

Desenvolvimento de um Método por CLAE Multidimensional para o Monitoramento Online da Atividade da Enzima IMPDH-Mt

Mariana Delle Piane de Carvalho & Marcela Cristina de Moraes

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *M. tuberculosis* e pode ser fatal. A necessidade por novos fármacos para o tratamento da tuberculose é evidenciada pela complexidade e toxidez dos tratamentos disponíveis, bem como pela emergência de cepas multi-resistentes. Portanto, neste trabalho, é descrito o desenvolvimento e validação de um método por CLAE multidimensional para o monitoramento da atividade da enzima IMPDH de *M. tuberculosis* imobilizada.

Palavras Chave: *Inosina Monofosfato Desidrogenase; Cromatografia Líquida; Tuberculose.*

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* and can be fatal. New TB drugs are needed due to the complexity and toxicity of current drug regimens, as well as the emergence of multi-resistant strains. Therefore, in this work, we describe the development and validation of a multidimensional HPLC method to monitor on line the activity of the IMPDH from *M. tuberculosis* immobilized enzyme.

Keywords: *Inosine Monophosphate Dehydrogenase; Liquid Chromatography; Tuberculosis.*

A tuberculose humana (TB) é uma doença causada principalmente pela micobactéria *Mycobacterium tuberculosis* que pode ser fatal. Ainda se observa uma alta taxa de mortalidade devido a esta doença, relacionada principalmente ao surgimento de cepas resistentes e a co-infecção com o vírus da AIDS.

A Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH) é uma enzima chave na via de salvação de purinas, da qual o *M.tuberculosis* é altamente dependente para a obtenção de nucleotídeos. Portanto, esta enzima é um alvo atrativo a ser estudado na busca de potenciais novas substâncias bioativas para o tratamento da tuberculose. Na figura 1 é representada a reação catalisada pela enzima IMPDH.

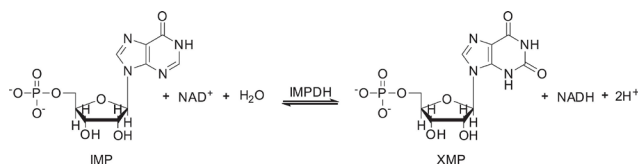


Figura 1. Reação catalisada pela enzima IMPDH.¹

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE multidimensional para o monitoramento online da atividade da IMPDH imobilizada, visando o desenvolvimento de um método de triagem automatizado, eficiente e robusto para a identificação de novos inibidores enzimáticos como potenciais protótipos de medicamentos para o tratamento da tuberculose.

Metodologia

A primeira etapa do desenvolvimento do método consistiu-se em determinar o tempo de acoplamento, que é o tempo em que o capilar contendo a enzima imobilizada deveria estar acoplado a coluna cromatográfica do sistema que fornecerá a separação dos produtos e substratos da reação catalisada pela enzima. Este tempo foi determinado através da injeção de uma solução com a mistura de substratos e produtos catalisados pela enzima e como mostrado na tabela 1 foi de 0,7 a 9,00min.

Tabela 1. Bomba 1: 0,05mL/min, eluente A: tampão TRIS 50mM:KCl 200mM pH 8,5. Bomba 2: 0,9mL/min, eluente B: TEA pH 6,0:ACN (96:4).

Bomba (Eluente)	Tempo (min)	Evento	Posição da Válvula
1 (A)	0,0 – 0,7	Eluição dos analitos	1
2 (B)	0,0 – 0,7	Condicionamento da coluna analítica	1
1 (A)	0,7 – 9,0	Transferência dos analitos para a coluna analítica	2
1 (A)	9,0 – 20,0	Condicionamento do IMP-IMER	1
2 (B)	9,0 – 20,0	Análise dos compostos pela coluna analítica	1

O método multidimensional consiste em inserir o capilar na 1 dimensão onde utiliza-se como FM o tampão de máxima atividade e estabilidade da enzima que contem TRIS:KCl a uma vazão baixa que permite a catálise enzimática.

Na segunda dimensão do sistema é utilizada uma coluna C18 e uma fase móvel constituída por solução 1% de TEA pH 6,0 : ACN (96:4) que permite a separação dos analitos, como pode ser observado no cromatograma.

Dessa forma as duas dimensões do sistema trabalham independentemente como pode ser observado na figura 2 estando acopladas apenas para a transferência dos analitos da primeira dimensão para a segunda dimensão.

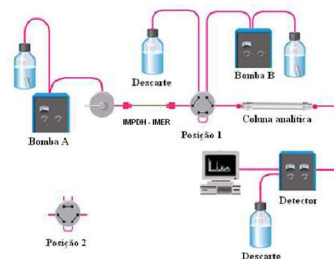


Figura 2. Representação do sistema cromatográfico multidimensional usado com o IMER na primeira dimensão e a coluna analítica na segunda dimensão.

Após o desenvolvimento e otimização dos parâmetros cromatográficos, realizou-se a validação do método da metodologia analítica através da avaliação da linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e quantificação, conforme preconizado pela Anvisa.²

Resultados e Discussão

Os substratos e produtos da reação catalisada pela IMPDH-Mt absorvem na mesma região do UV, e o capilar de sílica fundida contendo a enzima imobilizada não possui resolução cromatográfica para a separação dos analitos, como pode ser observado na figura 3. Por isso, faz-se necessário o uso da cromatografia líquida multidimensional.

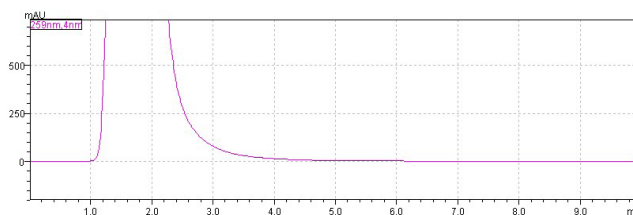


Figura 3. Cromatograma de determinação do tempo de acoplamento.

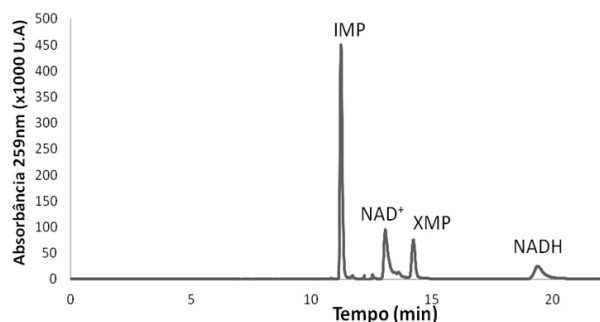


Figura 4. Separação cromatográfica de IMP (tr = 10,8 min), NAD⁺ (tr = 12,1 min), XMP (tr = 13,0 min) e NADH (tr = 16,7 min)., Vinj=10µL.

O método desenvolvido foi validado de acordo com os parâmetros da Anvisa, avaliando-se a linearidade no intervalo de concentração de 5-320 µM (R²=0,9996), seletividade, precisão (0,38-4,39%), exatidão (98,3-106,7%), limites de quantificação (5,0µM) e detecção (0,05µM).²

A curva de calibração obtida é representada na figura 5.

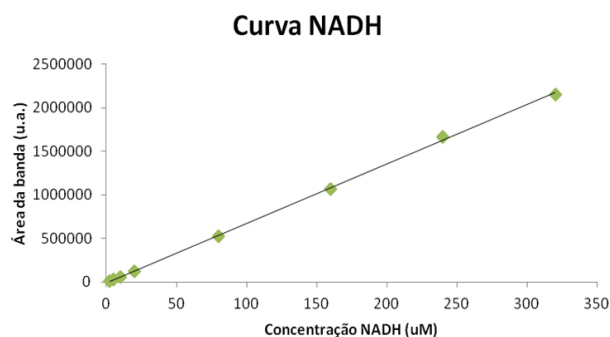


Figura 5. Curva de calibração para a quantificação de NADH.

Conclusões

O método cromatográfico multidimensional desenvolvido para o monitoramento on line da atividade da enzima IMPDH-Mt através da quantificação direta do NADH formado foi validado com sucesso. A próxima etapa envolverá a imobilização da enzima em capilares de sílica fundida e o emprego deste método cromatográfico para o desenvolvimento de ensaios cinéticos e do método de triagem proposto.

Agradecimentos

FAPERJ e CNPq.

Referências Bibliográficas

1. PISSINATE, Kenia et al . Synthesis and Evaluation of Thiazolyl-1H-benzo[d]imidazole Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis Inosine Monophosphate Dehydrogenase. J. Braz. Chem. Soc., São Paulo ,

v. 26, n. 7, p. 1357-1366, July 2015 .

2. Brasil. Resolução RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Mariana Delle Piane de Carvalho & Marcela Cristina de Moraes*

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UFF

*E-mail: memoraes@id.uff.br