

## Novos modelos de triagem de inibidores da nucleosídeo hidrolase de *Leishmania donovani* immobilizada em partículas magnéticas

Millena S. Ceroullo (IC)<sup>1</sup>, Pamella C. O. de Oliveira (PG)<sup>1</sup>, Rodrigo C. da Silva (PG)<sup>1</sup>, Maria Cecilia B. V. de Souza (PQ)<sup>1</sup>, Fernanda C. S. Boechat (PQ)<sup>1</sup>, Luzineide W. Tinoco (PQ)<sup>2</sup>, Marcela C. Moraes (PQ)<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Química, UFF – Niterói, RJ; <sup>2</sup> IPPN, UFRJ – Rio de Janeiro, RJ;

\*e-mail: [mcmoraes@id.uff.br](mailto:mcmoraes@id.uff.br)

Palavras Chave: *Leishmania donovani*, imobilização enzimática, cromatografia líquida, triagem de inibidores.

### Introdução

As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas causadas por parasitas protozoários de mais de 20 espécies de *Leishmania*. A leishmaniose visceral é considerada a forma mais grave da doença, podendo ser fatal.<sup>1</sup> Um dos causadores dessa doença é o protozoário da espécie *Leishmania donovani*, que é altamente dependente da via de salvação de purinas para a obtenção de nucleosídeos, e, conseqüentemente, para sua sobrevivência.<sup>2</sup> A Nucleosídeo Hidrolase de *Leishmania donovani* (LdNH) é uma enzima chave desta via e, por isso, tem sido considerada um alvo promissor para a busca de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral. Sendo assim, é imprescindível o desenvolvimento de novas metodologias eficazes e seguras para a identificação de possíveis inibidores da LdNH.

### Resultados e Discussão

Neste trabalho, a enzima LdNH foi imobilizada covalentemente em partículas magnéticas através da formação de bases de Schiff e aplicada em duas metodologias distintas. No modo *off-line*<sup>3</sup>, a reação enzimática é conduzida em microtubos, as partículas magnéticas recobertas com a LdNH são extraídas do meio e o sobrenadante é analisado por CLAE-DAD, sendo que a atividade é monitorada pela quantificação de hipoxantina. No modo *in-line*<sup>4</sup>, a reação ocorre dentro de um reator contendo a enzima imobilizada (IMER, do inglês *immobilized enzyme reactor*). O IMER retém as partículas magnéticas recobertas com a LdNH no sistema em fluxo através do uso de oito ímãs de neodímio em um arranjo quadrupolar. O IMER, então, é inserido em série (*in-line*) a uma coluna analítica C18 que fornece a rápida separação de inosina e hipoxantina, substrato e produto da reação catalisada pela LdNH<sup>4</sup>.

Em ambos os métodos, a separação cromatográfica do substrato (inosina) e do produto (hipoxantina) ocorreu utilizando-se uma coluna Eclipse XBD C18 Agilent (150 x 4,6 mm) e como fase móvel uma solução aquosa de trietilamina (1% v/v, pH 6,0 acidificado com AcOH)/Metanol (95:5), 0,8 mL.min<sup>-1</sup> e  $\lambda = 249$  nm.

Os ensaios desenvolvidos foram empregados na determinação da constante de Michaelis-Menten

(K<sub>M</sub>) através de estudos cinéticos e na avaliação de um ribonucleosídeo quinolônico previamente descrito como inibidor da LdNH (tabela 1).

Tabela 1. Estudos cinéticos e de inibição em diferentes modelos.

Modelo	Valor da K <sub>M</sub> (μM)	Valor de IC <sub>50</sub> (μM)	Mecanismo de Inibição
<i>Off-line</i>	464,0 ± 93,5	2,6 ± 0,2	-
<i>In-line</i>	2079,3 ± 87,1	40,7 ± 1,6	Competitivo

Comparando-se os diferentes métodos propostos, fica evidente que o sistema em que a catálise enzimática ocorre em fluxo afeta a afinidade da enzima pelo substrato, com o conseqüente aumento da constante de Michaelis-Menten. Isso se deve ao menor tempo de contato entre a enzima e o substrato, dado que o tempo reacional é controlado pelo sistema em fluxo. Tal fator afetou também a afinidade da enzima pelo inibidor avaliado. O sistema *in-line* apresenta algumas vantagens como automação e elevada produtividade. O modelo *off-line*, por outro lado, não viabilizou a determinação do mecanismo e constante de inibição. Uma grande desvantagem desse método é a presença de pequenas quantidades de partículas magnéticas com a LdNH imobilizada mesmo após a extração, o que interfere nos resultados e dificulta a sua aplicação em alguns estudos, como a determinação do mecanismo de inibição.

### Conclusões

Através da comparação dos métodos de triagem utilizando a enzima LdNH imobilizada em partículas magnéticas, observou-se que o sistema em fluxo preserva a catálise enzimática e reconhecimento de ligantes, embora afete a afinidade da enzima pelo substrato e inibidores. Por outro lado, o sistema fornece menor manipulação das amostras, automação e aumento da produtividade devido ao uso de sistemas de injeção automáticos.

### Agradecimentos

FAPERJ, CNPq e CAPES.

[1] OMS. Leishmaniose. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>. Acesso 08/22.

[2] Cui, L.; *et al.* *Gene* **2001**, 280, 153 - 162.

[3] De Faria, R.A. *et al.* *J. Pharm Biomed Anal* **2022**, 211, 114614.

[4] Ximenes, IAT; *et al.* *J. Chrom.* **A 2022**, 1663, 462740.