Desenvolvimento e Caracterização de biorreatores utilizando a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) do *Trypanossoma cruzi*

Carmem L. Cardoso[1] (PQ), Marcela C. de Moraes (IC)[1] Rafael V. C. Guido[2] (PG), Glaucius Oliva[2] (PQ), Irving W. Wainer[3] (PQ), Ruin Moaddel[3] (PQ) and Quezia B. Cass[1](PQ)[1]*

1. Departamento de Química – UFSCar, C.P. 676 CEP 13565-905, São Carlos, SP-Brasil. 2. Centro de Biotecnologia Estrutural e Molecular- CBME, Instituto de Física de São Carlos, Brasil, Universidade de São Paulo, Brasil, 3. National Institute of Aging, National Institute of Health, Baltimore, USA.

carmen@dq.ufscar.br, quezia@dq.ufscar.br

Palavras Chave: biorreator, IMER, enzimas, GAPDH, *T. cruzi*, estudos enzimáticos.

Introdução

A doença de Chagas como problema de saúde pública afeta tanto os países em desenvolvimento quanto os países desenvolvidos[1] e desperta o interesse pelo desenvolvimento de técnicas rápidas e eficazes na descoberta de potenciais substâncias, para o tratamento da doença. Como os processos fundamentais de ação dos fármacos como a absorção, a excreção e a ativação do receptor são dinâmicas na natureza e, portanto, similares aos processos cromatográficos, técnicas cromatográficas podem ser utilizadas para estudos de afinidade dos fármacos adicionando-se agentes biológicos em sistemas cromatográficos.[2-3] formando assim os biorratores. As maiores vantagens da utilização de, por exemplo, enzimas imobilizadas são: o aumento da estabilidade que pode passar de algumas horas da enzima em solução para semanas quando imobilizada, pequenas quantidades de enzima e a possibilidade de se realizar *screening* de alta eficiência *on-line* para inibidores específicos.[4] Considerando a importância da *g*GAPDH no ciclo de vida do protozoário *T. cruzi*, e às significativas diferenças estruturais entre a *g*GAPDH e sua homóloga humana esta enzima tornou-se o alvo na busca por inibidores específicos para o tratamento da doença de Chagas. Baseado nos resultados obtidos com a imobilização da GAPDH humana em capilares de sílica fundida[5] foi desenvolvido um biorreator capilar utilizando-se a enzima gGAPDH do *T. cruzi.*

Resultados e Discussão

No método de imobilização escolhido as enzimas são covalentemente ligadas às paredes internas de um capilar de sílica fundida fig. 1.

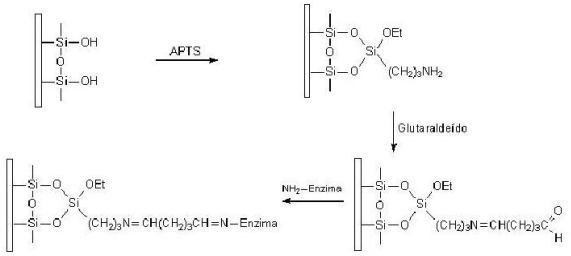

Figura 1. Método de imobilização em capilar.

Medindo-se a produção de NADH a 340 nm pode-se avaliar a atividade enzimática correspondente. Com a ineficiência de resolução do NAD^+ e NADH pelo capilar foi utilizado um sistema de cromatografia multidimensional e uma coluna analítica do tipo C8. Vários fatores que influenciaram a baixa atividade inicial apresentada pelo IMER-GAPDH-TC foram avaliados tais como: tampão de imobilização, pH, temperatura e tampão de trabalho. Os melhores resultados foram obtidos nas condições ilustradas na fig. 2.

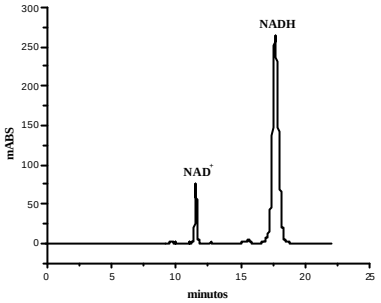

Figura 2. Cromatograma de separação de NAD^+ e NADH. Condições: coluna C8-acoplada, [TEA (1%)/AcOH]:ACN (96,5:3,5), v= 0.8 ml.min^{-1}, 340 nm.

Nos estudos cinéticos realizados foram obtidos os valores de K_M para o cofator (NAD^+) e substrato (D-G3P) da enzima, além da avaliação da estabilidade desse biorreator. (Fig. 3.)

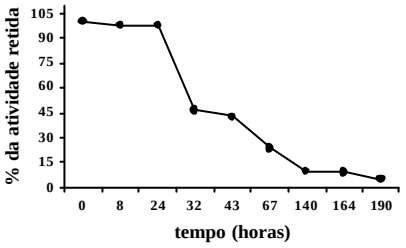

Figura 3. Estabilidade do IMER-GAPDH-Tc, expressa em % de atividade retida.

Conclusões e Perspectivas

As condições de imobilização utilizadas se mostraram eficientes permitindo os estudos cinéticos e manutenção da atividade do biorreator por pelo menos uma semana. Pretende-se agora testar alguns inibidores naturais selecionados.

Agradecimentos

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo auxílio à pesquisa e bolsas concedidas.

[1] World Health Organization., http://www.who.ch/whosis/whosis.htm
[2] Kaliszan, R. Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships, Wiley, New York, 1987.
[3]. Bertucci, C. et al. Drug affinity to immobilized target bio-polymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B, 797*, 11-129, 2003.

[4]. Gelb, M. H., Hol, W. G. J. Science 297, 343, (2002).
[5] Cardoso, C.L, et, al. Development and characterization of an Immobilized Enzyme Reactor (IMER) based on human Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase for On-line Enzymatic Studies. *J. Chromatogr. A,* in press, on line desde 19/11/2005.