

**Helton José Wiggers**

**Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-  
fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* por  
biocalorimetria**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto  
de Química de São Carlos para a obtenção do  
título de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

São Carlos

2007

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a:

Meus pais Arni José Wiggers e Santina da Silva Wiggers por proverem todas as condições à minha formação pessoal e profissional, sempre incentivando e aconselhando nas decisões mais difíceis.

Juliana Cheleski, companheira incondicional em todos os momentos.

Meus irmãos Ivonei, Helder Ivan e Heliton Augusto Wiggers mais que irmãos, verdadeiros amigos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos A. Montanari, pela orientação, amizade e as várias horas que dedicou até mesmo nas madrugadas, para a realização do trabalho;

A Juliana Cheleski, além do amor, amizade e companheirismo; participou ativamente na elaboração do trabalho;

À Dra. Maria Luiza Montanari pela amizade, incentivo e lanches maravilhosos;

A Prof. Dr. Maria Goretti Vasconcelos da Silva, pelas valiosas sugestões e trabalhos realizados conjuntamente;

Aos professores que gentilmente cederam as substâncias para os testes de inibição;

Aos amigos da República: Glauco A. Roloff, Marins Danczuk e Sidney Xavier (Puff);

Ao Prof. Adriano Andricopulo, IFSC/USP;

Ao Josmar R. da Rocha e Rosa Adriane Pauluk, pela amizade e companheirismo;

Aos companheiros do Grupo de Estudos em Química Medicinal: Adriana, Renato, Igor, Nathalia (Tata), José Alexandre, Fábio e demais colegas do IQSC.

Ao CNPQ pela bolsa concedida;

A todos meus amigos de Laranjeiras do Sul.

Deus, que concedeu a sabedoria e a motivação para mais essa etapa da vida.

E toda minha família.

“Só Sei Que Nada Sei”.

Sócrates

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação Gráfica da curva típica de Michaelis-Menten .....	8
Figura 2. Representação gráfica da equação de Michaelis-Menten: velocidade versus concentração do substrato. Na presença (vermelho) e ausência de inibidor competitivo (azul) .....	12
Figura 3. Representação gráfica da equação de uma curva de velocidade versus concentração do substrato. Na presença (vermelho) e ausência (azul) de inibidor reversível não competitivo .....	13
Figura 4. Representação gráfica da equação de velocidade versus concentração do substrato, na presença (vermelho) e ausência (azul) de inibidor incompetitivo .....	14
Figura 5. Representação das estruturas químicas do Nifurtimox e Benzonidazol.....	16
Figura 6. Representação esquemática da reação catalisada pela enzima GAPDH..	17
Figura 7. Representação da estrutura cristalográfica da enzima GAPDH (1DBV) ...	18
Figura 8. Representação esquemática da via glicolítica .....	18
Figura 9. (A) Esquema representativo da seringa e célula de amostra de um microcalorímetro e (B) isoterma típica de um ensaio de interação entre ligante e uma macromolécula (acima, dados originais não processados; abaixo, dados processados). Adaptada da referência .....	20
Figura 10. Representação esquemática do conceito de “assinatura termodinâmica”. (A) elevado número de ligações hidrogênio e perda de entropia, (B) interação predominada por interações hidrofóbicas, (C) pequena contribuição de ligações hidrogênio e contribuições hidrofóbicas.....	23
Figura 11. Representação gráfica da determinação da velocidade de reação através do método das injeções múltiplas. Figura adaptada da referência 53 .....	27
Figura 12. Determinação da velocidade de reação através do método da injeção simples. Figura adaptada da referência 53 .....	28
Figura 13. Representação gráfica da (A) determinação da entalpia aparente da reação de conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato catalisado pela enzima GAPDH e (B) determinação do calor de diluição da enzima GAPDH na solução de reação.....	43
Figura 14. (A) Diluição endotérmica do G3P na solução tampão de ensaio cinético e (B) diluição exotérmica do tampão no tampão de ensaio cinético .....	45

- Figura 15. Gráfico representativo do ensaio cinético da enzima GAPDH, a concentração do G3P preenchido na seringa foi 0,6 mM, a concentração da enzima foi de 10 nM, o intervalo entre as injeções 120 s., a temperatura de 25 °C.....46
- Figura 16. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten. A concentração do G3P preenchido na seringa foi de 3,0 mM, a concentração da enzima foi de 10 nM, o intervalo entre as injeções 120 s., a temperatura de 25 °C.....47
- Figura 17. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten. A concentração de G3P preenchido na seringa foi 3,0 mM, a concentração da enzima 10 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C.....48
- Figura 18. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten. A concentração de G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 10 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C.....48
- Figura 19. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH para a verificação da inibição da reação pelo produto. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten.....50
- Figura 20. (A) Determinação da entalpia aparente da reação de conversão do gliceraldeído-3-fosfato a 1-arseno-3-fosfoglicerato catalisado pela enzima GAPDH na ausência (controle) e na presença de 2,5, 5,0, 7,5 e 10% v/v de DMSO e (B) determinação do calor de diluição da enzima nas soluções correspondentes .....54
- Figura 21. Relação linear de  $\Delta H_{app}$  versus a concentração de DMSO .....55
- Figura 22. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH sem adição de co-solvente (controle). (B) Dados experimentais da velocidade ajustados a equação de Michaelis-Menten. A concentração de G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 5,0 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C .....56

- Figura 23. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH com a adição de 2,5 % v/v de DMSO. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados a equação de Michaelis-Menten. A concentração do G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 5,0 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C .....57
- Figura 24. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH com a adição de 5,0 % v/v de DMSO. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten. A concentração do G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 5,0 nM, o intervalo entre injeções de 60 s e a temperatura 25 °C .....58
- Figura 25. Representação das estruturas químicas do G3P e DMSO .....58
- Figura 26. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH com a adição de 7,5 % v/v de DMSO. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados a equação de Michaelis-Menten. A concentração do G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 5,0 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C .....59
- Figura 27. Curva da eficiência catalítica da enzima GAPDH versus concentração de DMSO .....60
- Figura 28. (A) Determinação da entalpia aparente da reação de conversão do gliceraldeído-3-fosfato a 1-arseno-3-fosfoglicerato catalisado pela enzima GAPDH ausência de co-solvente (controle) e na presença de 2,5, 5,0, 7,5 e 10% v/v de Metanol e (B) determinação do calor de diluição nas soluções correspondentes .....61
- Figura 29. Relação linear da entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ) versus a concentração de metanol .....62
- Figura 30. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH com a adição de 2,5 % v/v de Metanol. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten. A concentração do G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 5 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C. ....63
- Figura 31. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH com a adição de 5,0 % v/v de metanol. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados a equação de Michaelis-Menten. A concentração do G3P

preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 5,0 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C .....	64
Figura 32. Curva da eficiência catalítica da enzima GAPDH versus concentração de metanol .....	65
Figura 33. Experimentos controles realizados nas mesmas condições para a avaliação do erro experimental. Os dados experimentais foram ajustados graficamente na curva de Michaelis-Menten e as constantes foram calculadas por ajuste não-linear .....	67
Figura 34. Representação das estruturas químicas dos compostos testados contra a enzima GAPDH por ITC.....	70
Figura 35. Teste de inibição da enzima GAPDH com Marcianina (50µM). A curva em preto representa o experimento controle e o vermelho o de inibição. Os dados obtidos experimentalmente para a velocidade foram ajustados à equação de Michaelis-Menten .....	71
Figura 36. Curvas de Michaelis-Menten dos ensaios de inibição. As curvas controle de cada experimento são apresentadas junto com as curvas de inibição. A concentração dos inibidores foi mantida em 50 µM. Todos foram adicionados à cela de amostra junto à enzima .....	73



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores experimentais e teóricos da entalpia de diluição do propanol .....	33
Tabela 2. Valores de entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ) da reação de conversão do G3P a 1- 1-arseno-3-fosfoglicerato catalisado pela enzima GAPDH em diferentes concentrações de DMSO .....	54
Tabela 3. Valores de entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ) da reação de conversão do G3P a 1- arseno-3-fosfoglicerato catalisado pela enzima GAPDH em diferentes concentrações de metanol .....	61
Tabela 4. Valores das constantes de Michalis-Menten para três experimentos controle utilizados para a estimativa do erro experimental .....	67
Tabela 5. Valores da análise estatística das constantes e Michaelis- Mentendeterminadas nos ensaios cinéticos .....	68
Tabela 6. Experimento comparativo de inibição da enzima GAPDH realizado em dias diferentes. O inibidor utilizado foi a marcianina. O período de tempo entre os ensaios foi de 4 dias .....	72
Tabela 7. Valores da constante de inibição ( $K_i$ ) para os compostos testados contra a enzima GAPDH de <i>T. cruzi</i> .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

**ATP** - Adenosina tri-fosfato

**ADME** - Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

**CV** - Coeficiente de variância

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DNA** - Ácido desoxirribonucléico

**D.O<sub>600nm</sub>** - Densidade óptica

**DTT** - Ditioneitol

**ΔG** - Variação da energia livre de Gibbs

**ΔS** - Variação de entropia

**ΔC<sub>p</sub>** - Variação da capacidade calorífica

**ΔQ** - Variação da troca de calor

**ΔH** - Variação da entalpia aparente de interação

**[ΔL]** - Variação na concentração do ligante

**ΔH<sub>app</sub>** - Variação da entalpia aparente de reação

**E** - Enzima

**[E<sub>0</sub>]** - Concentração total de enzima

**E.C.** - Comissão de nomenclatura de enzimas (Enzyme Commission)

***E. Coli*** - Bactéria *Escherichia coli*

**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EP** - Erro padrão

**EI** - Enzima-inibidor

**EIS** - Enzima-inibidor-substrato

**ES** - Enzima-substrato

**GAPDH** - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

**G3P** - D,L-gliceraldeído-3-fosfato

$h_x$  e  $h_{xx}$  – coeficientes viriais de interação

**ITC** - Titulação calorimétrica isotérmica

**IPTG** - Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosido

**IC<sub>50</sub>** - Concentração de inibidor necessária pra inibir 50% da atividade enzimática

$k_{cat}$  - número de moléculas do substrato que cada sítio enzimático transforma em produto por unidade de tempo

$K_M$  - Constante de Michaelis-Menten

$K_i$  - Constante de inibição

$k_a$  - Constante de associação entre o fármaco e o receptor

$K_d$  - Constante de dissociação entre o fármaco e o receptor

$k_1$  - Constante de associação entre a enzima e o substrato

$k_{-1}$  - Constante de dissociação entre a enzima e o substrato

$k_2$  - Constante de formação do produto

**LB Broth** - Nome comercial do reagente usado para meios de cultura de bactérias

**NAD<sup>+</sup>** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (na forma oxidada)

**NADH** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (na forma reduzida)

**NaHAsO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O** - Arseniato de sódio hepta-hidratado

***T. Cruzi*** - *Trypanosoma cruzi*

**TEA-HCl** - Trietanolamina hidrocloreídrico

**n** - Número de moles

**P** - Produto

**PDB** - *Protein Data Bank* (Banco de Dados de Proteínas)

**Q<sub>d</sub>** - Calor de diluição da enzima

**$Q_r$**  - Calor de reação

**QSAR** - Relações quantitativas entre estrutura química e atividade farmacológica

**Rpm** - Rotações por minuto

**S** - Substrato

**s** - Desvio padrão

**SDS-PAGE** - Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

**SIM** - Método Calorimétrico de Injeção Simples

**$v_{max}$**  - Velocidade máxima

**v/v** - Proporção volume/volume da mistura de dois componentes da solução

**v** - Velocidade da reação

**$V_o$**  - Volume da cela de amostra do calorímetro

**$\bar{x}$**  - Valores médios das medidas

**WHO** - Organização Mundial da Saúde

## RESUMO

A identificação de compostos bioativos que atuem em proteínas é imprescindível no conceito atual da Química Medicinal. Quase todos os processos biossintéticos dos organismos vivos são regulados por enzimas. Dentro deste contexto a enzima glicossomal Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase (GAPDH) do *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico causador da Doença de Chagas) tem-se mostrado um alvo promissor para o planejamento de inibidores contra o parasito.

A Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) é uma ferramenta robusta na identificação e otimização de compostos bioativos. Através da ITC podem-se determinar parâmetros cinéticos da atividade enzimática ( $k_{cat}$ ,  $K_M$  e  $K_i$ ) e parâmetros termodinâmicos de interação ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$  e  $\Delta S$ ) entre o alvo biomacromolecular e o composto bioativo.

Neste trabalho desenvolveu-se um protocolo de ensaio cinético para a enzima GAPDH através da ITC, visando à identificação de novos compostos tripanossomicidas. A atividade da enzima foi avaliada na presença de diferentes concentrações (0 a 10 % v/v) de dois solventes orgânicos padrões (dimetilsulfóxido e metanol). Esses solventes são utilizados em bioensaios e também para aumentar a solubilidade de substâncias em água. A concentração de 5 % v/v de ambos solventes orgânicos foi determinada como aquela em que a GAPDH manteve-se estável. Houve um aumento significativo da atividade enzimática em relação aos experimentos sem uso de co-solventes.

Através do ensaio padronizado foram testados os seguintes compostos frente à GAPDH: ácido 4-butilfenil-amino-metileno-fosfônico, mangiferina, quercetina-3-O- $\beta$ -L-arabinopiranosídeo, caempferol-3-O- $\alpha$ -D-(6-O-p-coumaroyl) glucosídeo e marcianina. As constantes de inibição ( $K_i$ ) dessas substâncias apresentam-se no intervalo de 20,1 ( $\pm 1,7$ ) a 27,3 ( $\pm 2,5$ )  $\mu\text{M}$ . Uma nova classe de pequenas moléculas de origem em produtos naturais e denominada xantonas foi identificada com potencial atividade tripanossomicida.

## ABSTRACT

The identification of new bioactive chemical samples that act on proteins is essential in modern Medicinal Chemistry. Enzymes regulate almost all-biosynthetic processes in the life of an organism. The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas' disease. Its glycosomal Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase enzyme (GAPDH) is regarded as a promising target for the structure-based discovery and development of new antiparasitic drugs.

The Isothermal Titration Calorimetry (ITC) is a powerful tool in the discovery and optimization of new bioactive substances. The use of ultrasensitive calorimetry for the life sciences via isothermal titration calorimetry provides a new paradigm in the drug discovery area. It greatly improves the chances of producing a probe molecule that binds to the target enzyme. Kinetics ( $k_{cat}$ ,  $K_M$  and  $K_i$ ) and thermodynamics parameters ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$  and  $\Delta S$ ) can be determined by measuring the interactions between the target enzyme and bioactive chemical substances.

In this work, a protocol for a kinetic enzyme assay was developed to study the activity of *T. cruzi* GAPDH using ITC. The enzyme activity in the presence of different standard co-solvent concentrations (0-10 % v/v), used in bioassays, was evaluated. The concentration of 5 % v/v for both co-solvents was chosen for standardized condition. This was elected so due to a great increase in the enzyme activity when compared to the experiments with no co-solvent added.

Using the standardized enzyme assay protocol the following chemical substances were tested against the *T. cruzi* GAPDH: 4-butylphenyl-amine-methylene-phosphonic acid, quercetin-3-O- $\beta$ -L-arabinopyranoside, mangiferin, kaempferol-3-O- $\alpha$ -D-(6-O-p-coumaroyl) glucoside and martianine. The inhibition constants ( $K_i$ ) were measured for these substances and their values are in the range of 20,1 ( $\pm 1,7$ ) and 27,3 ( $\pm 2,5$ )  $\mu$ M. A natural product molecular class named xantone was identified as a new potential trypanocide agent.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Receptores Enzimáticos .....	2
1.1 Mecanismo Cinético de Catálise Enzimática .....	5
1.2 Inibição Enzimática .....	9
1.2.1 Tipos de Inibidores .....	10
1.2.1.1 Inibição reversível competitiva .....	11
1.2.1.2 Inibição reversível não competitiva .....	12
1.2.1.3 Inibição reversível incompetitiva .....	13
1.3 A Doença de Chagas e o Alvo Enzimático .....	15
1.4 Determinação de parâmetros termodinâmicos e cinéticos da interação enzima- ligante através da titulação calorimétrica isotérmica (ITC) .....	19
1.5 Determinação da cinética enzimática por ITC .....	24
1.5.1 Métodos das Injeções Múltiplas e Simples .....	26
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1 Objetivos Gerais .....	30
2.2 Objetivos Específicos .....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS</b> .....	<b>31</b>
3.1 Materiais .....	31
3.2 Calibração do Calorímetro .....	33
3.4 Determinação da entalpia aparente da reação de conversão de G3P para 1- arseno-3-fosfoglicerato .....	35
3.5 Desenvolvimento do protocolo de ensaio cinético da enzima GAPDH feito por ITC .....	36
3.5.1 Determinação do calor de diluição do G3P na solução tampão e o calor de mistura do tampão .....	36
3.5.2 Ensaios cinéticos da enzima GAPDH .....	37

3.6 Verificação da inibição da reação catalisada pela enzima GAPDH pelo produto de reação.....	38
3.7 Determinação do comportamento da enzima frente à adição de co-solventes	39
3.7.1 Determinação da $\Delta H_{app}$ na presença de diferentes concentrações de DMSO e Metanol.....	39
3.7.2 Ensaios cinéticos da enzima GAPDH na presença de diferentes concentrações de DMSO e Metanol .....	40
3.8 Ensaios de Inibição Enzimática .....	40
3.9 Análise dos Dados.....	41
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>43</b>
4.1 Determinação da entalpia aparente da reação de conversão de G3P para 1-arseno-3-fosfoglicerato .....	43
4.2 Desenvolvimento do protocolo de ensaio cinético da enzima GAPDH feito por ITC.....	44
4.3 Verificação da inibição da reação catalisada pela enzima GAPDH pelo produto de reação.....	50
4.4 Determinação do comportamento da enzima frente à adição de co-solventes	52
4.4.1 Determinação do comportamento da enzima frente à adição de Dimetilsulfóxido .....	52
4.4.2 Determinação do comportamento da enzima frente à adição de Metanol	61
4.5 Determinação do Erro Experimental.....	67
4.6 Ensaios de Inibição Enzimática .....	69
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>



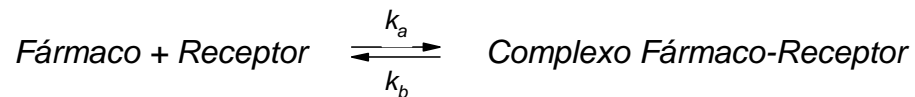
## 1 INTRODUÇÃO

A química medicinal é uma ciência que engloba inovação; descoberta e desenvolvimento de novas substâncias químicas bioativas (NCE); síntese ou modificação molecular; extração, isolamento, identificação e elucidação estrutural de princípios ativos naturais de plantas, animais ou minerais; descrição das moléculas desde a sua constituição atômica (passando por relações estrutura-propriedade, SPR) até suas características estruturais quando da(s) interação(ões) com alvos biológicos de interesse terapêutico; compreensão, a nível molecular, de processos bioquímicos, toxicológicos e farmacocinéticos e a geração de relações estrutura química-atividade farmacológica (SAR). A química medicinal é, portanto, uma disciplina híbrida operando conjuntamente com outras especialidades dentro dos aspectos trans- (sobre a inserção de um conceito em outro), multi- (sobre a coexistência de múltiplos) e interdisciplinar (sobre a necessidade de interfaces), onde todas as partes são igualmente fundamentais<sup>1,2</sup>. A química medicinal<sup>3</sup> é a ciência principal na descoberta e desenvolvimento de substâncias químicas bioativas. A interação de substâncias químicas com alvos biológicos pode resultar em um fenômeno de ação-perturbação do sistema biológico escolhido. A sua descrição de forma qualitativa é então realizada e as classes de compostos são identificadas com atividade terapêutica de interesse.<sup>4</sup>

As interações entre fármacos e seus receptores são denominados de efeitos farmacodinâmicos, enquanto os fenômenos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), são denominados efeitos farmacocinéticos.

Para a compreensão de mecanismos de ação de fármacos é necessário entender as forças de interação entre eles e seus receptores.<sup>5</sup>

As forças de interação fármaco-receptor podem ser consideradas de baixa energia e dependem das concentrações de ambos. No esquema ilustrativo abaixo,  $k_a$  e  $k_d$ , são as constantes de associação e dissociação, respectivamente, do complexo fármaco receptor.



$$K_d = \frac{[\text{Fármaco}][\text{Receptor}]}{[\text{Complexo.Fármaco-Receptor}]} \quad \text{Equação 1}$$

A equação 1 mostra que a constante de dissociação é inversamente proporcional a concentração do complexo Fármaco-Receptor, ou seja, quanto menor o valor de  $K_d$  maior a formação do complexo. A atividade farmacológica está relacionada com a afinidade entre o fármaco e o receptor, e também com a estabilidade do complexo formado.

As forças de interação que podem estar envolvidas no complexo Fármaco-Receptor são: interações iônicas, íon-dipolo, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas.<sup>6,7</sup>

### 1.1 Receptores Enzimáticos

Os receptores discutidos anteriormente podem ser proteínas de membrana, receptores hormonais, ácido desoxirribonucléico (DNA), enzimas, etc. As enzimas são um tipo especial de receptor; são proteínas especializadas em catalisar reações químicas, ou seja, aumentam a velocidade de uma reação química sem interferir no

processo. Elas estão associadas a biomoléculas, devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico.<sup>8</sup>

Para o entendimento sobre a estrutura de uma enzima e como esta funciona, devemos considerá-la tanto como uma proteína quanto um catalisador biológico.

Como uma proteína a enzima é constituída por aminoácidos. As ligações peptídicas que unem cadeias lineares de aminoácidos caracterizam a estrutura primária das proteínas, apresentam uma forma enovelada, evidenciando estruturas complicadas, conhecidas como estrutura secundária, terciária e quaternária, que ocorrem em função de interações intrínsecas entre as cadeias de aminoácidos.

A estrutura secundária de uma proteína é caracterizada pela formação de alfa hélices e folhas beta, conformações resultantes das interações acima mencionadas. Somente esta estrutura adicional explica como uma proteína pode ser tão compacta.

Na estrutura terciária, a proteína está enrolada de uma maneira complexa e irregular, formando um prisma compacto, triangular e, às vezes, achatado. Nesta conformação quase todos os resíduos de aminoácidos polares estão na superfície, enquanto que quase todos os resíduos de aminoácidos não polares estão orientados para o interior da molécula. Conseqüentemente, os resíduos hidrofílicos estão expostos ao solvente, água, enquanto os resíduos lipofílicos estão afastados da água o quanto possível. Um número grande de diferentes interações/ligações está envolvido na estabilização desta conformação terciária. Estas incluem interações eletrostáticas, ligações hidrogênio, interações lipofílicas, dipolares e ligações dissulfeto.

Muitas enzimas são compostas de uma cadeia polipeptídica simples. Este é o caso de enzimas como a ribonuclease, lisosima, tripsina, pepsina e algumas alfas-

amilase. Por outro lado, existe um grande número de enzimas compostas por mais de uma cadeia peptídica. A enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase é composta por quatro cadeias polipeptídicas. A repetição das cadeias polipeptídicas na construção de uma macromolécula de proteína caracteriza a estruturação quaternária que esta pode assumir.<sup>8,9</sup>

O princípio das enzimas como um catalisador é diminuir a energia de ativação de uma reação. Uma enzima que possui massa molecular variando de milhares a milhões de Daltons (Da) é capaz de catalisar reações de pequenas moléculas. O substrato se liga a uma região específica da enzima denominada sítio de ligação ou sítio ativo, que corresponde a uma pequena região, composta por apenas alguns resíduos de aminoácido.

Para alguns tipos de processos biológicos, apenas a cadeia protéica não é suficiente, por isso a proteína requer uma molécula denominada cofator o qual pode ser uma molécula orgânica (coenzima) ou um íon metálico.

O complexo enzima-cofator, é denominado holoenzima. Quando o cofator é removido, mantém-se a proteína, que é catabolicamente inativa e é denominada apoenzima. As coenzimas apresentam uma função química particular; algumas são, por exemplo, agentes oxirredutores, outras transferidoras etc.

Para a realização de uma análise quantitativa com o sistema enzimático é importante conhecer: a estequiometria da reação catalítica; se a enzima requer adição de cofatores; a dependência da enzima sob a concentração do cofator ou substrato; pH ótimo de catálise e a temperatura pela qual a enzima é estável e apresenta uma elevada atividade.

Durante uma catálise, uma coenzima tem a capacidade de, através de oxirreduções, ser reutilizada por outra enzima, voltando novamente ao ciclo metabólico.

Por exemplo, o  $\text{NAD}^+$  após a oxidação do substrato, passa a  $\text{NADH}$ , ativa a reação, deixa a enzima e novamente será oxidada por um sistema receptor de elétrons, voltando a ser  $\text{NAD}^+$  e assim podendo se ligar a outra enzima.

Muitas coenzimas estão fortemente relacionadas com vitaminas. As vitaminas são moléculas orgânicas essenciais para o processo biológico em organismos superiores e não podem ser sintetizados por eles mesmos.<sup>10</sup>

### **1.1 Mecanismo Cinético de Catálise Enzimática**

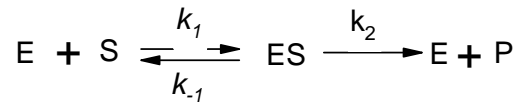
Em 1894 Emil Fischer propôs o modelo chave – fechadura para explicar a ação enzimática, um modelo em que a estrutura da enzima e do substrato são rígidas. A enzima se encaixa com o substrato específico no sítio ativo, como uma chave e fechadura.<sup>11</sup>

Já no modelo proposto por Koshland<sup>12</sup> em 1958, tanto a enzima quanto o substrato passam por mudanças de conformação para propiciar o encaixe. A enzima não aceita simplesmente o substrato, o substrato é distorcido para conformação exata do estado de transição, denominado encaixe flexível.

A enzima também encontra o lado específico da cadeia posicionando no lugar exato da ligação no processo catalítico, muitas vezes o lado da cadeia pode ser básico ou ácido promovendo a adição ou remoção de prótons. Em outras circunstâncias a enzima se agrupa a um íon metálico na posição correta para a ocorrência da catálise.

Ao completar a reação catalítica a enzima libera o produto e retorna a forma original. O processo ocorre em duas etapas, a primeira reversível e a outra

irreversível, a formação do produto ( $P$ ) a partir de um único substrato ( $S$ ), na presença da enzima ( $E$ ) forma o complexo de enzima-substrato ( $ES$ )<sup>8</sup>:



Os termos  $k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_2$  são as constantes, para a associação da enzima com o substrato, sua dissociação e a formação do produto.

Este estudo é muito útil para a compreensão do mecanismo da atividade catalítica que cada enzima segue no processo metabólico, de como sua atividade é controlada na célula e a atuação dos medicamentos moduladores da atividade enzimática.

A velocidade da reação ( $v$ ) é limitada pela etapa de conversão do complexo  $[ES]$  em  $P$ , e esta dependerá da concentração da enzima que interage com o substrato<sup>9</sup>. Assim:

$$v = k_2[ES] \quad \text{Equação 2}$$

onde,  $k_2$  é denominado  $k_{cat}$ <sup>8</sup> quando a enzima encontra-se saturada, sob condições de estado estacionário e a reação atinge a velocidade máxima ( $v_{max}$ ).

Com um excesso de substrato, tem-se  $[S] \gg [E]$ , estando o sistema no estado estacionário. O complexo  $[ES]$  está em equilíbrio com  $[E]$  e  $[S]$ , assim a  $[ES]$  é constante. A formação do complexo  $[ES]$  dependerá da constante  $k_1$  e da disponibilidade da enzima e do substrato.

A dissociação do complexo  $[ES]$  pode ocorrer de duas maneiras, seja pela formação do produto ou pela não reatividade do substrato pela enzima. Assim, o estado estacionário pode ser escrito:

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad \text{Equação 3}$$

Dividindo ambos os lados por  $(k_{-1} + k_2)$ :

$$\frac{k_1[E][S]}{(k_{-1} + k_2)} = [ES] \quad \text{Equação 4}$$

A partir da Equação 4 obtém-se a constante de Michaelis Mentem ( $K_M$ ), que pode ser usado para descrever a afinidade da enzima pelo substrato. Quanto menor o valor de  $K_M$ , maior a afinidade da enzima pelo substrato<sup>10</sup>.

$$\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} = K_M \quad \text{Equação 5}$$

Sendo:  $v_{\max} = k_2[E_0]$

$$[E_0] = [E] + [ES]$$

onde  $[E_0]$  é a concentração total de enzima,  $[E]$  a concentração de enzima livre,  $[ES]$  a enzima na forma complexada e a velocidade máxima ( $v_{\max}$ ).

Rearranjando as equações 2, 3, 4 e 5 chega-se em:

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equação 6}$$

### **Equação de Michaelis-Menten**

A equação de Michelis-Menten fornece uma curva típica apresentada na Figura 1.

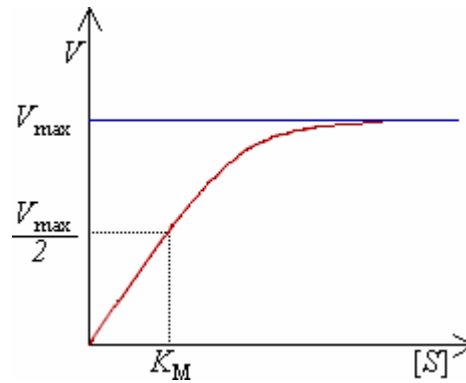


Figura 1. Representação Gráfica da curva típica de Michaelis-Menten

Na determinação da velocidade máxima da catálise enzimática, a concentração do substrato tende a aumentar, segundo uma cinética de primeira ordem, até se atingir uma taxa constante da velocidade (ordem zero). A observação deste comportamento foi feita pela primeira vez por Leonor Michaelis e Maud Menten (1913).<sup>13</sup>

A velocidade máxima de atividade da enzima é obtida quando seu sítio ativo está saturado pelo substrato. Há outros fatores que influenciam na velocidade da reação, como por exemplo, o pH e a temperatura.<sup>8,14</sup>



## 1.2 Inibição Enzimática

Muitas doenças ou os sintomas das doenças são causados pela deficiência ou pelo excesso de um metabólito específico no organismo, devido à infecção por um organismo estranho ou pelo crescimento de células mutantes. Se os metabólitos forem normalizados, então o organismo estranho ou as células mutantes podem ser destruídos e a doença pode ser tratada. Esses problemas podem ser resolvidos pela inibição de uma enzima específica. Qualquer composto que diminua ou bloqueie a catálise de uma enzima é chamado de inibidor enzimático.

Quando uma enzima é inibida, o substrato é acumulado, e os produtos metabólicos não são gerados (a menos que haja outra enzima capaz de catalisar a mesma reação, ou que haja outras rotas metabólicas para os mesmos produtos). Isso tem importantes implicações para o planejamento de fármacos. Se uma célula tem uma deficiência de um substrato para a enzima alvo, e essa deficiência resulta em um estado doente para a célula, então a inibição dessa enzima pode impedir a degradação desse substrato aumentando sua concentração.<sup>2</sup>

Um exemplo é a inibição da enzima xantina oxidase, que catalisa a conversão de xantina em ácido úrico. A inibição dessa enzima diminui a concentração de ácido úrico no organismo resultando em um efeito anti-hiperuricêmico.<sup>15,16</sup>

Embora vários fármacos exerçam suas ações terapêuticas inibindo enzimas específicas, os mecanismos de ação da maioria destes foram determinados após a descoberta de suas propriedades terapêuticas. Caminho inverso ao da Química Medicinal, que busca planejar moléculas com ações terapêuticas pré-definidas.

De todas as proteínas alvos para uso terapêutico incluindo hormônios, neurotransmissores e proteínas de membrana, as enzimas são as mais promissoras

para o planejamento de fármacos. O processo de obtenção de enzimas é bem descrito. Uma solução homogênea de enzima pode ser obtida para finalidades previamente selecionadas, e em alguns casos, pode ser usada para a elucidação do sítio ativo da estrutura, o qual é usado para métodos computacionais de planejamento de fármacos.

Além disso, um inibidor enzimático pode possuir uma estrutura química similar à estrutura do substrato ou do produto da enzima alvo; desta forma, a escolha da enzima alvo prontamente disponibiliza um direcionamento na busca dos inibidores.<sup>2,17</sup>

### 1.2.1 Tipos de Inibidores

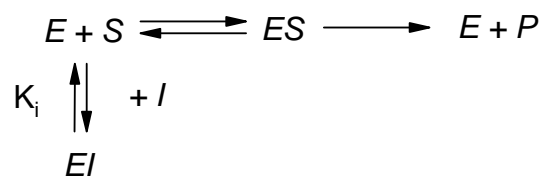
Muitos tipos de moléculas inibem as enzimas e interagem de forma diferente com o alvo biomacromolecular. A principal distinção entre os inibidores é o mecanismo de inibição, reversível e irreversível.

A forma de interação entre alvo e ligante que envolve interações não-covalentes é dita reversível e pode ser classificada como inibição reversível competitiva, não competitiva e incompetitiva. Na inibição irreversível há a formação de ligações químicas entre o alvo e o ligante (ligações covalentes).<sup>18</sup>

### 1.2.1.1 Inibição reversível competitiva

Existem várias formas de inibição não-covalente, entre estas está a inibição reversível competitiva. Os mecanismos de inibição se diferenciam quanto ao mecanismo de catálise, diminuem a atividade enzimática e conseqüentemente modificam a cinética de reação.

Na inibição reversível competitiva a molécula de inibidor pode apresentar estrutura semelhante ao substrato da enzima. Embora o inibidor ocupe o sítio ativo da enzima, o processo catalítico não é estabelecido. Neste caso, o inibidor compete com o substrato pelo mesmo sítio ativo. Em estado o sítio ativo ocupado pelo inibidor, o substrato deixa de ocupar o mesmo sítio e então o processo catalítico de conversão em produto não se realiza. Portanto, na inibição reversível competitiva, o inibidor compete pelo mesmo sítio catalítico do substrato, como no esquema abaixo:



E a equação de Michaelis-Menten, na presença de inibidor competitivo torna-se:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} \quad \text{Equação 7}$$

Na Figura 2 o gráfico da velocidade traçado da equação de Michaelis-Menten na presença e ausência do inibidor.

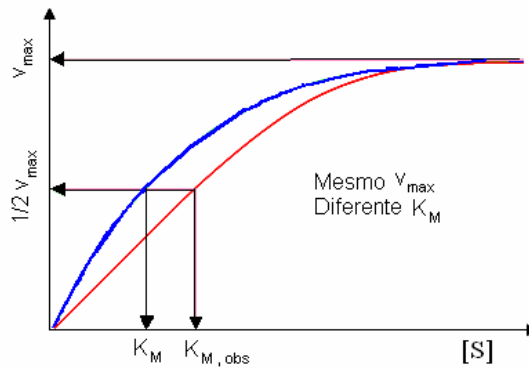
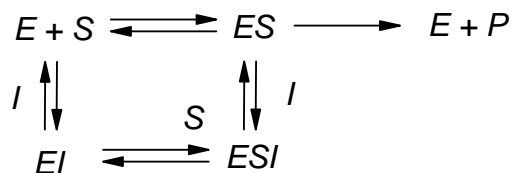


Figura 2. Representação gráfica da equação de Michaelis-Menten: velocidade versus concentração do substrato. Na presença (vermelho) e ausência de inibidor competitivo (azul)

O efeito do inibidor competitivo modifica o valor da constante de Michaelis-Menten, mas não altera a velocidade máxima da reação.<sup>19</sup>

#### 1.2.1.2 Inibição reversível não competitiva

A inibição reversível não competitiva ocorre quando um molécula ou íon pode se ligar em um local diferente que interage o substrato. O inibidor interage com a enzima e com o complexo  $[ES]$ , formando o complexo  $[EI]$  e  $[ESI]$ , modificando a conformação da enzima e tornando o processo catalítico ineficiente.<sup>20</sup>



O inibidor não competitivo apresenta uma grande afinidade pela enzima, seja similar ou não com a estrutura do substrato. A equação de Michaelis-Menten fica:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + (S) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Equação 8

O gráfico de Michaelis-Menten na presença e ausência de inibidor não competitivo é representado na Figura 3.

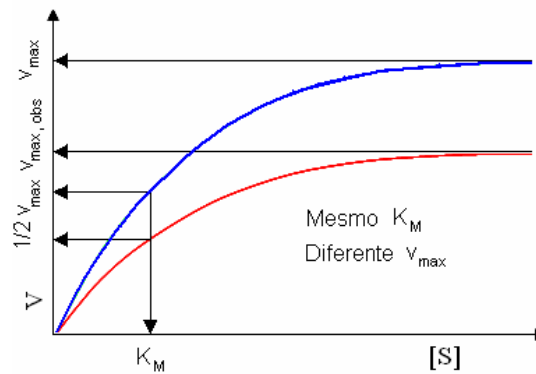
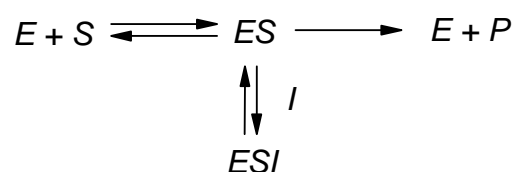


Figura 3. Representação gráfica da equação de uma curva de velocidade versus concentração do substrato. Na presença (vermelho) e ausência (azul) de inibidor reversível não competitivo

O efeito desse inibidor é a diminuição da velocidade máxima da reação, enquanto  $K_M$  permanece constante.<sup>21</sup>

#### 1.2.1.3 Inibição reversível incompetitiva

A inibição reversível incompetitiva se diferencia da inibição reversível não competitiva pelo fato do inibidor interagir apenas o complexo  $[ES]$ , formando o complexo  $[ESI]$  inativo, e não interage com a enzima livre. É raro este comportamento de inibição. O esquema abaixo demonstra o processo de inibição:



A redução efetiva da concentração do complexo  $[ES]$  aumenta a afinidade aparente da enzima pelo substrato, devido o principio de Le Chatelier, há o deslocamento do equilíbrio para a formação do complexo  $[ES]$ . A equação de Michaelis-Menten na presença de inibidor incompetitivo fica:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \left(\frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} + [S]\right)}$$

Equação 9

O gráfico de Michaelis-Menten na presença e ausência de inibidor incompetitivo é representado na Figura 4.

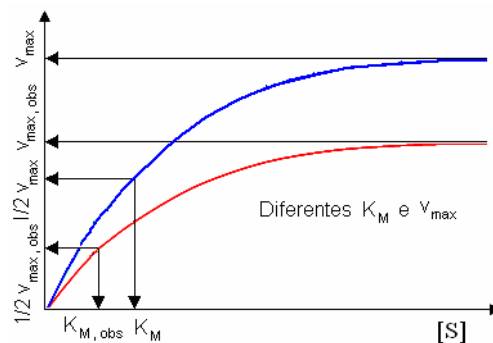


Figura 4. Representação gráfica da equação de velocidade versus concentração do substrato, na presença (vermelho) e ausência (azul) de inibidor incompetitivo

O efeito desse inibidor modifica a velocidade da reação, diminuindo o valor de  $v_{\max}$  e o valor de  $K_M$ .<sup>20,22</sup>

A eficácia de um inibidor enzimático como agente terapêutico dependerá da (i) potência do inibidor, (ii) sua seletividade ao alvo enzimático, (iii) a escolha da rota biossintética na qual a enzima alvo está inserida e (iv) as características

farmacocinéticas apropriadas do inibidor ou seus derivados. Maior potência implica no uso de menor quantidade do fármaco, e portanto redução de efeitos colaterais, para se obter a resposta farmacológica desejada.<sup>23,24,25</sup>

### 1.3 A Doença de Chagas e o Alvo Enzimático

A doença de Chagas é causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi*. A doença é transmitida para o hospedeiro humano pelas fezes do inseto vetor hematófago, sendo o principal triatomíneo, o *Triatoma infestans*, conhecido popularmente como “barbeiro”.

A transmissão da doença ocorre principalmente por três maneiras: através da picada do barbeiro, transfusão de sangue contaminado e por transmissão congênita.

O Controle do inseto vetor nas áreas endêmicas tem levado a uma eliminação da transmissão pela picada do barbeiro. Atualmente a transmissão congênita e a transfusão sanguínea são as principais causas da transmissão da doença.

Esta doença afeta cerca de 18 milhões de indivíduos, a maior parte originária das Américas do Sul e Central. Aproximadamente 120 milhões de pessoas estão em áreas de risco em regiões endêmicas que incluem 18 países e duas regiões ecológicas.<sup>26</sup>

Os dados da Organização Mundial da Saúde (WHO) mostram que há cerca de 10 mil mortes/ano e outras 649 mil pessoas têm algum tipo de limitação quanto às atividades cotidianas devido às seqüelas causadas pela doença.

Não há fármacos recomendados para o tratamento da doença de Chagas, apesar de ter sido descrita sua etiologia em 1909, pelo médico sanitariano Carlos Chagas.

Os medicamentos disponíveis para o tratamento paliativo da doença são o nifurtimox e o benzonidazol, estruturas na Figura 5, e apresentam efeitos colaterais severos; dentre eles a anorexia, distúrbios gastrintestinais e erupções cutâneas.<sup>27,28</sup>

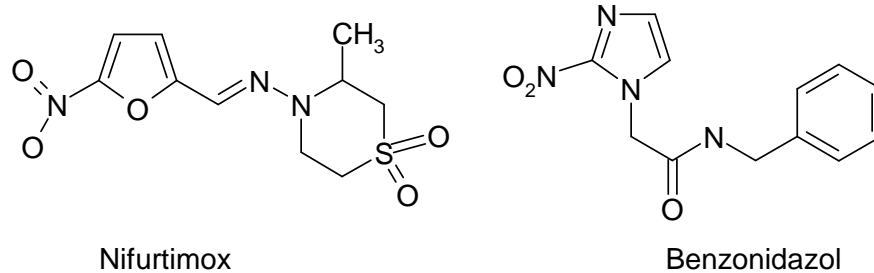


Figura 5. Representação das estruturas químicas do Nifurtimox e Benzonidazol

Embora empregado desde a década de 1970, o nifurtimox já não é mais comercializado no Brasil para o uso no tratamento da doença. Não há qualquer fármaco novo registrado. A busca de novas substâncias químicas bioativas de interesse para o tratamento da doença de Chagas constitui, portanto, uma necessidade eminentemente fundamental. Vários mecanismos de ação estão sendo estudados.

Entre os alvos enzimáticos estão incluídas as enzimas tripanotona redutase, farnesil transferase, cruzaina, hypoxantina-guanina, fosforibosiltransferase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, DNA topoisomerases, di-hidrofolato redutase e farnesilpirofosfato sintase.<sup>29,30,31,32,33</sup>

Tendo-se identificado alguns alvos enzimáticos contra o *T. cruzi*, é possível o planejamento de fármacos contra o parasito. Entre os alvos citados, selecionou-se neste trabalho a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.



### 1.3.1 Enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi*

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (E.C. 1.2.1.12), GAPDH, é uma enzima glicolítica que catalisa a fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato (DPG) na presença de fosfato inorgânico e  $\text{NAD}^+$  como coenzima, conforme mostrado na Figura 6:

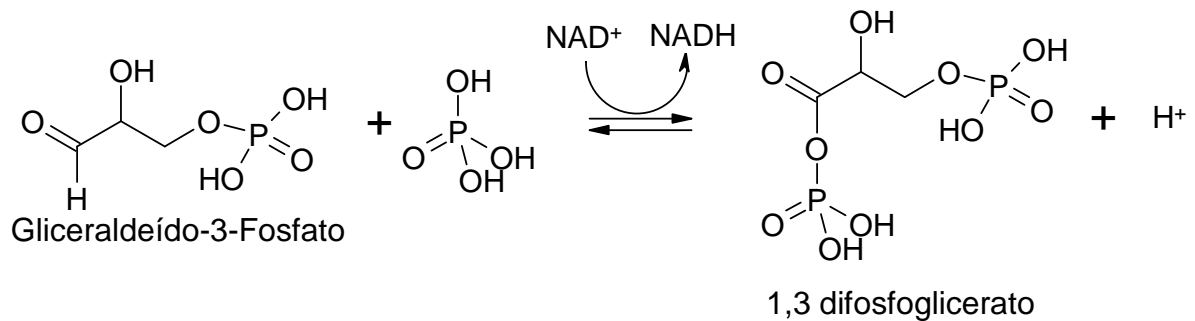


Figura 6. Representação esquemática da reação catalisada pela enzima GAPDH

A estrutura cristalográfica da enzima GAPDH está depositada no Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank*)<sup>34</sup>. A determinação da estrutura tridimensional da enzima GAPDH de *T. cruzi*, Figura 7, revelou diferenças estruturais importantes com relação à enzima homóloga humana, principalmente no sítio de ligação do cofator  $\text{NAD}^+$  e no sítio ativo, regiões promissoras para o planejamento de inibidores seletivos para o *T. cruzi*, que não apresentam afinidade pela enzima humana.<sup>35,36</sup>

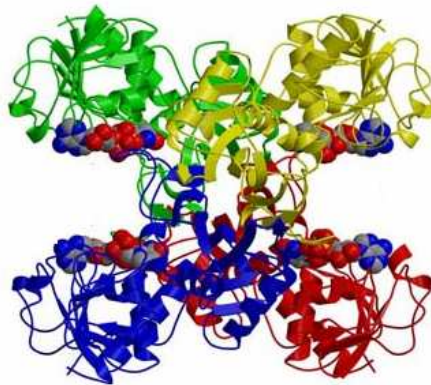


Figura 7. Representação da estrutura cristalográfica da enzima GAPDH (1DBV)<sup>34</sup>

A Figura 8 mostra uma representação esquemática da via glicolítica que ocorre em uma organela especializada (o glicossomo), importante no processo para a obtenção de energia pelo parasito *T.Cruzi*.

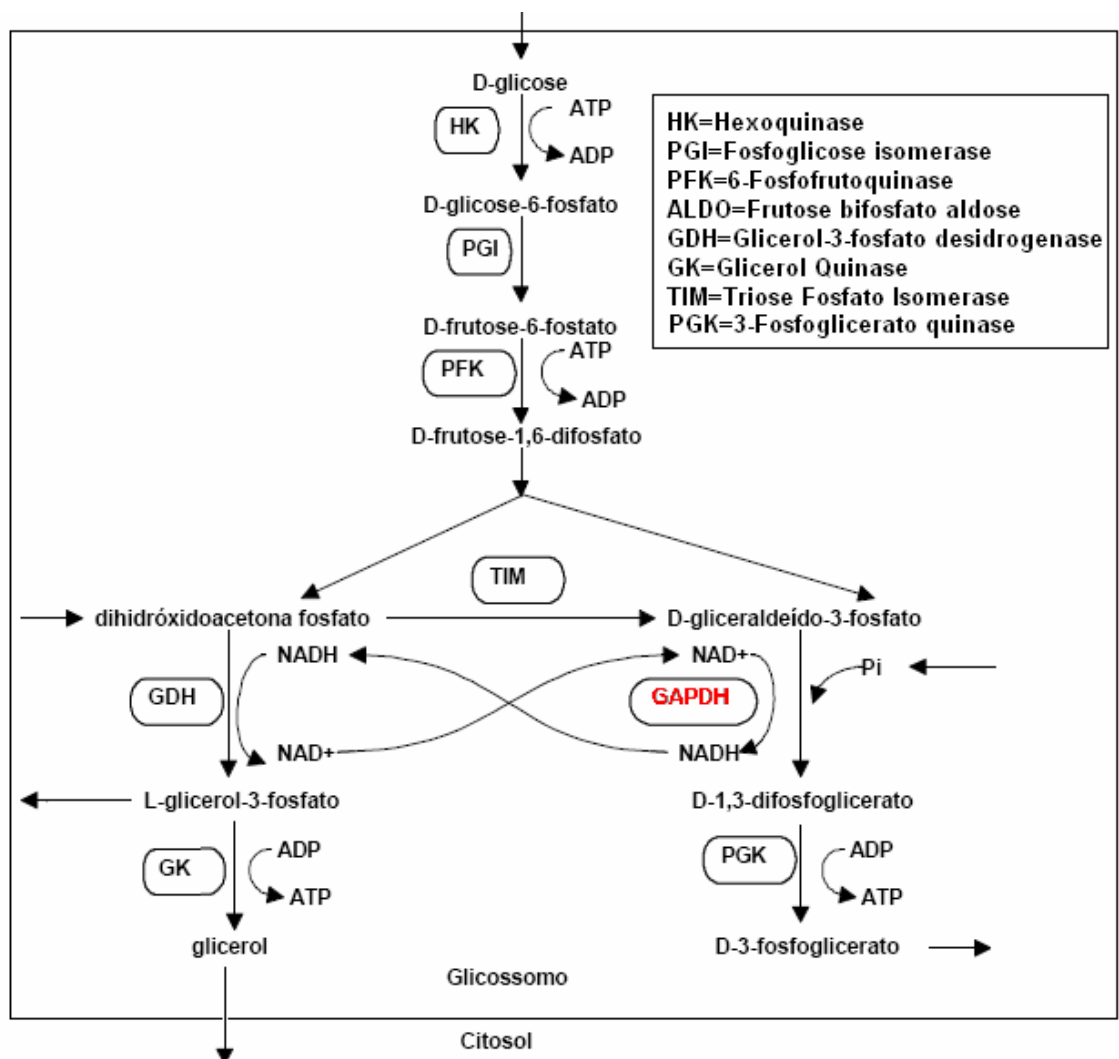


Figura 8. Representação esquemática da via glicolítica

As formas infectantes de *T. cruzi* (tripomastigotas) são altamente dependentes da via glicolítica para produção de ATP. Estudos demonstram que a inibição da GAPDH promove efetivamente inibição da via glicolítica em *T.cruzi*, conforme Figura 8.<sup>37</sup>

Esses dados contribuem para a utilização da enzima como um alvo atraente para a descoberta e desenvolvimento de novos inibidores enzimáticos como candidatos potenciais a fármacos antichagásicos.

#### **1.4 Determinação de parâmetros termodinâmicos e cinéticos da interação enzima-ligante através da titulação calorimétrica isotérmica (ITC)**

A caracterização termodinâmica de interações e/ou reações é importante para o entendimento do comportamento de biomoléculas, sendo essencial para o planejamento de novos fármacos.

A ITC pode ser usada para determinar, por uma única medida, a constante de associação ( $K_a$ ), estequiometria ( $n$ ), energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), entalpia ( $\Delta H$ ) e entropia ( $\Delta S$ ) da interação entre uma macromolécula (receptor) e ligante. Relacionar esses parâmetros com os processos físicos a nível molecular não é trivial, mas dados estruturais combinados com esses parâmetros possibilita obter informações a respeito do comportamento biomolecular.<sup>38,39</sup>

Os recentes avanços no desenvolvimento de calorímetros cada vez mais sensíveis e com melhor precisão torna essa técnica cada vez mais utilizada. As principais aplicações da ITC são no estudo de interações não-covalente entre cadeias poliméricas, equilíbrios de dissociação de aminoácidos em diferentes

estados de protonação, estudos termodinâmicos de detergentes e a formação de micelas, interações entre macromoléculas e ligantes e estudos cinético-enzimáticos.<sup>40,41</sup>

Este método consiste na adição do titulante, através de uma micro-pipeta automática, sobre o titulado que se encontra na célula de amostra (Figura 9). Em um experimento típico de interação entre uma enzima e seu ligante, a macromolécula (proteína) é colocada na célula de amostra e titulada com o ligante; a interação entre as duas espécies implica em uma liberação ou absorção de calor, que é detectada e registrada na forma de uma isoterma (Figura 9).

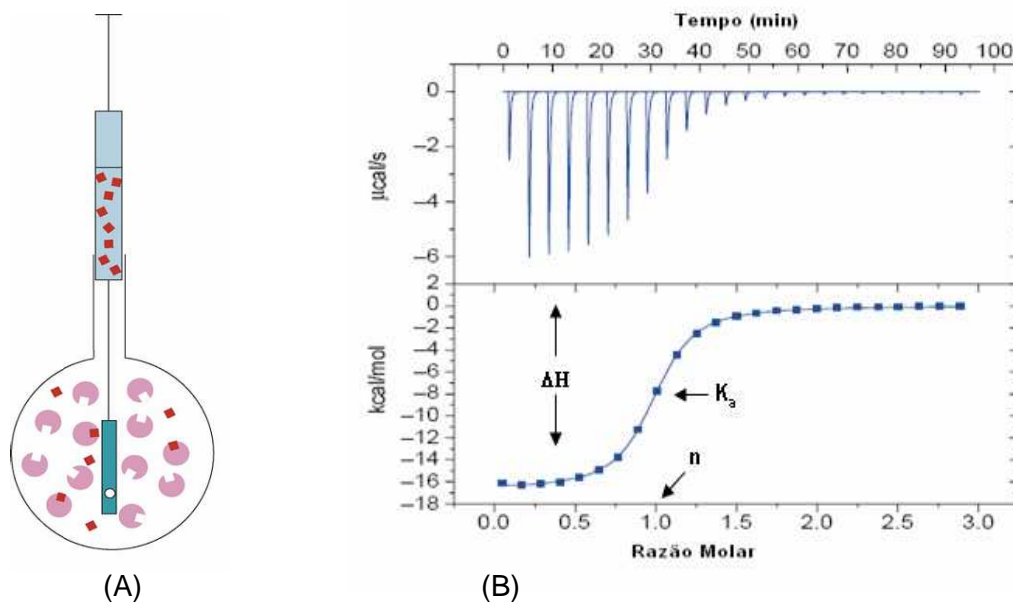


Figura 9. (A) Esquema representativo da seringa e célula de amostra de um microcalorímetro e (B) isoterma típica de um ensaio de interação entre ligante e uma macromolécula (acima, dados originais não processados; abaixo, dados processados). Adaptada da referência 42

Para cada injeção no experimento calorimétrico, o calor envolvido é proporcional às mudanças de concentrações do ligante, conforme Equação 10:

$$Q = V \cdot \Delta H [\Delta L]$$

Equação 10

onde,  $V$  é o volume da cela,  $\Delta H$  é a entalpia de interação e  $[\Delta L]$  é a variação na concentração do ligante.

A titulação calorimétrica isotérmica é a única técnica de determinação direta dos valores da constante de afinidade ( $K_a$ ) e entalpia em apenas um único experimento. É reconhecido que o  $\Delta H$  é um valor aparente (ou observado), já que o experimento pode ser acompanhado de outras fontes de calor além da interação entre o receptor e o ligante. Por exemplo, o valor de  $\Delta H$  deve ser corrigido quando há a ionização (mudanças na protonação) de um tampão devido à interação, ou reação, entre ligante e receptor. Seu valor também é corrigido para os efeitos de diluição e mecânico.

Os valores de  $\Delta G^0$  e  $\Delta S^0$  são então obtidos pelas relações:

$$\Delta G^0 = \Delta H - T\Delta S^0 = -RT \ln K_a \quad \text{Equação 11}$$

Através da ITC pode-se também determinar o valor de  $\Delta C_p$  (capacidade calorífica), um importante parâmetro termodinâmico que governa as magnitudes de  $\Delta H$  e  $\Delta S^0$ . Equação 4:

$$\Delta C_p = \frac{d(\Delta H)}{dT} = T \frac{d(\Delta S^0)}{dT} \quad \text{Equação 12}$$

A fim de caracterizar os parâmetros termodinâmicos de uma interação é necessário medir não somente o  $\Delta G^0$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S^0$ , mas também o  $\Delta C_p$ , uma vez que este parâmetro permite a predição da mudança dos outros três parâmetros com a temperatura, através da relação:

$$\Delta C_p = \left( \frac{\Delta H_{T_2} - \Delta H_{T_1}}{T_2 - T_1} \right) = \left( \frac{\Delta S^{\circ} T_2 - \Delta S^{\circ} T_1}{\ln\left(\frac{T_2}{T_1}\right)} \right) \quad \text{Equação 13}$$

onde,  $T_1$  e  $T_2$  são duas temperaturas independentes a serem determinadas se os valores de  $\Delta H$  forem susceptíveis às suas mudanças.<sup>43,44</sup>

As entalpias determinadas experimentalmente são relacionadas com as interações intermoleculares (ligações hidrogênio, interações eletrostáticas e forças de Van der Waals) entre ligante e receptor, sendo que em sistemas biológicos a interação por ligação hidrogênio é de fundamental importância.

Interações específicas são importantes para a seletividade dos inibidores. Interações hidrofóbicas são relacionadas com os graus relativos de desordem do sistema livre e do complexo ligante-receptor, refletidas nas mudanças de entropia. A liberação de moléculas de água da superfície hidrofóbica do ligante e do receptor para a solução é uma fonte de entropia favorável (efeito hidrofóbico).<sup>45,46</sup>

Mudanças conformacionais são entropicamente desfavoráveis. Isto freqüentemente é um indicativo de interações de “ajuste flexível”. Tais modos de interação desempenham um importante papel fisiológico. Por exemplo, grandes mudanças conformacionais são necessárias para uma mudança alostérica comum na sinalização de rotas metabólicas ou na estrutura de receptores.<sup>10</sup>

Interações que ocorrem sem grandes mudanças conformacionais do receptor (interações rígidas) resultam, também, em um processo entropicamente desfavorável. Neste tipo de interação há sempre a perda de graus de liberdade rotacionais e translacionais devido à formação do complexo.

Todas essas interações resultam em um balanço entálpico e entrópico da interação, comumente chamado de “assinatura termodinâmica”. A Figura 10 mostra

uma representação esquemática de uma assinatura termodinâmica de três moléculas que possuem uma mesma energia livre de Gibbs ( $\sim -9,54 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) de interação. Esses perfis podem ser usados para a discriminação das energias de interação.

No esquema (A) a grande entalpia negativa sugere que há um grande número de ligações hidrogênio e interações de Van der Waals, entre o ligante e o receptor. A entropia desfavorável implica em uma mudança conformacional em ambas as moléculas.

A grande entropia positiva no esquema (B) significa que a interação é dominada pela reestruturação do solvente devido ao efeito hidrofóbico. Esse perfil é freqüentemente observado em interações que envolvem ácidos nucleicos devido ao deslocamento de um sítio específico de ligação de moléculas de água.

No esquema (C) há um balanço entre as interações intermoleculares, um número apropriado de ligações hidrogênio e uma modesta contribuição entrópica.<sup>47,48</sup>

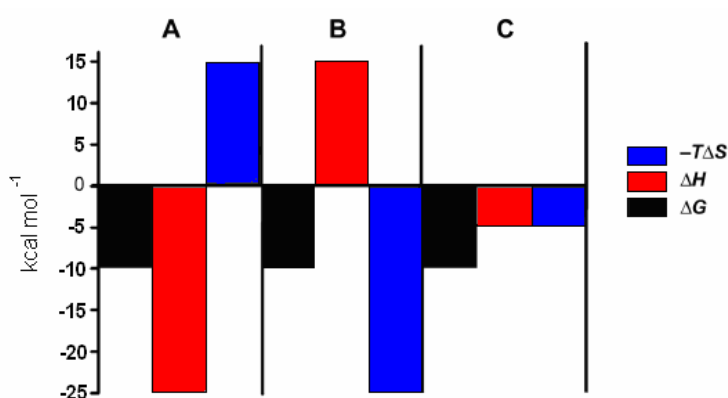


Figura 10. Representação esquemática do conceito de “assinatura termodinâmica”. (A) elevado número de ligações hidrogênio e perda de entropia, (B) interação predominada por interações hidrofóbicas, (C) pequena contribuição de ligações hidrogênio e contribuições hidrofóbicas

Na teoria, para se otimizar a interação do ligante pela enzima, deve-se aumentar a entropia e entalpia (torná-la mais negativa). Desta forma pode-se

conseguir um inibidor com interações específicas, importante para a seletividade do mesmo, e com boa partição já que a entropia favorável significa que a molécula tem um fragmento ou grupo lipofílico capaz de ultrapassar as membranas biológicas. Na prática, entretanto, moléculas com grande lipofilia são insolúveis em água.<sup>45</sup>

### 1.5 Determinação da cinética enzimática por ITC

Através da ITC é possível acompanhar a velocidade de reação em sistemas enzimáticos. Todd e Gomez<sup>49</sup> demonstraram que a quantidade de energia produzida pela reação é proporcional ao calor liberado pela mesma.

$$Energia = \frac{dQ}{dT} \quad \text{Equação 13}$$

A quantidade de calor produzida pela reação é proporcional ao número de moles de reagente sendo convertido a produto:

$$Q = [P]_{total} V_0 \Delta H_{app} \quad \text{Equação 14}$$

onde,  $\Delta H_{app}$  é a variação de entalpia aparente, determinada experimentalmente sob as condições em que é realizado o experimento,  $[P]_{total}$  é a concentração do produto e  $V_0$  é o volume da célula do calorímetro.

Sendo a taxa de calor é proporcional à taxa de produto gerado pela reação, tem-se:

$$Energia = \frac{dQ}{dT} = \frac{[dP]}{dT} V_0 \Delta H_{app} \quad \text{Equação 15}$$



Através da variação de calor, que pode ser medida diretamente no calorímetro, pode-se determinar a taxa de variação de produção do produto de reação em função do tempo.<sup>50</sup> A relação  $\frac{dP_{total}}{dT}$  é igual à taxa de produto de reação (ou seja igual à velocidade de reação,  $v$ ). Sua substituição por  $v$  na equação 15, resulta em:

$$v = \frac{1}{V_0 \Delta H_{app}} \frac{dQ}{dT} \quad \text{Equação 16}$$

A concentração do substrato pode ser calculada a qualquer momento através da integração do calor em função do tempo, Equação 17.

$$[S]_t = [S]_{t=0} - \frac{\int_{t=0}^t \frac{dQ}{dt} dt}{V_0 \Delta H_{app}} \quad \text{Equação 17}$$

A  $[E]$  tem um valor conhecido, a  $[S]_t$  pode ser calculada em qualquer tempo  $t$  e a velocidade (proporcional a  $\frac{dQ}{dT}$ ) é determinada diretamente durante o experimento. A curva de Michaelis-Menten (Figura 1) é obtida por regressão desses valores por meio da equação 6. Através da curva de Michaelis-Menten as constantes  $k_{cat}$  e  $K_M$  são prontamente determinados.<sup>49</sup>

Além disso, a constante de inibição ( $K_i$ ) pode ser obtida através desses experimentos. Um experimento controle é realizado e as constantes de Michaelis-Menten são determinadas, em seguida o experimento da presença do inibidor é feito e os dados obtidos para a velocidade são ajustados graficamente na equação correspondente ao tipo de inibição. Desta forma o valor de  $K_i$  pode ser determinado.

### 1.5.1 Métodos das Injeções Múltiplas e Simples

Na titulação calorimétrica isotérmica há dois métodos de análise: o método das injeções múltiplas (MIM) e injeção simples (SIM). Estas técnicas provêm uma aplicação ampla para as análises termodinâmicas de interação e cinética.

Para trabalhar com o método SIM, basta efetuar modificações no sistema de injeção. É um método de injeção contínua, com lenta adição do ligante (na seringa). A troca de calor produzida durante o processo de interação é obtida no mesmo instante que o processo ocorre.

A principal vantagem do método SIM é o tempo de aquisição de dados, que requer menos tempo para a análise quando comparado com o método de injeções múltiplas. Dependendo do experimento, pode durar de 20 a 50 minutos que são contados a partir do momento que se inicia a injeção. Já o método de injeções múltiplas requer de 20 a 30 injeções e leva de 45-50 minutos. Entretanto, se o número de injeções puder ser estabelecido em 10, essa questão temporal desaparece. Este método também tem demonstrado uma maior susceptibilidade à obtenção dos parâmetros termodinâmicos de interação para alguns sistemas.<sup>51,52</sup>

Na determinação cinética de reação pelo método das injeções múltiplas, a reação deve ser realizada sob as condições de pseudo-primeira ordem com relação ao substrato ( $[E] \ll [S]$ ). Nesse experimento o  $\frac{dQ}{dT}$  é determinado pela medida da diferença da linha base original e nova linha base após cada injeção, Figura 11. As concentrações do substrato e da enzima são calculadas após cada injeção. Através da Equação 16 a velocidade é obtida, os dados são ajustados graficamente através da Equação 6 para determinar os valores das constantes de Michaelis,  $k_{cat}$  e  $K_M$ .

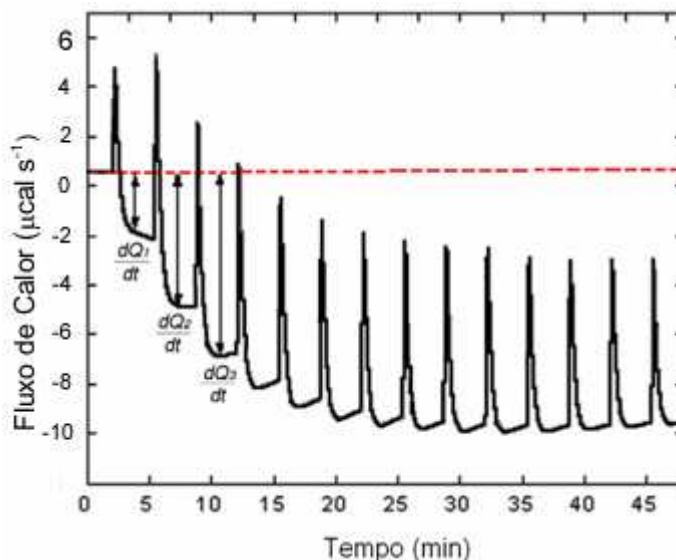


Figura 11. Representação gráfica da determinação da velocidade de reação através do método das injeções múltiplas. Figura adaptada da referência 53

A Figura 11 mostra os dados de ITC onde a enzima serina/treonina fosfatase (E.C 2.7.10.2) foi titulada com o substrato p-nitrofenil fosfato de sódio<sup>53</sup>. A cada injeção do substrato ocorre um pico endotérmico correspondente à diluição do mesmo. A linha base (que corresponde ao calor trocado na cela) é estabilizada em um nível menor quando comparado à linha base antes da injeção devido à liberação de calor pela reação. Esse calor gerado ( $\frac{dQ}{dT}$ ) é proporcional à velocidade de reação, como demonstrado anteriormente.

Outra estratégia para determinação de parâmetros cinéticos consiste no método da injeção simples, Figura 12. O substrato é adicionado na cela de amostra dando início a reação exotérmica. A linha base decresce até o nível correspondente a velocidade máxima da reação, neste ponto a enzima se encontra saturada pois a quantidade de substrato na cela de amostra precisa ser pelo menos 1000 vezes maior que a concentração da enzima para que a reação se processe sob a condição de estado estacionário. A reação termina quando a linha base retorna ao zero inicial.

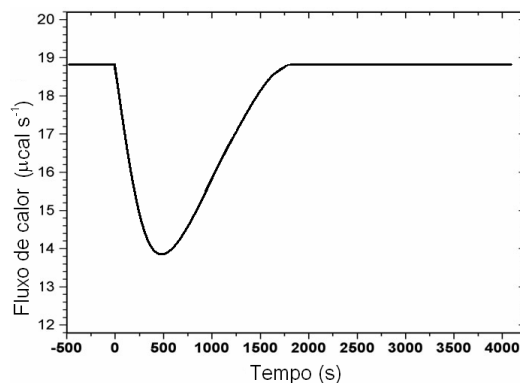


Figura 12. Determinação da velocidade de reação através do método da injeção simples. Figura adaptada da referência 53

A velocidade de reação e a concentração do substrato podem ser obtidas através das Equações 16 e 17. Como no método das injeções múltiplas esses valores são ajustados graficamente na Equação 6 e as constantes de Michaelis-Menten são determinadas por ajuste não linear.

A vantagem do método das injeções múltiplas em relação ao método da injeção simples é a baixa quantidade de produto formado durante o experimento em relação à quantidade de substrato na cela de amostra, pois esse aumenta a cada injeção. Desta maneira, a inibição da reação pelo produto não causa uma influencia significativa nas medidas. Entretanto o método das injeções múltiplas é aplicável somente quando  $K_M$  é maior que  $10 \mu\text{M}$ , para valores menores o método da injeção simples é recomendado.

Assumindo um valor médio de  $\Delta H_{app} = -5 \text{ kcal mol}^{-1}$  a reação deve gerar  $0,0007 \text{ mM s}^{-1}$  de produto a 10% da velocidade máxima ( $v_{max}$ ) para que o método calorimétrico seja aplicável. Além disso, como a  $[E] \ll [S]$  o  $k_{cat}$  deve ser maior que  $1 \text{ min}^{-1}$ .<sup>49,54</sup>

Para determinar a velocidade através da Equação 16, é necessário medir a  $\Delta H_{app}$  da reação. A determinação experimental desse parâmetro exige enzima

suficiente para converter todo o substrato a produto em um determinado período de tempo. Esse experimento é similar ao método da injeção simples utilizado para determinar a velocidade da reação, Figura 12. A integração da área sob a curva, dividido pelo total de produto gerado pela reação fornece  $\Delta H_{app}$ . Um método alternativo é colocar a enzima na seringa e titular sobre uma quantidade limitada de substrato na cela de amostra do calorímetro. O cálculo da  $\Delta H_{app}$  pode ser feito da mesma maneira descrita acima.<sup>50</sup>

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Determinar as propriedades cinéticas e termodinâmicas da reação catalisada pela da enzima GAPDH de *T. cruzi*, visando sua modulação por inibidores através da titulação calorimétrica isotérmica.

### 2.2 Objetivos Específicos

Determinar a entalpia aparente de reação da conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato, catalisada pela enzima GAPDH.

Desenvolver um protocolo de ensaio cinético para a enzima GAPDH de *T. cruzi* através da titulação calorimétrica isotérmica e, desta forma, obter as constantes cinéticas da equação de Michaelis-Menten ( $k_{cat}$  e  $K_M$ ).

Avaliar a atividade enzimática da GAPDH na presença de diferentes concentrações de dois co-solventes padrões (DMSO e Metanol) utilizados em bioensaios. Através desse resultado, estabelecer um protocolo geral de ensaio calorimétrico de inibição enzimática, que inclua moléculas com baixa solubilidade em água.

Determinar a constante de inibição ( $K_i$ ) de inibidores previamente planejados por métodos *in silico* pelo Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais do Instituto de Química de São Carlos – USP.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

#### 3.1 Materiais

O D,L-gliceraldeído-3-fosfato (G3P), trietanolamina hidrocloreídrico (TEA-HCl), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA),  $\beta$ -mercaptoetanol, arseniato de sódio heptahidratado ( $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ), dimetilsulfóxido (DMSO) (99.9%), metanol (99.9%) e propanol foram adquiridos de Sigma-Aldrich (USA).

Os experimentos calorimétricos foram realizados utilizando-se do Termostatizador-Desgaseificador (ThermoVac, Microcal), e um calorímetro VP-ITC (VP-ITC, MicroCal, Northampton, USA).<sup>55</sup>

A quercetina-3-O-  $\alpha$ -L- arabinopiranosídeo e o caempferol-3-O- $\beta$ -D-(6-O-p-cumaroil)glicosídeo foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Wagner Villegas do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNESP.

A marcianina e a mangiferina foram agradecidamente cedidas pela Profa. Dra. Maria Goretti de Vasconcelos Silva do Departamento de Química Analítica e Físico Química na Universidade Federal do Ceará.

O ácido 4-butilfenil-amino-metileno-fosfônico foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Adriano Andricopulo do Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural – CBME, Instituto de Física de São Carlos-USP.

A narigina foi gratamente cedida pela Profa. Dra. Janete Harumi Yariwake do Grupo de Análise Fitoquímica do Departamento de Química e Física Molecular, no Instituto de Química de São Carlos-USP.

A preparação e a purificação da enzima glicosomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, GAPDH, (E.C. 1.2.1.12) foram realizadas pelo grupo do Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural – CBME, Instituto de Física de São Carlos-USP conforme descrito na literatura.<sup>35,56</sup> As células competentes *E. coli* foram cultivadas em meio mínimo LB Broth, com glicerol 1%, ácido málico 0,4%, ácido casamino 0,1%, ampicilina 100 g mL<sup>-1</sup> e tetraciclina 12,5 g mL<sup>-1</sup> a 37°C. Quando a D.O<sub>600nm</sub> atingiu 0,8 a expressão foi induzida com 0,4 mM de IPTG a 20°C, durante uma noite.

As células foram lisadas por sonicação, centrifugadas (20 000 g durante 20 min). O sobrenadante foi fracionado por precipitação de sulfato de amônio e a mistura resultante foi centrifugada (2000 g por 20 min). O sobrenadante foi purificado em cromatografia de coluna hidrofóbica e em seguida eluída em diferentes gradientes de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As frações coletadas foram dializadas contra tampão Tris-HCl pH 7.8. Após a diálise as frações foram purificadas em cromatografia de troca iônica e a enzima eluída em frações crescentes de KCl. As frações coletadas foram dializadas em tampão Tris-HCl pH 7.8 sulfato de amônio 500 mM, NAD 2 mM, azida 1mM, DTT, EDTA e concentrada com o Amicon a 9 mg mL<sup>-1</sup>. A presença da enzima na etapa final é confirmada por eletroforese em gel (SDS-PAGE). Após a obtenção da enzima, estas foram adicionadas ao glicerol e estocadas a -80°C.



### 3.2 Calibração do Calorímetro

A calibração do calorímetro é feita somente pelo fabricante, cabendo ao usuário a verificação da calibração do aparelho através de uma resistência interna que produz uma quantidade conhecida de calor<sup>57</sup>.

Adicionalmente fez-se o experimento de verificação da calibração por intermédio da diluição do propanol.<sup>58</sup> Preparou-se uma solução aquosa de propanol 2 % v/v (0,33 mol Kg<sup>-1</sup>); preencheu-se a seringa do calorímetro com esta solução e titulou-se em água. A temperatura utilizada foi 25 °C, volume de injeções 10 µL, intervalo entre injeções 120 s e velocidade de agitação 307 rpm. O valor de  $\Delta H_{dil}$  foi calculado a partir da equação:

$$\Delta H_{dil} = h_x(m_f - m_i) + h_{xx}(m_f - m_i)^2 \quad \text{Equação 18}$$

onde,  $m_i$  e  $m_f$  são molalidades inicial e final, respectivamente.  $h_x$  (558 (± 9) J kg<sup>-1</sup> mol<sup>-2</sup>) e  $h_{xx}$  (158 (± 8) J kg<sup>2</sup> mol<sup>-3</sup>) são coeficientes viriais de interação. Os valores calculados (expressos em calorias) e determinados experimentalmente estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores experimentais e tabelados da entalpia de diluição do propanol

$\Delta H_{dil}$ (cal) – Tabelado	$\Delta H_{dil}$ (cal) - Experimental
-40,92	-40,14
-40,23	-39,71
-39,94	-39,28
-39,41	-38,62

Os erros relativos dos valores experimentais em relação aos valores tabelados foram por volta de 1,70 %.

### 3.3 ITC: Procedimento Experimental

A qualidade do experimento calorimétrico, bem como a otimização do mesmo, depende de uma série de cuidados que devem ser tomados durante o procedimento experimental, descritos nesta seção e aplicados em todos os experimentos.

Desgaseificaram-se todas as soluções (reagentes e soluções tampões utilizadas para a lavagem da cela de amostra) de 10 a 20 minutos, através da bomba de vácuo contida no aparelho ThermoVac para evitar a formação de bolhas durante o experimento. No mesmo instante que as soluções são desgaseificadas, estas são termostatizadas em uma temperatura pouco abaixo da temperatura em que é realizado o experimento (entre 0,5 e 2 °C) para evitar longos períodos de estabilização.

Preencheu-se a cela de referência com água destilada devidamente desgaseificada, utilizando-se de uma seringa tipo “livre de gás” fornecida pelo fabricante. Um experimento controle contendo o mesmo tampão empregado durante todas as determinações calorimétricas foi realizado e a cela de referência foi preenchida com esse tampão.

Limpou-se a cela de amostra, com 30 mL de solução tampão que foi utilizada durante o experimento, tomando-se o cuidado de remover todo o líquido da cela antes de iniciar o ensaio calorimétrico.

Preencheu-se a cela de amostra com a enzima (ou substrato), utilizando a seringa de injeção. Deve-se evitar a formação de bolhas durante o preenchimento da seringa e da cela de amostra com a solução para evitar ruídos nas medidas experimentais.

A seringa (300  $\mu\text{L}$ ) foi preenchida lentamente, conforme instruções do fabricante,<sup>57</sup> para que seja removido todo o ar. Em seguida purgou-se-a duas vezes para assegurar a ausência de bolhas.

Lavou-se a superfície da seringa que é introduzida na cela, para evitar a contaminação da cela de amostra, secou-se com papel e introduziu-se a seringa na cela de amostra.

Iniciando-se os experimentos é necessário um tempo para estabilização da temperatura (de 5 a 10 minutos). Após este equilíbrio, um tempo adicional é requerido para a estabilização da linha base e subsequente início das injeções (de 10 a 20 minutos). O fluxo de calor ( $\mu\text{cal s}^{-1}$ ) foi registrado pelo aparelho em função do tempo.<sup>59</sup>

A qualidade da linha base foi estabelecida. Experimentos que apresentaram um ruído na linha base superior a  $0,01 \mu\text{cal s}^{-1}$  foram descartados.

A velocidade de agitação e a temperatura foram mantidas constantes em todos os experimentos, sendo 307 rpm e  $25^\circ\text{C}$  respectivamente.

### **3.4 Determinação da entalpia aparente da reação de conversão de G3P para 1-arseno-3-fosfoglicerato**

A entalpia aparente de conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato foi determinada preenchendo-se a cela de amostra com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM,  $\text{NaHAsO}_4$  30 mM, D,L-gliceraldeído-3-fosfato 1,0 mM, e  $\text{NAD}^+$  1,5 mM.

A seringa foi preenchida com a enzima GAPDH 1,0  $\mu\text{M}$  em uma solução tampão igual à utilizada na cela de amostra, para minimizar calores de mistura e

diluição. Titulou-se o substrato pela injeção de 10  $\mu$ L de enzima, a concentração final da enzima na cela foi de 5,0 nM (concentração do monômero). O G3P foi o reagente limitante da reação; seu completo consumo foi observado quando a linha base retornou ao zero inicial.

A GAPDH normalmente forma o produto 1,3-difosfoglicerato na presença do fosfato. Assim, o fosfato foi substituído pelo arseniato neste estudo para minimizar o a inibição da enzima pelo produto formado durante a reação.

O calor de diluição da enzima foi determinado sob as mesmas condições experimentais, porém na ausência do G3P.

### **3.5 Desenvolvimento do protocolo de ensaio cinético da enzima GAPDH feito por ITC**

3.5.1 Determinação do calor de diluição do G3P na solução tampão e o calor de mistura do tampão

O calor de diluição do G3P foi determinado preenchendo-se a cela de amostra com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM, e NAD<sup>+</sup> 1,5 mM.

A seringa foi preenchida com uma solução de G3P 5,0 mM no mesmo tampão da cela de amostra e titulado através de 25 injeções consecutivas, com um intervalo entre as injeções de 120 segundos.

O calor de mistura do tampão determinado preenchendo-se a cela de amostra com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM e NAD<sup>+</sup> 1,5 mM, e a seringa com o mesmo tampão. Em seguida titulou-se a solução contida na seringa sobre a cela de amostra através de 25 injeções consecutivas com um intervalo entre as injeções de 120 segundos.

### 3.5.2 Ensaios cinéticos da enzima GAPDH

Ensaio 1. A cela de amostra foi preenchida com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM, GAPDH 10 nM, e NAD<sup>+</sup> 1,5 mM. A seringa foi preenchida com a solução contendo G3P no mesmo tampão da cela de amostra. Titulou-se a solução de G3P 0,6 mM na solução contendo a enzima através de 25 injeções consecutivas de 10  $\mu$ L, com o intervalo entre as injeções de 120 segundos.

Ensaio 2. A cela de amostra foi preenchida com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM, GAPDH 10 nM, e NAD<sup>+</sup> 1,5 mM. A seringa foi preenchida com a solução contendo G3P 3,0 mM no mesmo tampão da cela de amostra. Titulou-se a solução de G3P na solução contendo a enzima através de 25 injeções consecutivas de 5  $\mu$ L, com o intervalo entre as injeções de 120 segundos.

Ensaio 3. A cela de amostra foi preenchida com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM, GAPDH 10 nM, e NAD<sup>+</sup> 1,5 mM. A seringa foi preenchida com a solução contendo G3P 3,0 mM no mesmo tampão da cela de amostra. Titulou-se a solução de G3P na solução contendo a

enzima através de 25 injeções consecutivas de 5  $\mu$ L, com o intervalo entre as injeções de 60 segundos.

Ensaio 4. A cela de amostra foi preenchida com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM, GAPDH 10 nM, e NAD<sup>+</sup> 1,5 mM. A seringa foi preenchida com a solução contendo G3P 5,0 mM no mesmo tampão da cela de amostra. Titulou-se a solução de G3P na solução contendo a enzima através de 25 injeções consecutivas de 5  $\mu$ L, com o intervalo entre as injeções de 60 segundos.

### **3.6 Verificação da inibição da reação catalisada pela enzima GAPDH pelo produto de reação**

Neste experimento a cela de amostra foi preenchida com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM, GAPDH 5 nM, e NAD<sup>+</sup> 1,5 mM. A seringa foi preenchida com a solução contendo G3P 5,0 mM no mesmo tampão da cela de amostra. Titulou-se a solução de G3P na solução contendo a enzima através de 50 injeções consecutivas de 3  $\mu$ L, com o intervalo entre as injeções de 120 segundos.

### 3.7 Determinação do comportamento da enzima frente à adição de co-solventes

#### 3.7.1 Determinação da $\Delta H_{app}$ na presença de diferentes concentrações de DMSO e Metanol

A entalpia aparente de conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato sem a adição de co-solvente foi determinada previamente (controle), seção 3.4. A entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ) na presença dos co-solventes foi determinada preenchendo-se a cela de amostra com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM, D,L-gliceraldeído-3-fosfato 1,0 mM, NAD<sup>+</sup> 1,5 mM e DMSO 2,5, 5,0, 7,5 e 10% v/v; sob as mesmas condições realizaram-se os experimentos com a adição de Metanol 2,5, 5,0, 7,5 e 10% v/v. A seringa foi preenchida com a enzima GAPDH 1,0  $\mu$ M em uma solução tampão igual à utilizada na cela de amostra para minimizar calores de mistura e diluição. Titulou-se o substrato pela injeção de 10  $\mu$ L de enzima.

Os calores de diluição das enzimas foram determinados sob as mesmas condições experimentais, porém na ausência do G3P.

### 3.7.2 Ensaios cinéticos da enzima GAPDH na presença de diferentes concentrações de DMSO e Metanol

Primeiramente realizou-se o experimento na ausência dos co-solventes. A cela de amostra foi preenchida com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM, GAPDH 5,0 nM, e NAD<sup>+</sup> 1,5 mM. A seringa foi preenchida com a solução contendo G3P 5,0 mM no mesmo tampão da cela de amostra. Titulou-se a solução de G3P na solução contendo a enzima através de 25 injeções consecutivas de 10  $\mu$ L, com o intervalo entre as injeções de 60 segundos.

Em seguida realizou-se o experimento com a adição dos co-solventes. A cela de amostra foi preenchida com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM, GAPDH 5,0 nM, NAD<sup>+</sup> 1,5 mM e DMSO 2,5, 5,0, 7,5 e 10% v/v; sob as mesmas condições realizaram-se os experimentos com a adição de Metanol 2,5, 5,0, 7,5 e 10% v/v. A seringa foi preenchida com a solução contendo G3P 5,0 mM no mesmo tampão da cela de amostra. Titulou-se a solução de G3P na solução contendo a enzima através de 25 injeções consecutivas de 10  $\mu$ L, com o intervalo entre as injeções de 60 segundos.

### 3.8 Ensaios de Inibição Enzimática

Os ensaios de inibição foram realizados preenchendo-se a cela de amostra com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM, GAPDH 5,0 nM, e NAD<sup>+</sup> 1,5 mM.



Um experimento controle foi realizado anteriormente a cada ensaio de inibição, logo em seguida sob as mesmas condições experimentais o ensaio de inibição foi realizado adicionando-se conjuntamente na cela de amostra o composto a ser testado contra a enzima em uma concentração de 50  $\mu\text{M}$ . A seringa foi preenchida com a solução contendo G3P 5,0 mM no mesmo tampão da cela de amostra. Titulou-se a solução de G3P na solução contendo a enzima através de 20 injeções consecutivas de 4,0  $\mu\text{L}$ , com o intervalo entre as injeções de 60 segundos.

### 3.9 Análise dos Dados

A análise dos dados gerados pelo monitoramento do fluxo de calor foi realizada através do programa Origin-ITC 7.0.<sup>60</sup>

Para a determinação dos valores de entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ) integraram-se as curvas correspondentes às reações e as respectivas diluições. Em seguida subtraíram-se os calores de diluição das curvas de reação e dividiu-se o valor pelo número de moles de G3P (considerando-se apenas um dos enantiômeros, o D que é transformado em DPG) adicionado a cela de amostra, considerando seu consumo total.

Os parâmetros cinéticos  $k_{cat}$  e  $K_M$  da reação de conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato foram calculados no programa Origin-ITC no modo “ensaio enzimático”. Os dados obtidos experimentalmente foram ajustados graficamente pelo método de ajuste não-linear dos mínimos quadrados à Equação 6 e os parâmetros cinéticos são determinados.

As constantes de inibição foram obtidas pelo ajuste não linear dos dados experimentais na equação para os inibidores não-competitivos (Equação 8) no programa SigmaPlot 9.0, no modo “análise cinética enzimática”.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Determinação da entalpia aparente da reação de conversão de G3P para 1-arseno-3-fosfoglicerato

A determinação da entalpia aparente de reação foi realizada conforme método descrito por Bianconi<sup>50</sup> devido à enzima possuir um baixo calor de diluição na solução de reação. O G3P foi colocado na cela de amostra, sendo o reagente limitante da reação. Assim que a enzima foi adicionada na solução à reação inicia-se; ocorre uma deflexão da linha base evidenciando que a reação é exotérmica. Essa isoterma pode ser vista na Figura 13.

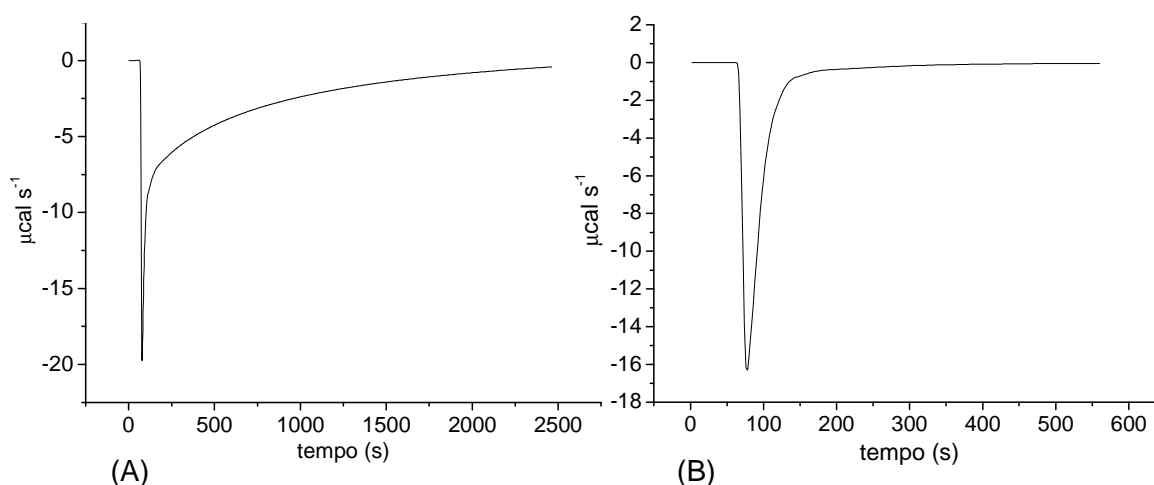


Figura 13. Representação gráfica da (A) determinação da entalpia aparente da reação de conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato catalisado pela enzima GAPDH e (B) determinação do calor de diluição da enzima GAPDH na solução de reação

A curva mostrada na Figura 13 é a determinação direta do calor trocado durante a reação. A área sob a curva corresponde a todas as trocas de calor que ocorrem na cela durante a reação. Subtraindo-se o calor de diluição da enzima, obtém-se o calor aparente de reação:

$$Q_{app} = \frac{Q_r - Q_d}{n} \quad \text{Equação 19}$$

onde,  $Q_r$  é o calor de reação,  $Q_d$  é o calor de diluição da enzima e  $n$  é o número de moles de G3P na cela.

O experimento é realizado a pressão constante, as variações de volume são desprezíveis, desta forma o calor molar aparente de reação pode ser considerado igual à entalpia molar aparente de reação ( $\Delta H_{app}$ ).<sup>43</sup>

A entalpia molar aparente determinada foi de  $-7,36 (\pm 0,35)$  kcal mol<sup>-1</sup>, nas condições em que foi realizado o experimento (ver procedimento).

#### **4.2 Desenvolvimento do protocolo de ensaio cinético da enzima GAPDH feito por ITC**

O desenvolvimento e padronização de um protocolo de ensaio cinético são essenciais para a busca de inibidores contra a enzima GAPDH. Através do método padronizado, é possível a determinação de parâmetros cinéticos relacionados à atividade de compostos, e desta forma construir um banco de dados com informações estruturais e de atividade biológica de substâncias químicas bioativas.

Estas informações são utilizadas para a busca e otimização de substâncias bioativas com determinações de relações quantitativas entre a estrutura e a atividade biológica de inibidores.<sup>61</sup>

A primeira etapa realizada neste estudo foi à determinação do calor de diluição do G3P na solução tampão, utilizada nos experimentos, e do calor de diluição do tampão em tampão (mesmas soluções). Desta forma podem-se

identificar os efeitos das trocas de calor destas soluções nos experimentos de cinética enzimática (Figura 14).

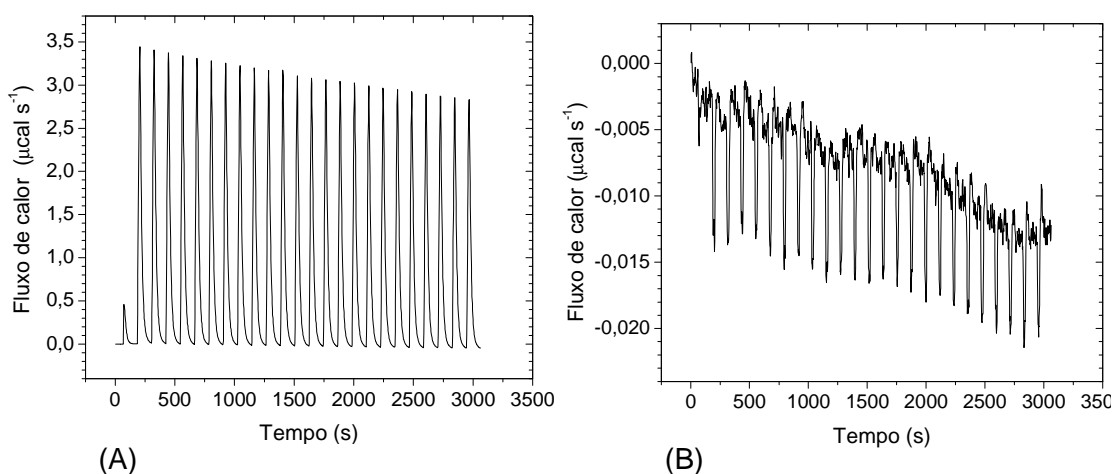


Figura 14. (A) Diluição endotérmica do G3P na solução tampão de ensaio cinético e (B) diluição exotérmica do tampão no tampão de ensaio cinético

Na Figura 14A, cada pico corresponde a uma injeção decorrente da titulação. O calor de diluição do G3P mostrou-se endotérmico e variou entre 3,0 e 3,5  $\mu\text{cal s}^{-1}$ . O calor de diluição do tampão (Figura 14B) foi exotérmico e variou entre  $-0,015$  e  $-0,020 \mu\text{cal s}^{-1}$ . Este calor de diluição é desprezível, sendo próximo ao limite de detecção do calorímetro ( $0,01 \mu\text{cal s}^{-1}$ ).

Um experimento semelhante à diluição do G3P foi realizado. Todos os componentes da reação estavam presentes na cela, exceto a enzima. A curva observada foi semelhante àquela encontrada na Figura 14A, evidenciando a inércia química dos reagentes na ausência da enzima.

Após a determinação dos calores de diluição, realizou-se o primeiro ensaio para a padronização do experimento. Os parâmetros experimentais foram escolhidos baseados em trabalhos encontrados na literatura.<sup>47,49</sup> Um dos testes iniciais, representativo para a discussão do comportamento observado, é demonstrado na Figura 15.

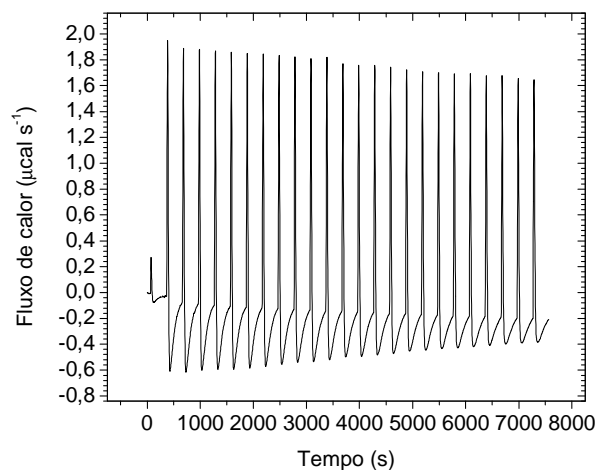


Figura 15. Gráfico representativo do ensaio cinético da enzima GAPDH, a concentração do G3P preenchido na seringa foi 0,6 mM, a concentração da enzima foi de 10 nM, o intervalo entre as injeções 120 s., a temperatura de 25 °C

Na determinação da velocidade de reação sob o mecanismo proposto por Michaelis-Menten é imprescindível que a reação se processe sob condições de estado estacionário. Para que a reação se processe sob essa condição, é necessária que a concentração do substrato seja pelo menos 1000 vezes maior que a concentração da enzima. Nesse experimento a concentração do substrato na primeira injeção foi de 4,20  $\mu\text{M}$  e ao final da última injeção era 105  $\mu\text{M}$ , ao passo que a concentração da enzima era de 10 nM.

Apesar do controle das concentrações dos substratos e da enzima da reação, a condição de estado estacionário não foi alcançada. Pode ser observado o calor da reação através do comportamento da linha base: após as injeções a linha base sobe devido à diluição do G3P, após o término das injeções ela retorna para um valor inferior ao do início do experimento devido à liberação de calor pela reação; em seguida a linha base volta acentuadamente a valores próximos ao zero inicial. Isso demonstra que o G3P foi consumido totalmente antes da próxima injeção.

Desta forma não foi possível à análise cinética da reação. Então, decidiu-se aumentar a concentração do G3P na seringa; assim a cada injeção a concentração

do substrato seria maior em relação ao experimento descrito anteriormente, e a reação se processaria continuamente até a próxima injeção, Figura 16.

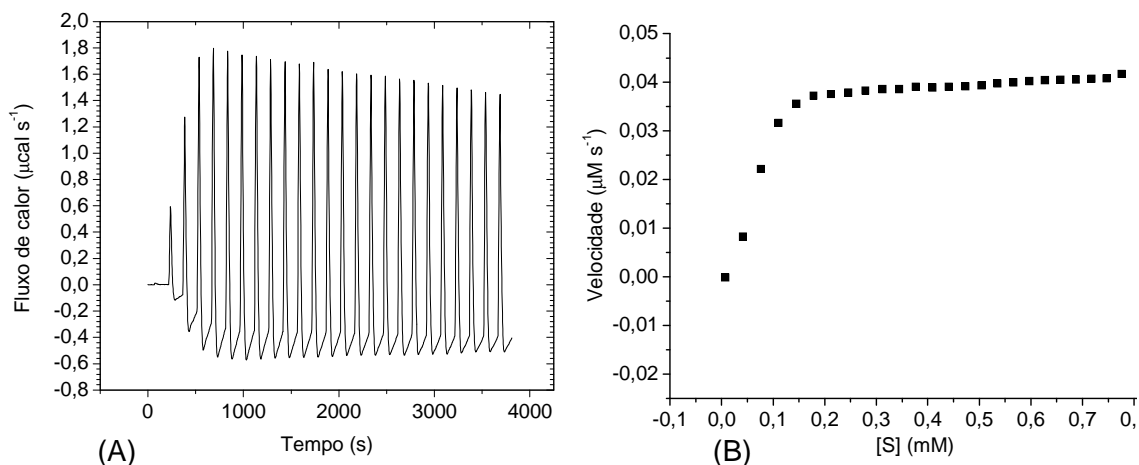


Figura 16. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten. A concentração do G3P preenchido na seringa foi de 3,0 mM, a concentração da enzima foi de 10 nM, o intervalo entre as injeções 120 s., a temperatura de 25 °C

Mesmo com o aumento da concentração do G3P o experimento mostrado na Figura 16 teve um comportamento semelhante ao mostrado anteriormente, Figura 15. A linha base manteve-se estável por mais tempo em relação ao experimento anterior, havendo a formação de pequenos patamares entre os picos. Os dados experimentais da velocidade foram ajustados à curva de Michaelis-Menten e as constantes determinadas foram  $k_{cat} = 2,69 \text{ s}^{-1}$  e  $K_M = 9,52 \mu\text{M}$ .

Ainda com o propósito de otimizar as condições experimentais, decidiu-se diminuir o intervalo entre as injeções para assegurar que a enzima estava saturada durante todo o experimento e se mantivesse sob condições de estado estacionário. Reduziram-se os intervalos entre as injeções para 60 segundos, e obteve-se uma curva com patamares entre os picos mais estáveis.

A análise cinética da curva segundo o mecanismo de Michaelis-Menten forneceu valores de  $k_{cat} = 5,24 \text{ s}^{-1}$  e  $K_M = 3,94 \mu\text{M}$ . O valor de  $k_{cat}$  aumentou em

relação ao experimento anterior, indicando um aumento da velocidade final da reação, ao passo que o valor de  $K_M$  indicando uma maior eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) da enzima nessa nova condição, Figura 17.

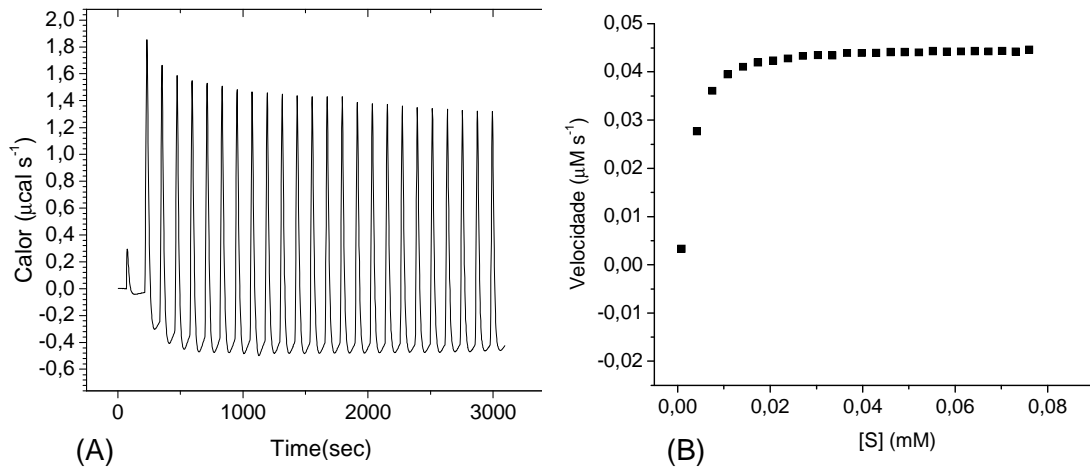


Figura 17. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten. A concentração de G3P preenchido na seringa foi 3,0 mM, a concentração da enzima 10 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C

Para confirmar a condição de estado estacionário, fundamental para análise cinética das reações segundo o mecanismo de Michaelis-Menten, o experimento acima foi repetido, mas com a concentração do G3P aumentada para 5 mM, Figura 18.

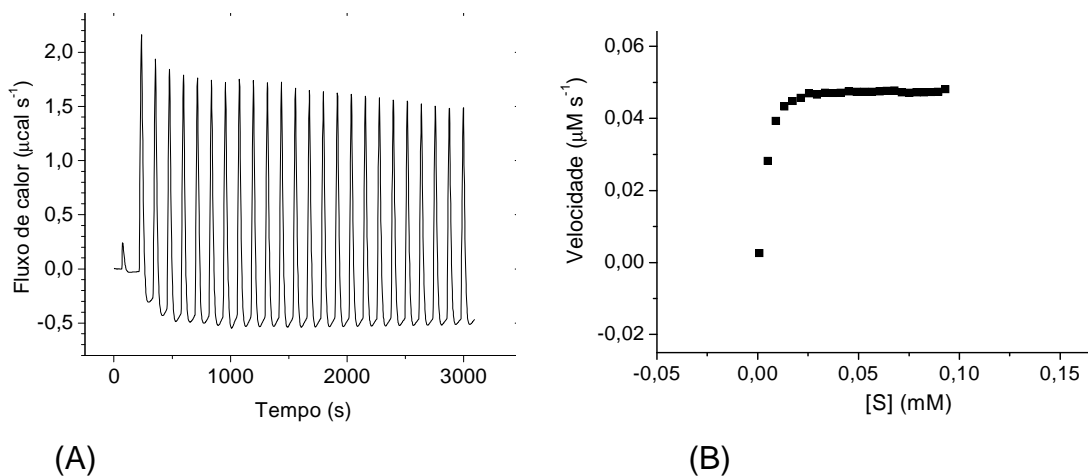


Figura 18. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten. A concentração de G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 10 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C



O resultado obtido foi semelhante ao experimento anterior, Figura 17. A análise cinética forneceu valores de  $k_{cat} = 5,79 \text{ s}^{-1}$  e  $K_M = 5,0 \text{ }\mu\text{M}$ . Isso comprova que durante a reação a enzima estava saturada, pois o aumento da concentração do substrato não aumentou a velocidade final da reação, assegurando assim a condição de estado estacionário para a mesma.

Através dessa série de experimentos foi possível estabelecer o protocolo de ensaio calorimétrico para a determinação das propriedades cinéticas da enzima GAPDH.

Há vários métodos para determinação cinética da atividade enzimática. Os mais utilizados são os espectroscópicos, potenciométricos e cromatográficos. Cada reação tem a necessidade de ser acompanhada por um método específico. O método calorimétrico é uma boa alternativa por ser baseado no calor, uma propriedade universal.<sup>62,63,64</sup>

Este protocolo desenvolvido mostra-se uma importante ferramenta na busca de novos inibidores da enzima GAPDH. Através de um único experimento (com duração de aproximadamente 30 minutos) é possível obter prontamente e acuradamente os valores das constantes de Michaelis-Menten ( $k_{cat}$  e  $K_M$ ). Outros métodos podem ser mais laboriosos, exigindo o preparo de soluções de substratos em várias concentrações diferentes para em seguida determinar as velocidades em cada concentração, aumentando o tempo de análise e erros operacionais.<sup>65</sup>

### 4.3 Verificação da inibição da reação catalisada pela enzima GAPDH pelo produto de reação

Muitas reações enzimáticas são inibidas pelo produto da reação<sup>66,67</sup>. Desta forma, é fundamental a verificação desse fenômeno no sistema. A reação da enzima GAPDH fornece como produtos 1-arseno-3-fosfoglicerato e NADH, que possuem estruturas químicas semelhantes aos seus correspondentes substratos G3P e NAD<sup>+</sup>. O resultado desse ensaio é mostrado na Figura 19.

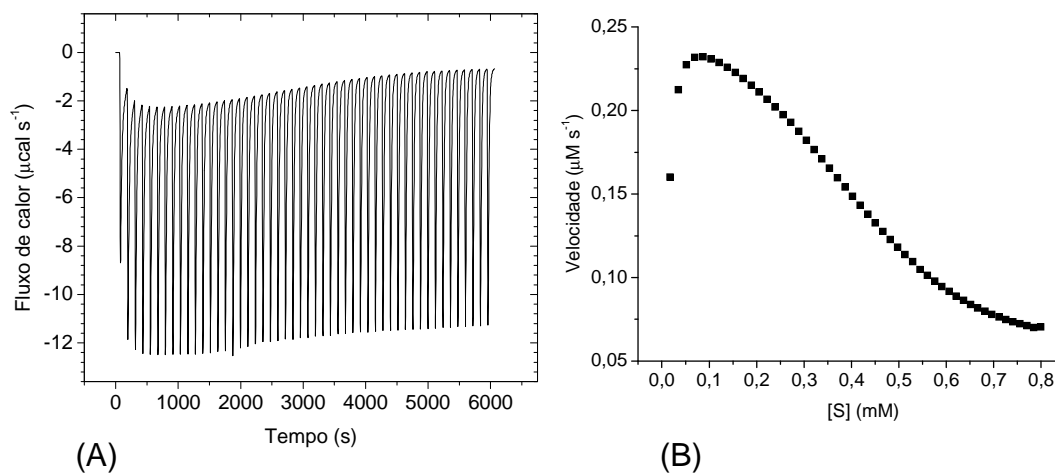


Figura 19. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH para a verificação da inibição da reação pelo produto. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten

Na curva de velocidade versus concentração do substrato, pode ser visto inicialmente um aumento da velocidade, em seguida um pequeno patamar onde a atinge-se um valor máximo e posteriormente um decréscimo, devido à inibição da reação à medida que aumenta a quantidade de produto formado no reator.

É conhecida a inibição da GAPDH de alguns organismos como *Geobacillus stearothermophilus*, *Glycine max*, *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* pelo NADH, que atua como um inibidor do sítio do NAD<sup>+</sup> na reação. Essas informações

associadas ao resultado obtido na Figura 19 levam à conclusão de que há inibição da reação pelo produto.<sup>68</sup>

É possível estudar a cinética enzimática por ITC através de dois métodos: método das injeções múltiplas e método da injeção simples (ver seção 1.5.1 para maiores detalhes).

O método da injeção simples é mais susceptível ao produto de inibição por este ser formado proporcionalmente à quantidade de substrato na cela. Nesse caso, após o consumo de 50 % do substrato na cela, a concentração do produto se torna maior que a do substrato. Conseqüentemente, a velocidade de reação diminui significativamente.

O método das injeções múltiplas é mais apropriado para o caso onde há inibição pelo produto. À medida que a reação se processa é formado o produto na cela, porém a concentração de substrato aumenta a cada injeção sendo sempre maior que a do produto, assim o efeito de inibição é minimizado.<sup>49,54</sup>

Neste ensaio (Figura 19), mostrou-se qualitativamente a inibição da reação em função do aumento da concentração de produto no reator. Desta forma foi escolhido como padrão de análise cinética dessa reação o método das injeções múltiplas.

## 4.4 Determinação do comportamento da enzima frente à adição de solventes

### 4.4.1 Determinação do comportamento da enzima frente à adição de dimetilsulfóxido

No processo de desenvolvimento de um fármaco é fundamental um método de ensaio que permita identificar compostos que possuam atividade farmacológica. Quase todos os processos no organismo humano são regulados pela ação de enzimas. Desta forma, um bioensaio que permita monitorar a ação enzimática tem um papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos.<sup>53</sup>

O método calorimétrico tem-se mostrado uma ferramenta importante para este propósito. Métodos espectrofotométricos são usados tradicionalmente para a identificação de novos inibidores, porém o método calorimétrico possui uma elevada qualidade nos dados cinéticos por várias razões: (1) a velocidade é determinada diretamente; (2) o ruído é constante ( $0,01\mu\text{cal s}^{-1}$ ) e menor que o calor produzido pela reação, como a reação de conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato vem produzindo  $0,6\mu\text{cal.s}^{-1}$  (ver experimentos anteriores) o sinal do ruído é cerca de 1,66 % o calor de reação; (3) no método das injeções múltiplas o calor medido é uma média das injeções, aumentando a precisão do experimento comparado a uma medida individual (quando é usado o método espectrofotométrico); (4) o substrato é adicionado de maneira automatizada em várias injeções na mesma cela onde está ocorrendo a reação, desta maneira erros operacionais são minimizados; (5) como o calor é uma medida universal é possível determinações em sistemas opacos ou

complexos; (6) não há necessidade de uma reação associada, as vezes produzida pela adição de uma segunda enzima; uma grande vantagem em relação aos métodos espectrofotométricos.<sup>49,54</sup>

A busca por novos inibidores freqüentemente enfrenta uma dificuldade em relação à baixa solubilidade dos ligantes em água, pois os ensaios de determinação de atividade biológica normalmente são feitos em tampões aquosos. Isso implica na necessidade do desenvolvimento de um método geral de ensaio que inclua o estudo de inibidores com baixa solubilidade.

O dimetilsulfóxido (DMSO) é o solvente padrão utilizado para estocagem e ensaios de substancias com atividade farmacológica potencial, devido a suas propriedades favoráveis à solubilização destes em água, baixa reatividade química e baixa pressão de vapor.<sup>69</sup>

Um estudo sistematizado foi realizado para avaliar a atividade da enzima GAPDH frente à adição dos co-solventes DMSO e metanol. Este último foi incluído neste estudo, pelas características de solubilização de compostos em água e ter demonstrado um aumento na atividade catalítica da enzima catalase (E.C. 1.11.1.6).<sup>70</sup>

Este estudo iniciou-se pela determinação do  $\Delta H_{app}$  da reação de conversão do gliceraldeído-3-fosfato a 1-arseno-3-fosfoglicerato catalisado pela enzima GAPDH em diferentes concentrações dos co-solventes.

A Figura 20 mostra as curvas de determinação do  $\Delta H_{app}$  na presença de DMSO, e as diluições da enzima nas soluções correspondentes.

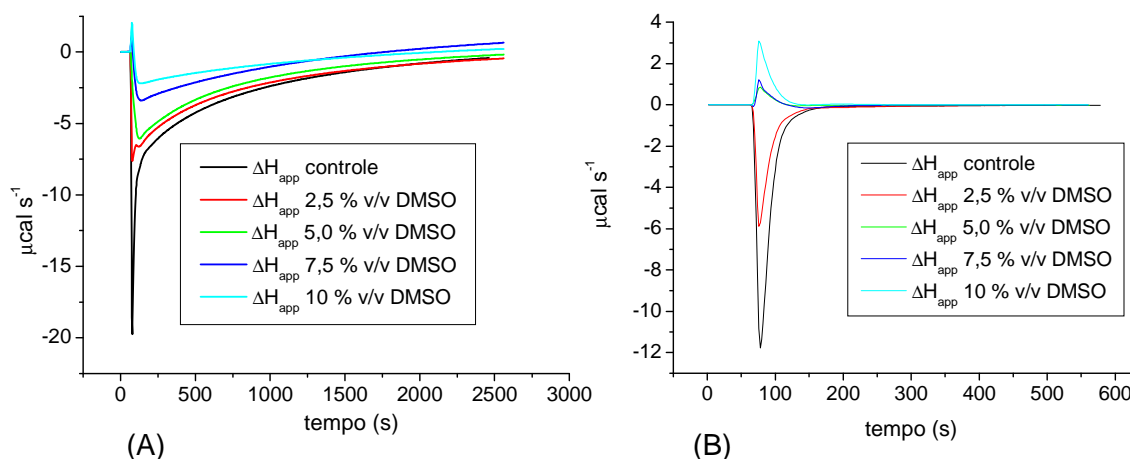


Figura 20. (A) Determinação da entalpia aparente da reação de conversão do gliceraldeído-3-fosfato a 1-arseno-3-fosfoglicerato catalisado pela enzima GAPDH na ausência (controle) e na presença de 2,5, 5,0, 7,5 e 10% v/v de DMSO e (B) determinação do calor de diluição da enzima nas soluções correspondentes

As entalpias aparentes ( $\Delta H_{app}$ ) foram determinadas conforme descrito na seção 4.1. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ) da reação de conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato catalisado pela enzima GAPDH em diferentes concentrações de DMSO

DMSO	controle	2,5 %	5,0 %	7,5 %	10 %
$\Delta H_{app}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$-7,36 \pm 0,35$	$-6,35 \pm 0,32$	$-5,76 \pm 0,12$	$-4,58 \pm 0,23$	$-3,47 \pm 0,17$

Pode ser observado na Tabela 2 que os valores de  $\Delta H_{app}$  mudam para valores menos negativos com o aumento da concentração de DMSO. O co-solvente adicionado na cela é um componente adicional no meio de reação e pode modificar o mecanismo de solvatação do substrato adicionado na cela, em relação ao experimento controle. Adicionalmente, a presença de dois grupos metilas confere lipofilia extra ao dimetilsulfóxido quando comparado com a água. Sua adição em aumentadas concentrações pode modificar o arranjo de ligações hidrogênio

intermoleculares ao derredor da enzima provocando assim a diminuição da entalpia aparente.

Com o aumento da concentração do DMSO na solução, houve uma inversão no calor de diluição da enzima, de exotérmico a endotérmico, evidenciando a interação do co-solvente com a enzima, o que pode acarretar em uma mudança estrutural da mesma.

Na Figura 21 é mostrado a curva do comportamento da  $\Delta H_{app}$  versus a concentração de DMSO.

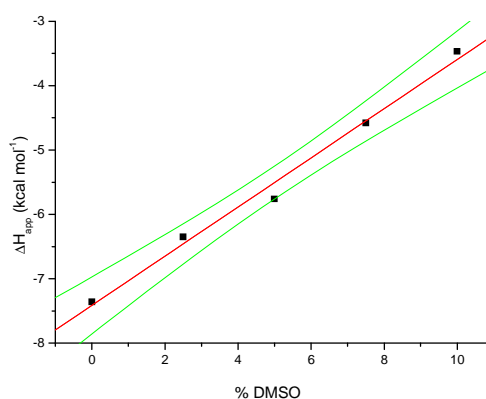


Figura 21. Relação linear de  $\Delta H_{app}$  versus a concentração de DMSO

O  $\Delta H_{app}$  frente à adição do DMSO mostra um comportamento linear. O limite de confiança é de 95%.

Após a determinação das entalpias aparentes ( $\Delta H_{app}$ ) em diferentes proporções de DMSO, e utilizando-se do protocolo desenvolvido previamente para o ensaio cinético da enzima GAPDH, fez um estudo da atividade da mesma frente à adição de diferentes concentrações do DMSO.

Experimentos cinéticos realizados previamente demonstraram uma mudança da atividade da enzima em relação ao período de estocagem da mesma. Por mais que fossem mantidas todas as condições experimentais, dois experimentos

realizados com a mesma enzima, em dias diferentes, apresentaram uma diminuição da atividade catalítica.

Para este estudo preparou-se um lote de enzima e utilizou-a sem estocá-la. Além disso, todos os experimentos foram realizados em seqüência para minimizar efeitos da perda da atividade enzimática.

A Figura 22 mostra o experimento controle, na ausência de co-solvente.

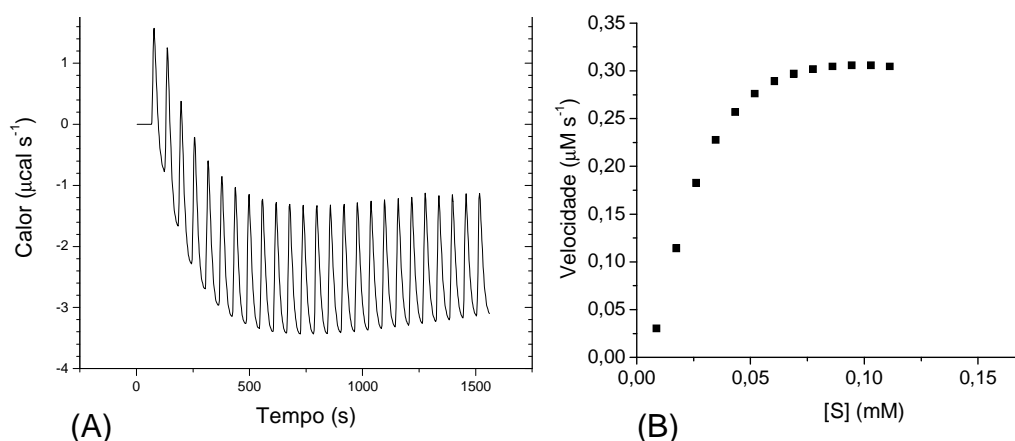


Figura 22. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH sem adição de co-solvente (controle). (B) Dados experimentais da velocidade ajustados a equação de Michaelis-Menten. A concentração de G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 5,0 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C

Os resultados experimentais obtidos para a velocidade foram ajustados graficamente à equação de Michaelis-Menten (Equação 6). Os pontos correspondentes à velocidade, após atingir a velocidade máxima, foram excluídos para evitar interferências pela inibição da reação do produto formado. Os valores determinados das constantes foram  $k_{cat} = 71,4 (\pm 2,4) \text{ s}^{-1}$  e  $K_M = 39,3 (\pm 3,9) \mu\text{M}$ ; o valor de entalpia ( $\Delta H_{app}$ ) utilizada para o cálculo foi à determinada previamente ( $-7,36 (\pm 0,35) \text{ kcal mol}^{-1}$ ).

Após o controle, foi realizado o experimento com a adição de 2,5 % v/v de DMSO na solução, Figura 23.



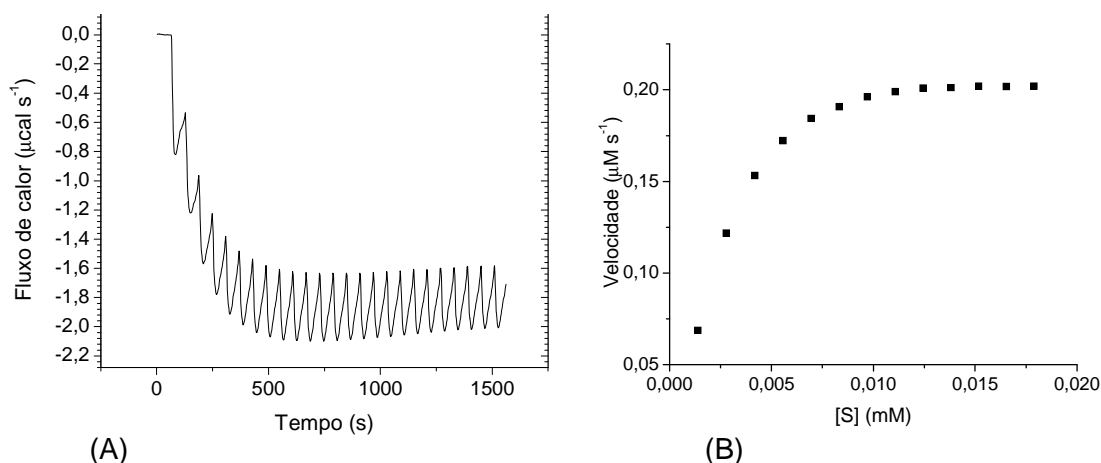


Figura 23. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH com a adição de 2,5 % v/v de DMSO. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados a equação de Michaelis-Menten. A concentração do G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 5,0 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C

Pode ser observada na Figura 23, uma significativa diminuição dos picos de diluição do G3P em relação ao experimento anterior. O DMSO possui um alto calor exotérmico de diluição, isso proporciona uma compensação com a diluição do G3P (endotérmico). Os valores das constantes nestes experimentos foram  $k_{cat} = 87,4 (\pm 2,1) \text{ s}^{-1}$  e  $K_M = 25,8 (\pm 2,13) \mu\text{M}$ . A o valor de  $\Delta H_{app}$  utilizada para os cálculos foi determinada previamente  $(-6,35 (\pm 0,32) \text{ kcal mol}^{-1})$ .

A constante catalítica ( $k_{cat}$ ) da reação teve um aumento de 8,02 % em relação ao experimento sem a adição do co-solvente, ao passo que  $K_M$  diminuiu. Isto leva a concluir que o DMSO altera a conformação da enzima e isto aumenta a afinidade da enzima pelo substrato. Como o DMSO pode ser considerado um osmólito<sup>71</sup> orgânico, ele pode favorecer a saída de moléculas de água do sítio catalítico da enzima e dessa forma facilitar a entrada do substrato. Isto pode ser assim postulado for força do fato que o valor de  $k_{cat}$  aumenta à custa da diminuição do valor de  $K_M$ . Ou seja, há melhor complementaridade substrato-enzima que favorece a estabilização do estado de transição e dessa forma a reação ocorre mais rapidamente.

O experimento na presença de 5,0 % v/v de DMSO é mostrado na Figura 24.

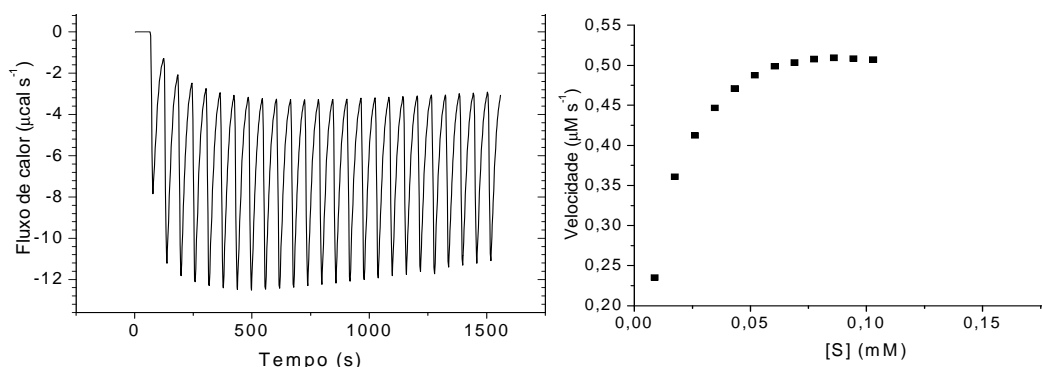


Figura 24. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH com a adição de 5,0 % v/v de DMSO. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten. A concentração do G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 5,0 nM, o intervalo entre injeções de 60 s e a temperatura 25 °C

O experimento mostra uma completa inversão nos picos de diluição do G3P, que passaram a ser altamente exotérmicos sugerindo alguma interação entre o G3P e o DMSO.

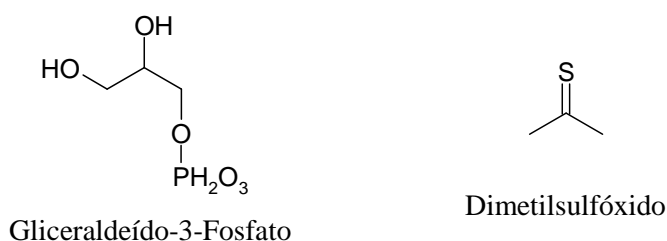


Figura 25. Representação das estruturas químicas do G3P e DMSO

O G3P possui na molécula três sítios susceptíveis a interação por doação de ligação hidrogênio e o DMSO possui um sítio receptor de interação de hidrogênio. As ligações hidrogênio são altamente exotérmicas e podem estar ocorrendo entre o DMSO e o G3P visto o alto calor de diluição do G3P adicionado à cela e a complementaridade entre os mesmos.

As constantes cinéticas nesse experimento foram  $k_{cat} = 118 (\pm 0,94) \text{ s}^{-1}$  e  $K_M = 10,8 (\pm 0,47) \mu\text{M}$ , o valor de  $\Delta H_{app}$  utilizada foi determinada anteriormente  $-5,76$

( $\pm 0,12$ ) kcal mol<sup>-1</sup>. A constante catalítica ( $k_{cat}$ ) teve um aumento de 29,4% em relação ao experimento controle enquanto  $K_M$  diminuiu.

O experimento realizado com 7,5% v/v de DMSO é mostrado na Figura 26.

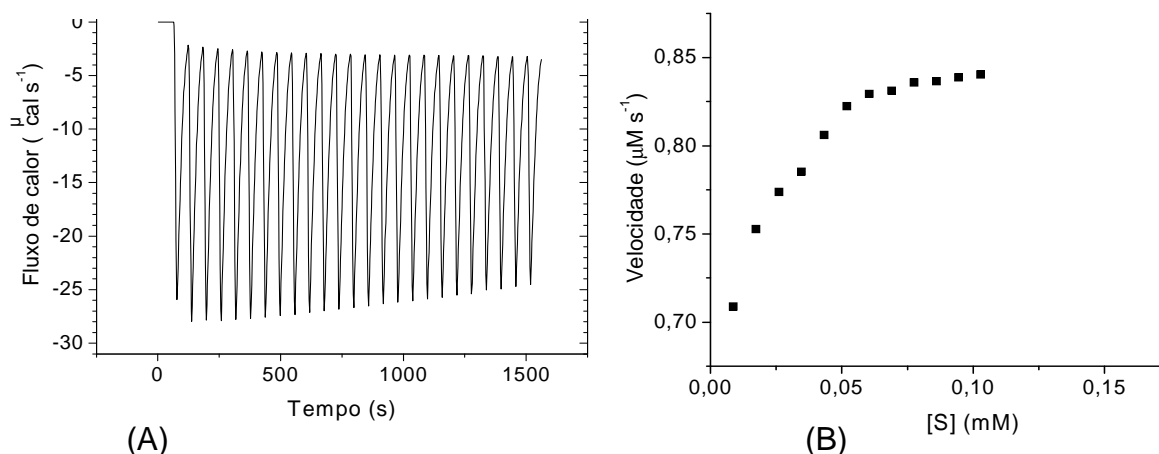


Figura 26. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH com a adição de 7,5 % v/v de DMSO. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados a equação de Michaelis-Menten. A concentração do G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 5,0 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C

Neste experimento o calor de diluição do G3P foi de aproximadamente -30  $\mu\text{cal s}^{-1}$ , valor próximo ao limite de detecção do aparelho (-36  $\mu\text{cal s}^{-1}$ )<sup>57</sup>. A curva de Michaelis-Menten foi comprometida em função deste fato, apresentando uma perda no ajuste. Os valores das constantes foram:  $k_{cat} = 176 (\pm 1,3) \text{ s}^{-1}$  e  $K_M = 3,71 (\pm 0,32) \mu\text{M}$ . A entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ) utilizada para os cálculos foi determinada previamente -4,58 ( $\pm 0,23$ ) kcal mol<sup>-1</sup>.

A enzima apresentou um acréscimo em sua atividade de 88%, assim representando à mesma tendência dos experimentos anteriores.

O experimento com 10% v/v de DMSO apresentou picos maiores que o limite de detecção do calorímetro, impossibilitando o ensaio cinético sob estas condições.

A Figura 27 mostra uma curva da eficiência catalítica da enzima versus a concentração do DMSO presente na solução.

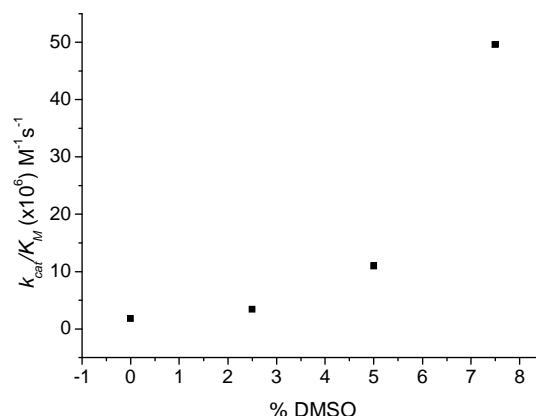


Figura 27. Curva da eficiência catalítica da enzima GAPDH versus concentração de DMSO

A eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) aumentou com a adição do DMSO. Trabalhos encontrados na literatura mostram uma dependência de algumas enzimas com a concentração do DMSO. Por exemplo, a enzima  $\beta$ -N-Acetyl-D-glucosaminidase (EC 3.2.1.52) tem sua atividade aumentada em baixas concentrações de DMSO, porém com o aumento do mesmo a enzima perde atividade.<sup>72,73</sup>

Através desse estudo adotou-se como método padrão para a análise cinética de inibidores por ITC a concentração de 5% v/v de DMSO. Nessas condições, a enzima tem sua atividade aumentada em relação ao experimento sem co-solvente, e permite um aumento na solubilidade em água de substâncias a serem testadas como possíveis inibidores da enzima.

Apesar da atividade da enzima a 7,5% v/v de DMSO ser maior que o experimento a 5 % v/v, essa condição foi descartada devido ao calor de diluição do G3P ficar muito próximo ao limite de detecção do calorímetro. Nesta condição, se houver interação entre o inibidor e o G3P, por exemplo, o calor de diluição pode ultrapassar o limite de detecção do calorímetro.

#### 4.4.2 Determinação do comportamento da enzima frente à adição de Metanol

O mesmo procedimento utilizado para o estudo do efeito do DMSO sobre a enzima GAPDH foi aplicado quando o metanol foi usado como co-solvente. A Figura 28 mostra a determinação da entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ) na presença do metanol.

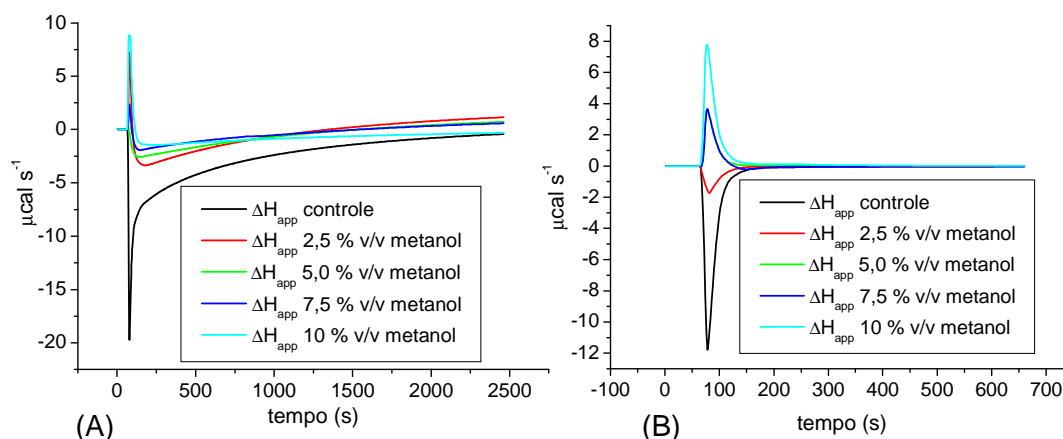


Figura 28. (A) Determinação da entalpia aparente da reação de conversão do gliceraldeído-3-fosfato a 1-arseno-3-fosfoglicerato catalisado pela enzima GAPDH ausência de co-solvente (controle) e na presença de 2,5, 5,0, 7,5 e 10% v/v de Metanol e (B) determinação do calor de diluição nas soluções correspondentes

Os valores de  $\Delta H_{app}$  foram calculados conforme descrito na seção 4.1, e podem ser encontradas na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ) da reação de conversão do G3P a 1- arseno-3-fosfoglicerato catalisado pela enzima GAPDH em diferentes concentrações de metanol

Metanol	controle	2,5 %	5,0 %	7,5 %	10 %
$\Delta H_{app}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	-7,36 ± 0,35	-2,93 ± 0,15	-2,21 ± 0,11	-1,99 ± 0,10	-1,58 ± 0,08

O valor da entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ) na presença de metanol teve uma diminuição em relação ao experimento controle. Embora o comportamento seja o mesmo relativo ao efeito do DMSO, as magnitudes dos valores da entalpia aparente são muito menores.

A Figura 29 demonstra o comportamento da  $\Delta H_{app}$  versus a concentração de metanol.

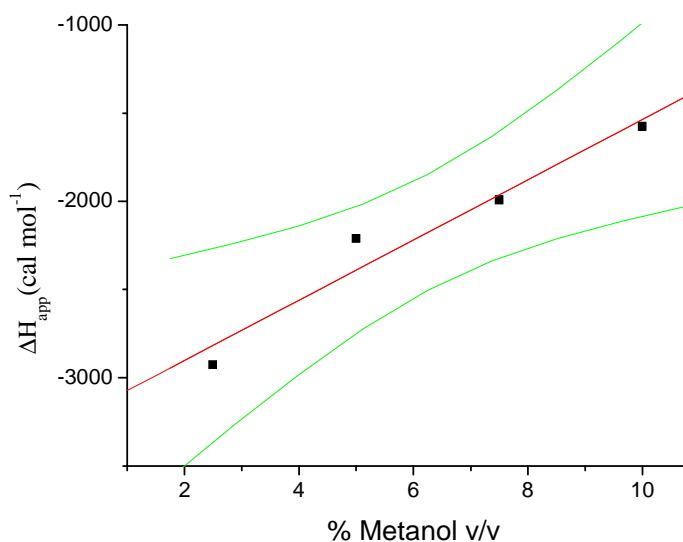


Figura 29. Relação linear da entalpia aparente ( $\Delta H_{app}$ ) versus a concentração de metanol

O metanol, mesmo em baixas quantidades, provoca um grande efeito na  $\Delta H_{app}$  da reação como pode ser visto na Figura 28. Quando adicionado 2,5% v/v de metanol na solução a  $\Delta H_{app}$  mudou de  $-7,36 (\pm 0,35)$  kcal mol<sup>-1</sup> para  $-2,93 (\pm 0,35)$  kcal mol<sup>-1</sup>. A partir da primeira adição de metanol a  $\Delta H_{app}$  teve um comportamento linear.

O calor de diluição da enzima tem uma inversão de exotérmico para endotérmico com o aumento da concentração do metanol na solução.

Os picos da diluição da enzima nas concentrações de 7,5 e 10% v/v podem ser observados nos experimentos de determinação da  $\Delta H_{app}$  de reação, por serem mais pronunciados em relação as menores proporções do co-solvente. Logo no início do experimento, a linha base se desloca a valores positivos, característico da diluição. Em seguida a linha base decresce, devido ao calor liberado pela reação. O final da reação é observado quando a linha base retorna ao zero inicial.

As mudanças de comportamento do calor diluição da enzima, nas soluções contendo metanol, são um indicativo de que ocorrem interações entre os mesmos, implicando em uma mudança na atividade catalítica da enzima. Isto pode ser observado nos experimentos de ensaio cinético descritos a seguir.

Na Figura 30 é mostrado o experimento com a adição de 2,5% v/v de metanol na solução. O experimento controle realizado na ausência do co-solvente é o mesmo da seção 4.4.1

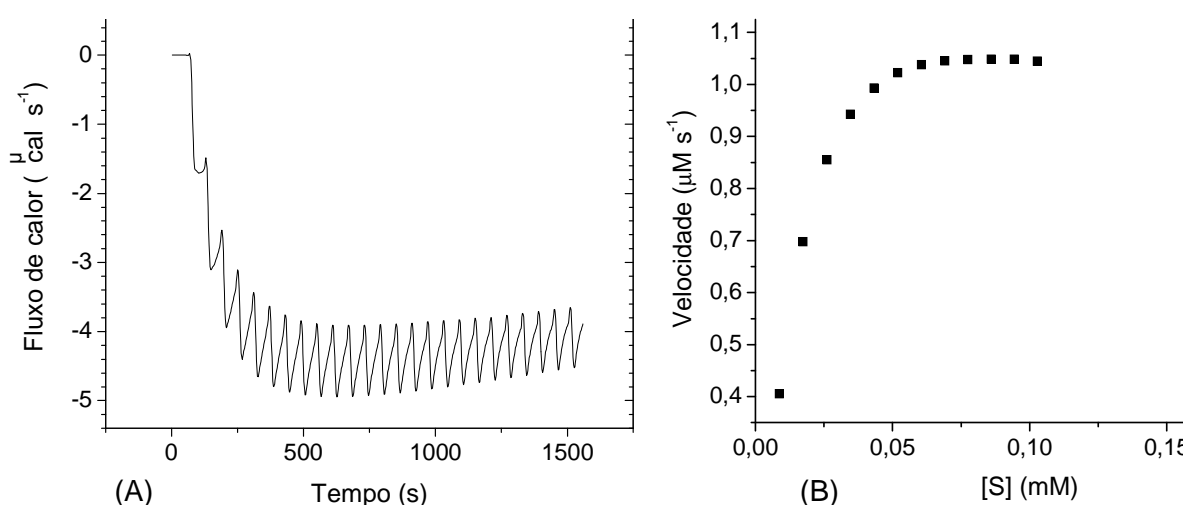


Figura 30. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH com a adição de 2,5 % v/v de Metanol. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados à equação de Michaelis-Menten. A concentração do G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 5 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C.

A diluição do G3P teve uma diminuição em relação ao experimento controle. Isto sugere a ocorrência de interações altamente energéticas entre o G3P e o metanol. A molécula de G3P, conforme previamente discutido, possui seis sítios doadores e três receptores de ligação hidrogênio, ao passo que a molécula de metanol possui apenas um sítio doador e um receptor. Essa complementaridade, associada ao resultado experimental, sugere a interação entre as duas moléculas por ligação hidrogênio.

Os resultados da análise cinética, realizada conforme descrito para o experimento controle, forneceram os valores de  $k_{cat} = 249 (\pm 5) \text{ s}^{-1}$  e  $K_M = 11,7 (\pm 4,8) \mu\text{M}$ , o valor de  $\Delta H_{app}$  utilizada para o cálculo foi determinada previamente  $-2,93 (\pm 0,95) \text{ kcal mol}^{-1}$ . O metanol aumentou o valor da  $k_{cat}$  em 177%, mostrando um significativo aumento na atividade da enzima.

O experimento na presença de 5,0% v/v de metanol é mostrado na Figura 31.

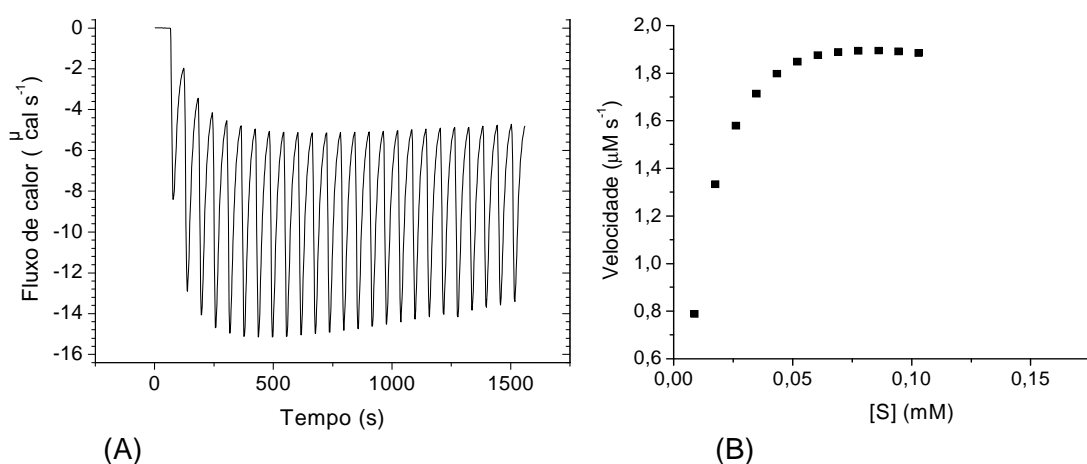


Figura 31. (A) Curva do calor trocado no ensaio cinético da enzima GAPDH com a adição de 5,0 % v/v de metanol. (B) Dados experimentais da velocidade ajustados a equação de Michaelis-Menten. A concentração do G3P preenchido na seringa foi 5,0 mM, a concentração da enzima 5,0 nM, o intervalo entre injeções de 60 s, e a temperatura 25 °C

Neste experimento ocorreu a inversão dos picos de diluição do G3P decorrente da interação com o metanol. A análise cinética segundo o modelo de Michaelis-Menten forneceu os valores de  $k_{cat} = 442 (\pm 6) \text{ s}^{-1}$  e  $K_M = 10,2 (\pm 0,8) \mu\text{M}$ ; o valor de  $\Delta H_{app}$  utilizado para este experimento foi determinado anteriormente  $-2,21 (\pm 0,11) \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Trabalhos demonstraram que enzimas como a poli(ADP-ribose) polimerase-1 (E.C. 2.4.2.30) têm sua atividade aumentada em 82% na presença de 20% v/v de metanol<sup>74</sup>, enquanto a atividade da enzima tirosinase (EC 1.14.18.1) mantém-se quase constante até os 40% v/v de metanol. Após esse valor ele passa a inibir a reação.<sup>75</sup>



O valor de  $k_{cat}$  para a GAPDH teve um aumento de 390% em relação ao experimento controle (sem co-solvente), um significativo aumento da atividade catalítica. Esse resultado, aliado à observação da diminuição de  $K_M$  com o aumento da concentração de metanol, sugere que este solvente também facilita a saída de moléculas de água do sítio ativo da enzima, facilitando assim a entrada do substrato e aumentando a afinidade da enzima por ele. Sua capacidade osmolítica pode ser então avaliada como favorável ao aumento da atividade enzimática já que há aumento do valor de  $k_{cat}$  como função da diminuição de  $K_M$ .

Os experimentos com a adição de 7,5 e 10 % v/v de metanol tiveram o calor de diluição do G3P maiores que o limite de detecção do calorímetro (dados não mostrados), impossibilitando o estudo sob estas condições.

A Figura 32 mostra a eficiência catalítica da enzima em função do aumento do metanol na solução.

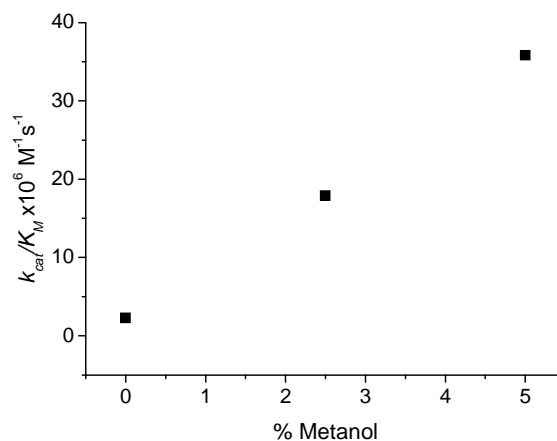


Figura 32. Curva da eficiência catalítica da enzima GAPDH versus concentração de metanol

A eficiência catalítica da enzima teve um aumento linear com o aumento da concentração do metanol, nas condições em que foram realizados os experimentos.

Os experimentos na presença dos dois co-solventes aumentaram a atividade da enzima. Como houve um aumento da atividade catalítica com uma diminuição do

$K_M$ , e pelo pequeno tamanho das moléculas dos co-solventes em relação ao tamanho do sítio catalítico, pode-se inferir que estas moléculas estão facilitando a saída de moléculas de água do sítio ativo enzimático.

Moléculas que possuem características hidrofóbicas acentuadas, normalmente são pouco solúveis em água. A solubilidade é uma característica fundamental a ser avaliada no processo de descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco e está estritamente relacionada à absorção deste pelo organismo humano.

O trabalho de Lipinski chama a atenção para o fato de que um fármaco tem sua absorção limitada por sua solubilidade em água quando administrado por via oral: quanto maior a solubilidade do composto menor a absorção<sup>76</sup>. Por outro lado, moléculas insolúveis em água não podem ser administradas oralmente. Apesar da facilidade de permeação através das membranas celulares, as concentrações destes compostos disponíveis para a absorção não atinge quantidades suficientes para a resposta terapêutica.

Deste modo, são desejáveis candidatos que possuam um balanço entre características hidrofílicas e hidrofóbicas, garantindo um mínimo de solubilidade em água e permeabilidade nas membranas celulares.<sup>76</sup>

Assim, os métodos propostos para os ensaios cinéticos com a enzima GAPDH de *T. cruzi*, em soluções contendo 5,0 % de DMSO ou metanol, mostram-se apropriados para a busca de inibidores enzimáticos que possuam determinadas características de solubilidade e permeabilidade celular, uma etapa fundamental na busca de moléculas bioativas contra o parasito.

#### 4.5 Determinação do Erro Experimental

Após a obtenção e padronização protocolo experimental, realizaram-se os cálculos do erro experimental. Esse resultado é mostrado na Figura 33.

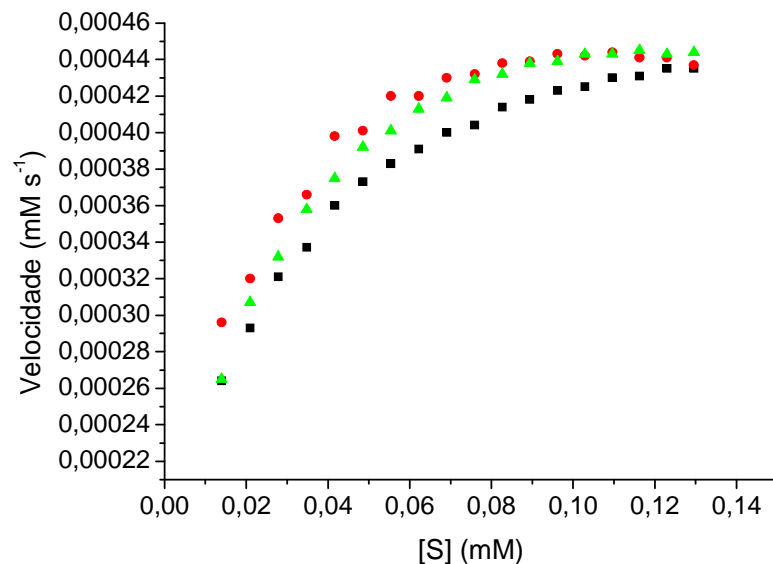


Figura 33. Experimentos controles realizados nas mesmas condições para a avaliação do erro experimental. Os dados experimentais foram ajustados graficamente na curva de Michaelis-Menten e as constantes foram calculadas por ajuste não-linear

Os valores das constantes de velocidade são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores das constantes de Michalis-Menten para três experimentos controle utilizados para a estimativa do erro experimental

	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu M$ )
Controle 1	99,5	14,7
Controle 2	102	11,2
Controle 3	101	15,0

A partir dos valores de  $k_{cat}$  e  $K_M$  fez-se uma análise estatística para estimar os valores médios das medidas ( $\bar{x}$ ), o desvio padrão (s), o erro padrão (EP) e o coeficiente de variância (CV), segundo as equações:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Equação 20

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Equação 21

$$EP = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Equação 22

$$CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

Equação 23

Os valores estatísticos calculados para  $k_{cat}$  e  $K_M$ , a partir das Equações 20, 21, 22 e 23 são mostrados na Tabela 5. O programa utilizado para os cálculos foi o WebCalc (versão online)<sup>77</sup>.

Tabela 5. Valores da análise estatística das constantes e Michaelis-Menten determinadas nos ensaios cinéticos

	$k_{cat}$	$K_M$
Média ( $\bar{x}$ )	100 (s <sup>-1</sup> )	13,6 (μM)
Desvio Padrão (s)	1,26 (s <sup>-1</sup> )	2,11 (μM)
Erro Padrão (EP)	0,73 (s <sup>-1</sup> )	1,22 (μM)
Coeficiente de Variância (CV)	1,25 %	15,5 %

Os valores médios são representativos nas duas medidas; o erro observado nos valores de  $k_{cat}$  é menor em relação ao erro do  $K_M$ .

#### 4.6 Ensaios de Inibição Enzimática

Após o estabelecimento do protocolo dos ensaios cinéticos contra a enzima GAPDH de *T. cruzi*, candidatos a inibidores foram selecionados por métodos de planejamento computacional baseado na estrutura do receptor e do ligante para os testes de inibição.

O planejamento molecular foi parte integrante do trabalho, referente ao estágio de pós-doutorado, da Professora Doutora Maria Goretti de Vasconcelos Silva, intitulado “Métodos de reconhecimento molecular de produtos naturais como agentes tripanossomicidas” realizado no Instituto de Química de São Carlos (2006-2007).

Os compostos escolhidos são pertencentes a diferentes classes químicas. As estruturas estão apresentadas na Figura 34.

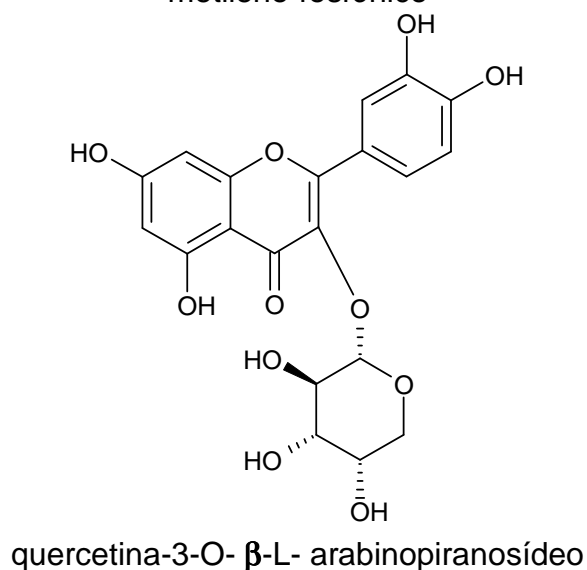
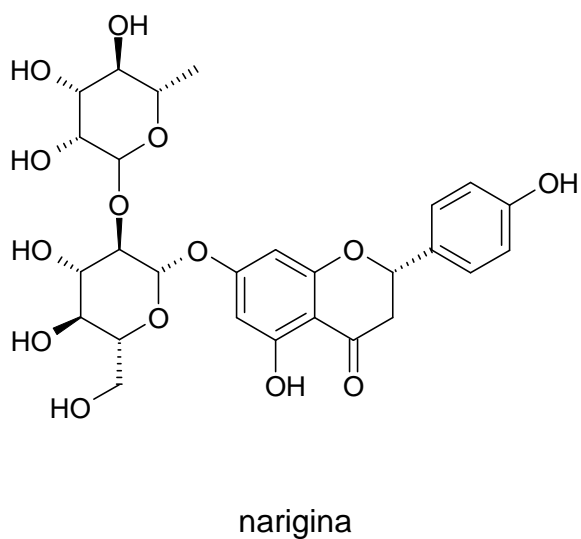
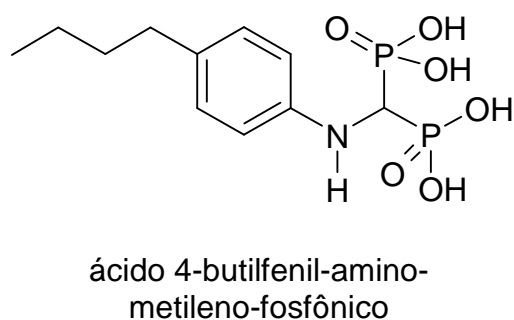
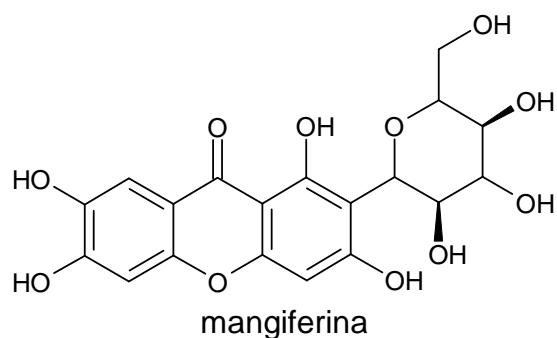
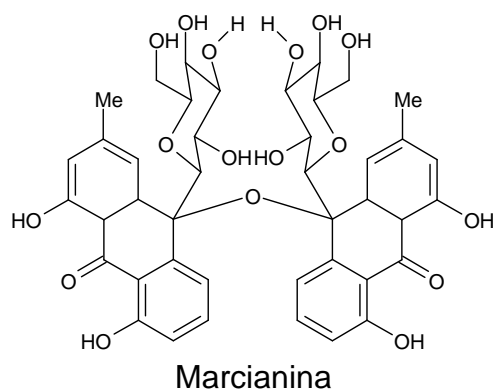
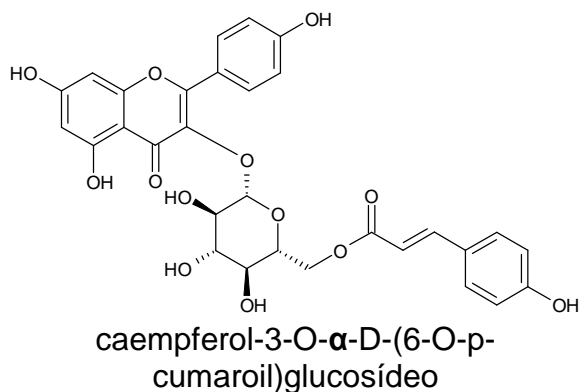


Figura 34. Representação das estruturas químicas dos compostos testados contra a enzima GAPDH por ITC

Durante os ensaios enzimáticos, foram observadas perda na atividade catalítica em função do tempo de estocagem. Isso representa um problema na avaliação da inibição enzimática, pois substâncias testadas em diferentes dias ou usando diferentes preparações enzimáticas, podem gerar dados não comparáveis,

devido à incerteza da velocidade catalítica, se esta foi ou não alterada em função da perda da atividade da enzima ou pela presença do inibidor.

O método utilizado para resolver este problema foi realizar um experimento controle na ausência do inibidor previamente ao teste de inibição. A constante de inibição ( $K_i$ ) é calculada em relação a esse experimento controle. Assim, os dados gerados podem ser comparados entre si mesmo que sejam realizados em dias diferentes. Esta característica é ímpar na titulação calorimetria isotérmica e torna-a recomendável para a determinação de valores de constantes de afinidade ( $K_a$ ), também comparáveis com medidas inter-laboratórios.

A Figura 35 mostra a curva de Michaelis-Menten do controle e da marcianina, utilizada para este estudo.

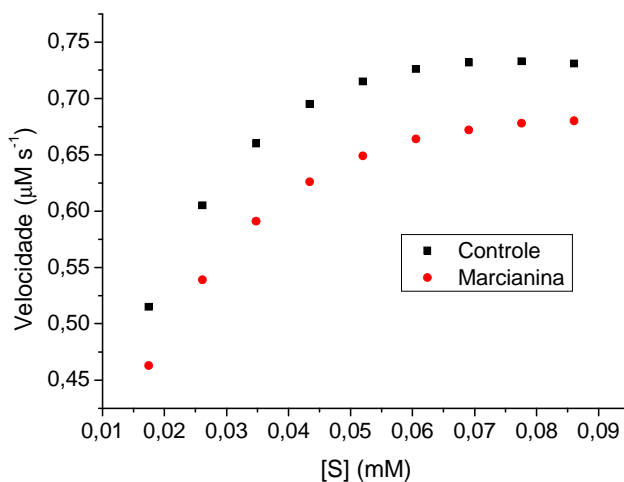


Figura 35. Teste de inibição da enzima GAPDH com Marcianina (50µM). A curva em preto representa o experimento controle e o vermelho o de inibição. Os dados obtidos experimentalmente para a velocidade foram ajustados à equação de Michaelis-Menten

A análise gráfica, juntamente com os dados da Figura 35, mostra a alteração no valor de  $k_{cat}$  enquanto  $K_M$  manteve-se constante, indicando a inibição da enzima por um mecanismo não competitivo. Desta forma foi calculada a constante de inibição ( $K_i$ ), bem como os valores de  $k_{cat}$  e  $K_M$ , através do ajuste não linear da curva de Michaelis-Menten, para inibidores não competitivos.

A Tabela 6 traz a comparação entre os parâmetros determinados com um intervalo de 4 dias entre os experimentos. O mesmo lote de enzima foi utilizado. A enzima foi estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$  no período de intervalo entre os experimentos.

Tabela 6. Experimento comparativo de inibição da enzima GAPDH realizado em dias diferentes. O inibidor utilizado foi a marcianina. O período de tempo entre os ensaios foi de 4 dias

	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
Controle 1	177 ( $\pm 2$ )	11,8 ( $\pm 0,7$ )	-
Marcianina 1	156 ( $\pm 3$ )	10,6 ( $\pm 0,9$ )	28,4 ( $\pm 0,5$ )
Controle 2	117 ( $\pm 1$ )	12,5 ( $\pm 1,1$ )	-
Marcianina 2	105 ( $\pm 1$ )	14,6 ( $\pm 0,4$ )	26,2 ( $\pm 0,8$ )
Valores médios das medidas	-	12,4 ( $\pm 1,7$ )	27,3 ( $\pm 1,5$ )

Através da comparação dos valores de  $k_{cat}$  dos experimentos controles 1 e 2, onde o controle 1 foi o experimento realizado anteriormente ao controle 2, a diminuição da atividade enzimática pode ser observada, comparando-se os valores de  $k_{cat}$ . Os valores de  $K_M$  mantiveram-se muito próximos em todos os experimentos, mesmo na presença do inibidor. Os valores da constante de inibição determinados foram muito próximos, apesar da atividade da enzima ser diferente.

Este estudo demonstra que os resultados gerados pelo método calorimétrico são comparáveis entre si independentemente da atividade enzimática. Isto permite a geração de um banco de dados com informações da constante de inibição e estrutura química de compostos testados contra a enzima GAPDH. Dados robustos como estes são fundamentais para estudos quantitativos entre a atividade biológica e a estrutura química dos inibidores (QSAR), utilizado para a otimização de compostos.



Tendo-se estabelecido às condições necessárias para os experimentos, realizaram-se os estudos de inibição com os compostos da Figura 34. A Figura 36 mostra as curvas de Michaelis-Menten para cada composto.

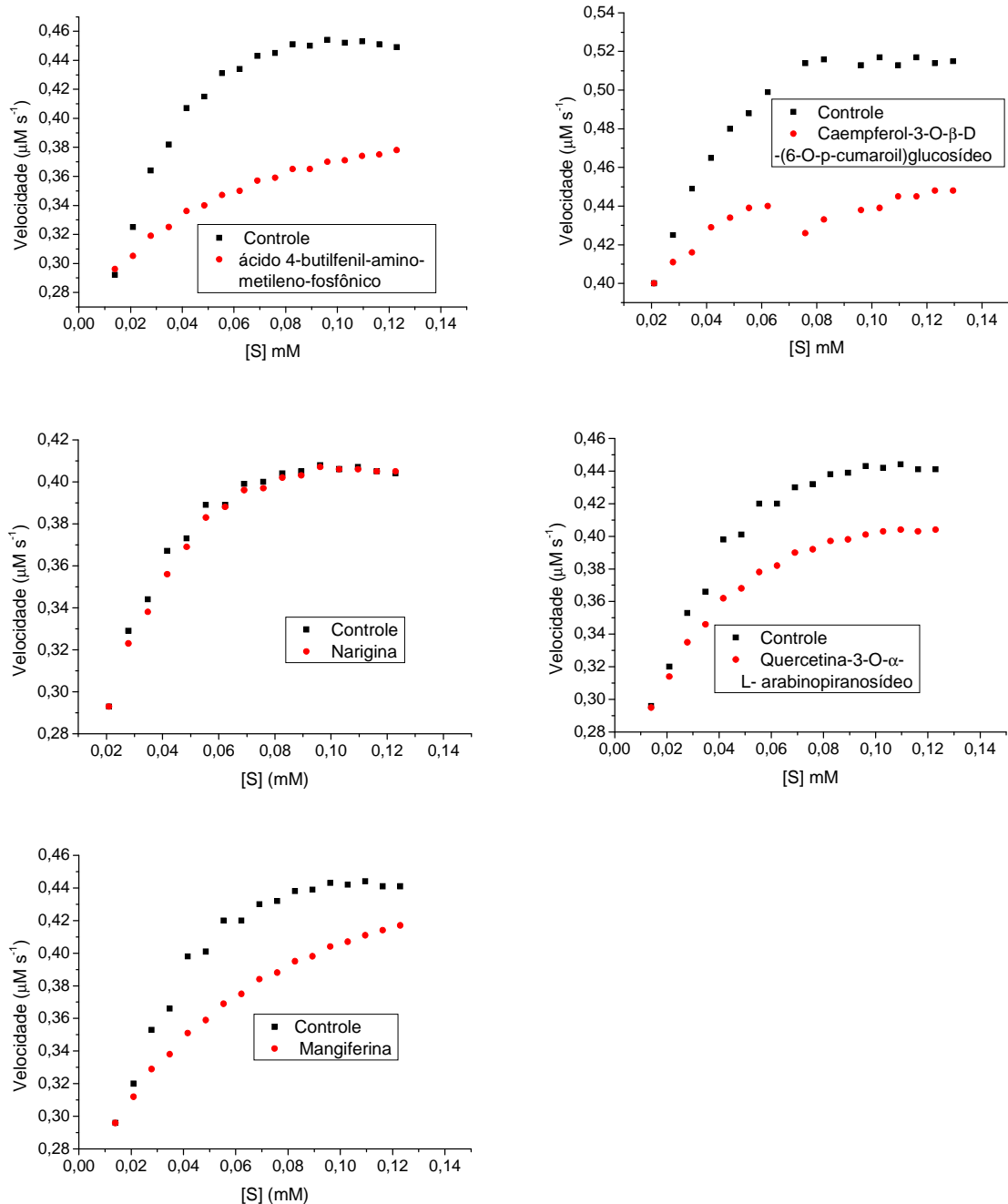


Figura 36. Curvas de Michaelis-Menten dos ensaios de inibição. As curvas controle de cada experimento são apresentadas junto com as curvas de inibição. A concentração dos inibidores foi mantida em 50  $\mu\text{M}$ . Todos foram adicionados à cela de amostra junto à enzima

A partir do ajuste não linear à curva de Michaelis-Menten, das curvas de inibição, determinou-se a constante de inibição para cada inibidor (Tabela 7). A análise do mecanismo de inibição dos compostos foi realizada segundo o modo não competitivo, devido a alteração dos valores observados para  $k_{cat}$  e os valores de  $K_M$  se manterem muito próximos. Além disso, a análise gráfica das curvas da Figura 36 mostra o perfil desse tipo de inibição.

Tabela 7. Valores da constante de inibição ( $K_i$ ) para os compostos testados contra a enzima GAPDH de *T. cruzi*

<b>Substância</b>	<b><math>K_i</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
ácido 4-butilfenil-amino-metileno- fosfônico	20,1 ( $\pm 1,7$ )
mangiferina	20,9 ( $\pm 0,9$ )
quercetina-3-O- $\beta$ -L- arabinopiranosídeo	23,8 ( $\pm 2,9$ )
caempferol-3-O- $\alpha$ -D-(6-O-p- coumaroyl)glucosídeo	24,6 ( $\pm 0,8$ )
marcianina	27,3 ( $\pm 2,4$ )
narigina	Não inibiu

Todos os compostos testados apresentaram uma potência em baixas concentrações micromolares, exceto a narigina que não inibiu a enzima.

A quercetina foi testada, in vivo, diretamente contra o parasito na forma tripomastigota. O  $\text{IC}_{50}$  determinado foi  $187 \mu\text{M}$ <sup>78</sup>. Esse estudo não traz informações a respeito do mecanismo de ação do composto contra o parasito. Desta forma, através do teste de inibição da GAPDH, pode-se inferir que há a possibilidade da quercetina estar agindo na via glicolítica do parasito.

Para mangiferina não é relatado qualquer teste contra o *T. cruzi*. Entretanto, foi demonstrada eficácia deste composto contra o parasito *Leishmania* em camundongos e sua formulação para combater e prevenir infecções parasitárias. O

parasito causador da leishmaniose pertence à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae*<sup>79</sup>, os mesmos do *T. cruzi*. Também não foram encontrados relatos de testes de xantonas contra a GAPDH na literatura. Assim, através destes ensaios de inibição demonstrou-se o potencial tripanossomicida desta classe molecular.

A estrutura cristalográfica da enzima co-cristalizada com um análogo do gliceraldeído-3-fosfato foi determinada evidenciando dois sítios de interação para o fosfato<sup>80</sup>. Esses dados dão suporte aos resultados encontrados para o ácido 4-butilfenil-amino-metileno-fosfônico, sendo o sítio do fosfato uma possível região de interação entre o composto e a enzima. Além disso, vários compostos difosfonatos foram testados contra *Plasmodium falciparum* mostrando a potencialidade deles contra infecções parasitárias.<sup>81</sup>

A marcianina é uma substância inédita, que foi caracterizada no Departamento de Química Analítica e Físico Química na Universidade Federal do Ceará (dados não publicados). Algumas antraquinonas, classe a qual pertence à marcianina, mostraram-se ativas contra o parasito tripanossomatídeo na forma tripomastigota.<sup>82</sup> A elevada afinidade da marcianina pela GAPDH sugere que essa classe molecular pode ser útil para estudos ulteriores e para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos.

Vários flavonóides têm apresentado atividade contra a enzima GAPDH de *T. cruzi*.<sup>83</sup> O caempferol-3-O- $\alpha$ -D-(6-O-p-coumaroyl)glucosídeo mostrou-se também potente contra a enzima. O grupamento glicosídico da molécula confere uma maior solubilidade do composto em água, sendo uma boa alternativa na otimização de propriedades farmacocinéticas dos compostos.

Através da ITC foi possível identificar cinco inibidores da enzima GAPDH de *T. cruzi*. Estes compostos são promissores para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos.

Além disso, a ITC mostrou-se um excelente método para a busca de novos compostos bioativos contra o *T. cruzi*. Através das curvas de inibição e os valores observados das constantes da equação de Michaelis-Menten foi possível identificar o mecanismo de inibição dos compostos. Essa informação é imprescindível na otimização dos compostos por métodos de modelagem molecular, como QSAR, por exemplo.

## 5 CONCLUSÕES

A doença de Chagas teve sua etiologia descrita em 1909, pelo médico sanitarista Carlos Chagas. Quase cem anos após esse ocorrido ainda não existem medicamentos eficazes contra esta doença que acomete milhões de pessoas em toda a América Latina.

Este presente trabalho teve como objetivo dar uma contribuição para o processo de descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco contra a doença de Chagas através da inibição de uma das enzimas-chave da via glicolítica do *T. cruzi*, o agente causador da doença.

O método escolhido para os bioensaios foi a Titulação Calorimétrica Isotérmica ultra-sensível, uma técnica reprodutível e acurada que fornece informações termodinâmicas e cinéticas de processos biológicos.

Desta maneira foi estabelecido um protocolo de ensaio cinético para monitorar a velocidade de reação da conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato catalisado pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *T. cruzi*. Essa é uma importante enzima da via glicolítica do parasito estabelecida como um alvo putativo para o desenvolvimento de fármacos contra a doença.

No ensaio cinético realizado por ITC é possível determinar as constantes de Michaelis-Menten ( $k_{cat}$  e  $K_M$ ), e desta forma monitorar a atividade enzimática, através de um único experimento.

A entalpia aparente de reação foi determinada ( $-7,36 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), apresentando um valor exotérmico. Essa informação é imprescindível na determinação atividade da enzima.

Através do protocolo desenvolvido para os ensaios cinéticos, realizou-se um estudo para avaliar a atividade da enzima GAPDH na presença de diferentes concentrações de dois co-solventes padrões (dimetilsulfóxido e metanol) utilizados em bioensaios. A enzima mostrou-se ativa na faixa de concentração (0 a 10 % v/v) dos ensaios realizados. A concentração de 5 % v/v dos dois co-solventes foi escolhida devido à enzima apresentar um aumento da capacidade catalítica em relação aos experimentos sem co-solvente. Este estudo é importantíssimo na busca de novos inibidores por permitir testes de compostos com baixa solubilidade em água, um problema comum encontrado nos bioensaios.

A atividade da enzima apresenta diferenças em relação a diferentes lote de produção, pois o processo de produção e purificação é longo e pouco reprodutível. Além disso, a atividade da enzima varia em função do tempo de estocagem. Isto representa um problema na avaliação da inibição da enzima, pois é difícil determinar as variações da atividade enzimática em função destes fatores ou pela presença do inibidor. O método empregado para resolver este problema foi determinar a atividade da enzima previamente ao ensaio de inibição. Foi demonstrado desta forma, que variações da atividade enzimática não alteram a constante de inibição ( $K_i$ ).

Através do método cinético empregado, além de determinar  $K_i$ , é possível determinar o mecanismo de inibição dos compostos contra a enzima GAPDH.

Após ter estabelecido as condições para os ensaios com a enzima, seis compostos foram testados para a determinação de  $K_i$ . A narigina não mostrou atividade contra a enzima. O ácido 4-butilfenil-amino-metileno-fosfônico, mangiferina, quercetina-3-O- $\beta$ -L-arabinopiranosídeo, caempferol-3-O- $\alpha$ -D-(6-O-p-coumaroyl)-glucosídeo e marcianina apresentaram elevada afinidade pela enzima com suas constantes de inibição variando entre 20,1 ( $\pm 1,70$ ) e 27,3 ( $\pm 2,47$ )  $\mu\text{M}$ .

Dentre os compostos que apresentaram atividade contra a enzima, está uma xantona (mangiferina). Não há registros na literatura de ensaios desta classe molecular contra a GAPDH, dessa maneira seria interessante a busca de novos inibidores dessa classe molecular.

Uma das perspectivas deste trabalho estabelece-se pela possibilidade de que futuramente o método calorimétrico proposto seja amplamente empregado no planejamento de novos inibidores. Utilizando-se os ensaios de inibição pode ser construído um banco de dados com moléculas de fontes naturais ou sintéticas que contenha as estruturas químicas e as constantes de inibição. Essas informações são importantíssimas para o planejamento e otimização de moléculas potentes contra o *T. cruzi*.

## 6. REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L.; FOYE, W. O. **Foye's principles of medicinal chemistry**. Lippincott: Williams & Wilkins, 2002. 1128p.
- <sup>2</sup> SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of drug design and drug action**. Califórnia: Elsevier, 2004. 617p.
- <sup>3</sup> LOMBARDINO, J. G.; LOWE III, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 853-862. 2004.
- <sup>4</sup> MONTANARI, C. A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, v. 18, n. 3, p. 56-64, 1995.
- <sup>5</sup> CAIROLI, C.; CAOMPOS, R. M. Farmacodinâmica e farmacocinética dos inibidores da Fosfodiesterase tipo 5 (PDE5). **Official Journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 31, n. 1, p. 17-20, 2005.
- <sup>6</sup> AMARAL, A. T.; MONTANARI, C. A. Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 39-44, 2002.
- <sup>7</sup> MCLEISH M J.; KENYON G. L., Approaches to the Rational Design of Enzyme Inhibitors. In: BURGER, A. (Ed.). **Burger's medicinal chemistry and drug discovery**. New York: John Wiley, 2003. v. 1. p. 715-779.
- <sup>8</sup> LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- <sup>9</sup> STRYER, L. **Bioquímica**. São Paulo: Reverte, 1995. 881p.
- <sup>10</sup> VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. São Paulo: Artmed, 2006. 1596p.
- <sup>11</sup> VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 95-102, 2005.
- <sup>12</sup> KOSHLAND, D. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. **Proceeding of the National Academic of Sciences in the United States of America**, v. 44, p. 98-104, 1958.
- <sup>13</sup> MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Kinetics of invertase action. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333-369, 1913.
- <sup>14</sup> SCHNELL, S.; MAINI, P. K. Enzyme kinetics at high enzyme concentration. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 62, p. 483-499, 2000.
- <sup>15</sup> ELION, G. B. The purine path to chemotherapy. **Science**, v. 244, p. 41-47. 1989.



- <sup>16</sup> BRUCE, S. P. Febuxostat: a selective xanthine oxidase inhibitor for the treatment of hyperuricemia and gout. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 40, n. 12, p. 2187-2194, 2006.
- <sup>17</sup> KNOWLES, J.; GROMO, G. Target selection in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 63-69, 2003.
- <sup>18</sup> MAUIZIO, M.; MASSIMO, P. Irreversible inhibitors: the kinetics of the progress curve. **Medicinal Chemistry Research**, v. 3, n. 3, p. 139-153, 1993.
- <sup>19</sup> SCHNELL, S.; MENDOZA, C. Time-dependent closed form solutions for fully competitive enzyme reactions. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 62, p. 321-336, 2000.
- <sup>20</sup> SEGEL, I. H. **Enzyme kinetics**: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: Wiley, 2006. 957p.
- <sup>21</sup> HOH, C. Y.; CORD-REWISCH, R. A practical kinetic model that considers endproduct inhibition in anaerobic digestion processes by including the equilibrium constant. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, n. 5, p. 597-604, 1996.
- <sup>22</sup> ENZYME Kinetic Glossary, disponível em :  
<[http://www.softmol.sk/ekinetics\\_glossary\\_EN.htm](http://www.softmol.sk/ekinetics_glossary_EN.htm)> Acesso em: 20 Fev. 2007.
- <sup>23</sup> SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, p. 71-105, 2006.
- <sup>24</sup> YAO, C., LEVY, R. H. Inhibition-Based metabolic drug–drug interactions: predictions from in vitro data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 9, p. 1923-1935, 2002.
- <sup>25</sup> SCHIMIDER, J.; VON MOLTKE, L. L.; HARMATZ, J. S.; GREENBLAT, D. J. Extrapolating in vitro data on drug metabolism to in vivo pharmacokinetics : evaluation of the pharmacokinetic interaction between amitriptyline and fluoxetine. **Drug Metabolism Reviews**, v. 31, n. 2, p. 454-560, 1999.
- <sup>26</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:  
<<http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>>. Acesso em: 21 de Fev. 2007.
- <sup>27</sup> CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, n.2, p.159-218, 1909.
- <sup>28</sup> RICHARD, P.; HUDSON, A.; MOURIÈS, M. A.; MARY BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 727-740, 2005.

- <sup>29</sup> DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER Z.; ANDRADE, A. Z (EDs.). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. v. 1, p. 48-74.
- <sup>30</sup> UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL. Trypanosoma. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/para-site/Imagensatlas/Protozoa/Trypanosomacruzi.htm>> Acesso em: 10 jan. 2007.
- <sup>31</sup> COURA J. R.; CASTRO S. L. de. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.
- <sup>32</sup> DARDONVILLE C. Recent advances in antitrypanosomal chemotherapy: patent literature 2002 – 2004. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 15, n. 9, p. 1241-1257, 2005.
- <sup>33</sup> COURA J. R. Tripanossomose, Doença de Chagas. **Ciencia e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 30-33. 2003.
- <sup>34</sup> PROTEIN Data Bank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbld=1DBV>> Acesso em: 26 set. 2006
- <sup>35</sup> SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. SOUZA, R. C. Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, n. 2, p. 187-194, 1998.
- <sup>36</sup> WARIZAYA, M.; KINOSHITA, T.; KATO, A.; NAKAJIMA, H.; FUJII, T. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60 n. 3, p. 567-568, 2004.
- <sup>37</sup> ENGEL, J. C.; CAZZULO, B. M. F. de; STOPPANI, A. O. M.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. Aerobic glucose fermentation by Trypanosoma cruzi axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 26, n. 1-2, p. 1-10, 1987.
- <sup>38</sup> JELESAROV, I.; BOSSHARD, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. **Journal of Molecular Recognition**, v. 12, n. 1, p. 3-18, 1999.
- <sup>39</sup> PIERCE, M. M.; RAMAN, C. S.; NALL, B. T. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. **Methods**, v. 19, n. 1, p. 213-221, 1999.
- <sup>40</sup> ABABOU, A.; LADBURY, J. E. Survey of the year 2004: literature on applications of isothermal titration calorimetry. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, n. 1, p. 79-89, 2006.

- <sup>41</sup> ABABOU, A.; LADBURY, J. E. Survey of the year 2005: literature on applications of isothermal titration calorimetry. **Journal of Molecular Recognition**, v. 20, n. 1, p. 4-14, 2007.
- <sup>42</sup> FREIRE, E.; Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. **Drug Discovery Today: Technologies**, V 1, n. 3, 2004.
- <sup>43</sup> HOLDGATE, G A. Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a toll to study binding energetics. **BioTechniques**, v. 31, n. 1, p. 164-184, 2001.
- <sup>44</sup> WARK, W. H.; HOLDGATE, G. A. Isothermal titration calorimetry in drug discovery. **Program Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 309-376, 2001.
- <sup>45</sup> O'BRIEN, R.; HAQ, I. Applications of biocalorimetry: binding, stability and enzyme kinetics. In: LADBURY J.E. (Ed.). **Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences**. New York: John Wiley, 2004. v. 1, p. 3-34.
- <sup>46</sup> CARBONELL, T.; FREIRE, E. Binding thermodynamics of statins to HMG-CoA reductase. **Biochemistry**, v. 44, n. 35, p. 11741 -11748, 2005.
- <sup>47</sup> FREIRE E. ITC Application Note Isothermal Titration Calorimetry and Drug Design. Microcal: Application Note. Disponível em: <[www.microcalorimetry.com](http://www.microcalorimetry.com)> Acesso em: 10 jul. 2006.
- <sup>48</sup> LEAVITT, S.; FREIRE, E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 5, p. 560-566, 2001.
- <sup>49</sup> TODD, M. J.; GOMEZ, J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? **Analytical Biochemistry**, v. 296, n. 1, p. 179–187, 2001.
- <sup>50</sup> BIANCONI, M. L. Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 18709-18713, 2003.
- <sup>51</sup> CHELESKI, J.; WIGGERS, H. J.; GIANOTTI, A.; SILVA, F. H. MONTANARI, C. A. Thermodynamic signature of two novel cysteine protease inhibitors – cystatins, determined by isothermal titration calorimetry. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM IN MEDICINAL CHEMISTRY, 3., 2006, São Pedro. **Abstract Book...** São Pedro: EDUSP, 2006. p. S1-15.
- <sup>52</sup> ULTRASENSITIVE Calorimetry for Life Sciences. Disponível em: <<http://www.microcal.com/index.php?id=350>> Acesso em: 16 nov. 2006.
- <sup>53</sup> HAQ, I. **Calorimetry in the fast lane**: The use of isothermal titration calorimetry for obtaining enzyme kinetic constants. Studio City: MicroCal, 2003. 23 p. (LLC Leading the World in Ultrasensitive Microcalorimetry).

- <sup>54</sup> OLSEN, S. N. Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions. **Thermochimica Acta**, v. 448, p. 12–18, 2006.
- <sup>55</sup> WISEMAN, T.; WILLISTON, S.; BRANDTS, J. F.; LIN, L. N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Analytical Biochemistry**, v. 179, n. 1, p. 131-137, 1989.
- <sup>56</sup> HANNAERT, V.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. M. Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *trypanosoma brucei* and *trypanosoma cruzi*: expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of the enzymes. **Protein Expression and Purification**, v. 6, p. 244-250, 1995.
- <sup>57</sup> VP-ITC. **Ultrasensitive Isothermal Titration Calorimeter: MicroCalorimeter User's Manual**. Northampton: microcal, 2004. 1v.
- <sup>58</sup> WADSÖ, I.; GOLDBERG, R. N.; Standards in isothermal microcalorimetry. **Pure Applied Chemistry**, v. 73, n. 10, p. 1625-1639, 2001.
- <sup>59</sup> VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 186-191, 2006.
- <sup>60</sup> ISOTHERMAL Titration Calorimeter (ITC). Data Analysis in Origin®: tutorial guide, version 7.0. Northampton: MicroCal, 2004. 121p.
- <sup>61</sup> ANDRICOPULO, A.D.; MONTANARI, C.A. Structure-activity relationships for the design of small-molecule inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 585-593, 2005.
- <sup>62</sup> MOLAEI R. A.; GHOURCHIAN, H.; MOOSAVI, M. A. A.; HONG, J.; NAZARI, K. Spectrophotometric assay for horseradish peroxidase activity based on pyrocatechol-aniline coupling hydrogen donor. **Analytical Biochemistry**, v. 362, n. 1, p. 38-43, 2007.
- <sup>63</sup> CARDOSO, C. L.; LIMA, V. V.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; WAINER, I. W.; MOADDEL, R.; CASS, Q.B. Development and characterization of an immobilized enzyme reactor (IMER) based on human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for On-line enzymatic studies. **Journal of Chromatography A**, v. 1120, n. 1-2, p. 151-157, 2006.
- <sup>64</sup> MARTINS, S.; KARMALI, A.; SERRALHEIRO, M. L. Kinetic properties of wild-type and altered recombinant amidases by the use of ion-selective electrode assay method. **Analytical Biochemistry**, v. 355, n. 2, p. 232–239, 2006.
- <sup>65</sup> ZHAO, H. L.; KIM, Y. S. Determination of the kinetic properties of Platycodin D for the inhibition of pancreatic lipase using a 1,2-diglyceride- based colorimetric assay. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 10, p. 1048-1052, 2004.

- <sup>66</sup> SABOURY, A. A.; DIVSALAR, A.; JAFARI, G. A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; HOUSAINDOKHT, M. R.; HAKIMELAHI, G. H. A Product inhibition study on adenosine deaminase by spectroscopy and calorimetry. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 3, p. 302-305, 2002.
- <sup>67</sup> CAI, L.; CAO, A.; LAI, L. An isothermal titration calorimetric method to determine the kinetic parameters of enzyme catalytic reaction by employing the product inhibition as probe. **Analytical Biochemistry**, v. 299, n. 1, p. 19–23, 2001.
- <sup>68</sup> ENZYME database BRENDA. Disponível em: <[http://www.brenda.uni-koeln.de/php/result\\_flat.php4?ecno=1.2.1.12](http://www.brenda.uni-koeln.de/php/result_flat.php4?ecno=1.2.1.12)> Acesso em: 23 jan. 2007.
- <sup>69</sup> Di, L.; KERNS, E. H. Biological assay challenges from compound solubility: strategies for bioassay optimization. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 9-10. p. 446-451, 2006.
- <sup>70</sup> REHAN, M.; YOUNUS, H. Effect of organic solvents on the conformation and interaction of catalase and anticatalase antibodies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38, n. 3-5, p. 289-295, 2006.
- <sup>71</sup> XIA, Y.; PARK, Y.-D.; MU, H.; ZHOU, H.-M.; WANG, X.-Y.; MENG, F.-G. The protective effects of osmolytes on arginine kinase unfolding and aggregation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 5, p. 437-443, 2007.
- <sup>72</sup> RUIZ, D. M.; CASTRO, R. E. Efect of organic solvents on the activity and stability of an extracellular protease secreted by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. **Journal Industrial and Microbioly and Biotechnoly**, v. 34, p. 111-115, 2007.
- <sup>73</sup> TJERNBERG, A.; MARKOVA, N.; GRIFFITHS, W. J.; HALLÉN, D. DMSO-Related effects in protein characterization. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, p. 131-137, 2006.
- <sup>74</sup> BANASIK, M.; STEDEFORD, T.; STROSZNAJDER, R.P.; PERSAD, A. S.; TANAKA, S.; UEDA, K. The effects of organic solvents on poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity: implications for neurotoxicity. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 64, n. 4, p. 467-473, 2004.
- <sup>75</sup> RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; ITO, M. Effect of water-miscible solvents on the organic solvent-resistant tyrosinase from *Streptomyces* sp. REN-21. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 7, p. 809-816, 2003.
- <sup>76</sup> LIPINSKI, C. Solubility in the design of combinatorial libraries. In: YAN, B. (Ed.). **Chemical analysis: analysis and purification methods in combinatorial chemistry**. New York: Wiley Interscience, 2004. v. 163, p. 407-434.
- <sup>77</sup> WEBCALC Matemática estatística descritiva. Disponível em: <[www.webcalc.com.br/matematica/estatistica.html](http://www.webcalc.com.br/matematica/estatistica.html)> Acesso em: 10 mar. 2007.

- <sup>78</sup> JORDÃO, C. O.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G. E. P. de; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J. L. C. Trypanocidal activity of chemical constituents from *Lychnophora salicifolia* Mart. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 332–334, 2003.
- <sup>79</sup> UPADHYAY S. N.; WALI, N.; SARMA, D. N. K.; YADAV, R. P. **A novel process for isolation of Mangiferin, preparing mangiferin - containing formulation used for preventing/treating parasite infections.** Indian. IN 183778, 08 abr. 2000.
- <sup>80</sup> CASTILHO, M. S.; PAVÃO, F.; OLIVA, G.; LADAME, S.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J. Evidence for the two phosphate binding sites of an analogue of the Thioacyl intermediate for the *Trypanosoma cruzi* Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase-Catalyzed reaction, from its crystal structure. **Biochemistry**, v. 42, n. 23, p. 7143-7151, 2003.
- <sup>81</sup> GHOSH, S.; CHAN, J.M.W.; LEA, C.R.; MEINTS, G.A.; LEWIS, J.C.; TOVIAN, Z.S.; FLESSNER, R.M.; LOFTUS, T. C.; BRUCHHAUS, I.; KENDRICK, H.; CROFT S. L.; KEMP, R. G.; KOBAYASHI, S.; NOZAKI, O.; OLDFIELD, E. Effects of bisphosphonates on the growth of *Entamoeba histolytica* and *Plasmodium* Species in vitro and in vivo. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 175-187, 2004.
- <sup>82</sup> CUELLAR, M. A.; SALAS, C.; CORTE´S M. J.; MORELLO, A.; MAYA, J. D.; PREITE, M. D. Synthesis and in vitro trypanocide activity of several polycyclic Drimane-Quinone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2487-2497, 2003.
- <sup>83</sup> LEITÃO, A.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.; PUPO, M. T.; DE MARCHI, A. A.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M. F. G. F., FERREIRA, V. F.; DE SOUZA M. C. B. V. SÁ, M. M.; MORAES, V. R. S.; MONTANARI, C.A. Structure–activity relationships of novel inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 9, p. 2199-2204, 2004.