHAO, L. Tissue kallikrein is related to the severity of coronary artery disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 423, p. 90–98, ago. 2013.

YOUSEF, G. M.; DIAMANDIS, E. P. The New Human Tissue Kallikrein Gene Family: Structure, Function, and Association to Disease*. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 184–204, 1 abr. 2001.

YUAN, Y.-C.; BAI, X.-L.; LIU, Y.-M.; TANG, X.-Y.; YUAN, H.; LIAO, X. Ligand fishing based on cell surface display of enzymes for inhibitor screening. **Analytica Chimica Acta**, v. 1156, p. 338359, abr. 2021.

ZDARTA, J.; MEYER, A.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 92, 24 fev. 2018.

ZHANG, F.; JIANG, Y.; JIAO, P.; LI, S.; TANG, C. Ligand fishing via a monolithic column coated with white blood cell membranes: A useful technique for screening active compounds in *Astractylodes lancea*. **Journal of Chromatography A**, v. 1656, p. 462544, out. 2021.

ZHANG, Y.; SHI, S.; CHEN, X.; PENG, M. Functionalized magnetic nanoparticles coupled with mass spectrometry for screening and identification of cyclooxygenase-1 inhibitors from natural products. **Journal of Chromatography B**, v. 960, p. 126–132, jun. 2014.

ZHANG, Y.; WANG, Q.; LIU, R.; ZHOU, H.; CROMMEN, J.; MOADDEL, R.; JIANG, Z.; ZHANG, T. 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, maio 2019.

ZHUO, R.; LIU, H.; LIU, N.; WANG, Y. Ligand Fishing: A Remarkable Strategy for Discovering Bioactive Compounds from Complex Mixture of Natural Products. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1516, 11 nov. 2016.

ZINGKOU, E.; PAMPALAKIS, G.; CHARLA, E.; NAUROY, P.; KIRITSI, D.; SOTIROPOULOU, G. A proinflammatory role of KLK6 protease in Netherton syndrome. **Journal of Dermatological Science**, v. 95, n. 1, p. 28–35, jul. 2019.