

IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM SUPORTES CROMATOGRÁFICOS: UMA FERRAMENTA NA BUSCA POR SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

Carmen Lúcia Cardoso*

Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901 Ribeirão Preto - SP, Brasil

Marcela C. de Moraes e Quezia B. Cass

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13560-970 São Carlos - SP, Brasil

Recebido em 5/10/07; aceito em 11/7/08; publicado na web em 2/12/08

IMMOBILIZATION OF THE ENZYMES ON CHROMATOGRAPHIC SUPPORTS: A TOOL TO RESEARCH OF INHIBITOR COMPOUNDS. The development and characterization of bioreactors or IMER (immobilized enzyme reactors) as research tools are important in the scope of medicinal chemistry and constitute an alternative for the rational development of drugs. This approach does not require highly purified enzymes or a great amount of protein, but increase the enzymatic stability against heat, organic solvents and pH, without too much loss of catalyst activity. Immobilized enzyme reactors (IMER) can be used for the accomplishment of high efficiency screening on-line and, thus inhibitors can be quickly identified. Here, we emphasize the development of IMER by use of different methods of immobilization and chromatographic supports. Their applications, in different areas of research, are also fully discussed.

Keywords: enzymes; bioreactors; inhibitors.

INTRODUÇÃO

Enzimas são biocatalisadores com excelentes propriedades tais como elevadas seletividade e especificidade, que lhes permite realizar uma grande variedade de processos químicos sob diversas condições reacionais.¹ Sua função metabólica exerce influência específica sobre certas interações bioquímicas, usualmente em ambientes muito complexos - como no interior de células - e incluem transformações oxidativas e conjugativas que ocorrem em altas velocidades catalíticas e com reações altamente regiosseletivas e estereosseletivas.^{2,3}

A especificidade enzimática baseia-se nas interações entre a molécula do substrato/inibidor e o sítio ativo da enzima, como, por exemplo, as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals e as interações eletrostáticas. Isto ocorre somente quando várias dessas interações acontecem simultaneamente entre as duas moléculas (enzima e substrato/inibidor) em uma estrutura tridimensional.¹

Enzimas têm sido utilizadas em várias aplicações, nas indústrias alimentícia, têxtil, de papel e na agricultura, resultando em significativas reduções de custos.⁴ A tecnologia de enzimas é um campo multidisciplinar, e reconhecido pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OCED) como importante componente do desenvolvimento industrial sustentável. Além do campo industrial, o rápido desenvolvimento da engenharia genética, *high-throughput screening* entre outros, abriu novos campos de aplicação.⁵ Esse desenvolvimento tem estimulado as indústrias química e farmacêutica a utilizarem a tecnologia de enzimas com interesse concentrado nas áreas da saúde,⁶ de energia e do meio ambiente.^{5,7}

O tratamento de diversas doenças através de intervenção quimioterapêutica, por inibição seletiva de enzimas envolvidas em processos vitais nos organismos infecciosos, tem sido explorado com sucesso na medicina moderna e é bem representado pelo número de fármacos (antivirais, antiparasitários e antibióticos) em uso clínico que atuam como inibidores enzimáticos.⁸ A Tabela 1 ilustra alguns exemplos

desses fármacos.

A necessidade de novos fármacos tem estimulado a pesquisa pelo desenvolvimento de fármacos que atuem como inibidores enzimáticos⁸ e a triagem de substratos e/ou inibidores que se liguem seletivamente à enzima em estudo torna-se interessante para a indústria farmacêutica. No entanto, há a necessidade do desenvolvimento de técnicas que reduzam o número de possíveis candidatos. Uma alternativa promissora é a utilização de técnicas cromatográficas e estudos de afinidade de fármacos.

Os processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos de ação de fármacos, como absorção, distribuição, metabolismo, modulação e ativação do receptor, são dinâmicos na natureza e têm muito em comum com os mecanismos básicos envolvidos em cromatografia líquida. As principais interações intermoleculares, como as eletrostáticas, hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio, são determinantes tanto nos processos biológicos quanto nos cromatográficos. Como a atividade e o metabolismo dos fármacos são mediados por diferentes tipos de interações com os alvos biológicos, a avaliação dessas interações pode ser utilizada nos estudos de afinidade e na elucidação do mecanismo de ação de um fármaco.^{9,10}

A utilização de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tendo como fase estacionária biorreatores ou IMER (*Immobilized enzyme reactors*) pode ser chamado de cromatografia de afinidade analítica ou cromatografia de afinidade quantitativa ou biocromatografia.¹¹⁻¹³ Esse processo cromatográfico fornece seletividade, rapidez e possibilidade de reutilização da enzima, além da reprodutibilidade obtida através da combinação da especificidade e da sensibilidade de uma reação enzimática. Assim, com a sensibilidade de detecção sensivelmente aumentada o IMER pode ser usado para isolar e/ou identificar compostos biologicamente ativos em misturas complexas.¹⁴

A constante de Michaelis-Menten (K_M) é uma constante de equilíbrio similar à constante de inibição (K_i), usada para descrever o efeito de inibidores reversíveis sobre a atividade da enzima. Tais constantes (K_M e K_i) são similares às constantes de afinidade, K_d (constante de

*e-mail: ccardoso@ffclrp.usp.br

Tabela 1. Fármacos disponíveis no mercado, que são inibidores enzimáticos⁸

Composto	Enzima-Alvo	Aplicação Clínica
Acetazolamida	Anidrase carbônica	Glaucoma
Aciclovir	DNA polimerase viral	Herpes
Amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir	HIV protease	AIDS
Alopurinol	Xantina oxidase	Gota
Argatroban	Trombina	Doenças cardíacas
Aspirina	Ciclooxigenases	Inflamação, dor, febre
Amoxicilina	Proteínas de ligação à penicilina	Infecção bacteriana
Captopril, enalapril	Enzima conversora de angiotensina	Hipertensão
Carbidopa	Dopa decarboxilase	Mal de Parkinson
Celebrex, Vioxx	Ciclooxigenase 2	Inflamação
CI-1040, PD0325901	MAP quinase quinase	Câncer
Clavulanato	β -Lactamase	Resistência bacteriana
Digoxina	ATPase (sódio e potássio)	Doenças cardíacas
Efavirenz, nevirapina	Transcriptase reversa do HIV	AIDS
Epristerida, finasterida, dutasterida	5 α -Redutase esteroideal	Hiperplasia benigna da próstata, calvície masculina padrão
Fluorouracil	Timidilato sintase	Câncer
Leflunomida	Diidroorotato desidrogenase	Inflamação
Lovastatina e outras estatinas	HMG-CoA redutase	Redução de colesterol
Metotrexato	Diidrofolato redutase	Câncer, imunossupressão
Nitecapona	Catecol- <i>O</i> -metiltransferase	Mal de Parkinson
Norfloxacina	DNA girase	Infecções do trato urinário
Omeprazol	ATPase (sódio e potássio)	Úlceras gástricas
PALA	Aspartato transcarbamoilase	Câncer
Sorbinol	Aldose redutase	Retinopatia diabética
Trimetoprima	Diidrofolato redutase bacteriana	Infecções bacterianas
Viagra Levitra	Fosfodiesterase	Disfunções eréteis

dissociação) e K_a (constante de associação), usadas para descrever o processo ligante-receptor, a ligação com a proteína e o equilíbrio. Uma vez que técnicas cromatográficas podem ser usadas para determinar K_d e K_a valores de K_M e K_i podem ser obtidas utilizando os princípios da cromatografia seletiva de afinidade.¹³

A imobilização de enzimas tem se mostrado, nos últimos tempos, uma poderosa ferramenta para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade.¹⁵ Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. A imobilização de enzimas a suportes cromatográficos apresenta diversas vantagens, sobre a utilização de enzimas livres em solução, entre as quais destacamos: a utilização de pequenos volumes de amostra (pL-nL); aumento do tempo de vida e da estabilidade da enzima em relação à temperatura, aos solventes orgânicos e à variação de pH sem perda considerável da atividade catalítica; reutilização; pequeno manuseio da amostra, evitando contaminações; fácil separação da enzima dos produtos da reação.^{16,17} Essas vantagens são úteis nos estudos enzimáticos *on-line*, onde os produtos da reação enzimática e os inibidores são detectados diretamente por UV-Vis, fluorescência ou espectrometria de massas.¹⁸

Existem duas principais classes de aplicações analíticas dos biorreatores enzimáticos ou IMER. Na primeira classe estão as aplicações biocatalíticas, que utilizam as reações enzimáticas para obter um produto de interesse, ou ainda transformar um analito em uma espécie mais facilmente detectável.^{2,19} A segunda, engloba os biorreatores desenvolvidos para triagem de substratos e para os estudos das características cinéticas das enzimas.²⁰

Nessa segunda classe, os IMER têm sido amplamente utilizados para separação e identificação de metabólitos,²¹ nos estudos de metabolismo dos fármacos,^{22,23} para análise e síntese enantiosseletiva,^{2,24-26} na digestão proteolítica de proteínas *on-line*,²⁷ no controle biotecnológico de fármacos,²⁸ e para a identificação de substratos e/ou inibidores, na busca por novos ligantes.²⁹⁻³⁵ Também merece destaque o uso de enzimas imobilizadas como biossensores em aplicações biomédicas³⁶ ou como órgãos artificiais.³⁷

Várias revisões na literatura têm abordado os diferentes métodos de imobilização enzimática,¹⁵ suas aplicações industriais na química analítica³⁸ e na medicina,⁶ abordando principalmente os aspectos analíticos das interações enzima-substrato.^{4,10,12,33}

O objetivo desse artigo de revisão é compilar no período de 1993 a 2007 a utilização *on-line* dos biorreatores nos estudos de moléculas

bioativas. Para tanto, será apresentada uma descrição da evolução histórica dos biorreatores (Tabela 2) e dos métodos de imobilização (Tabela 3) incluindo a descrição dos diferentes suportes, espaçadores e enzimas utilizadas (Tabela 5).

HISTÓRICO DO DESENVOLVIMENTO DE IMER

Embora o termo “cromatografia de afinidade” não tenha sido utilizado até os anos 60, o uso de ligantes de afinidade em cromatografia data de quase 100 anos atrás.³⁹ O primeiro relato é de 1910, quando Emil Starkenstein utilizou colunas contendo amido para examinar a ligação com a enzima α -amilase.⁴⁰ (Tabela 2).

A partir dos anos 70 o desenvolvimento de importantes técnicas e diversas novas tecnologias impulsionou a aplicação de enzimas imobilizadas.⁴¹ (Tabela 3).

Considerada umas das mais versáteis subdivisões da cromatografia líquida, a cromatografia de afinidade é definida como um modo da cromatografia líquida que usa um agente de ligação específico, como fase estacionária, para purificação ou análise de moléculas.^{12,39} Como essa definição sugere, as interações que ocorrem na cromatografia

de afinidade são as mesmas que ocorrem em muitos sistemas biológicos, tais como a ligação de uma enzima com o substrato ou de um anticorpo com um antígeno. A natureza específica dessas interações é responsável pela alta seletividade desse tipo de cromatografia, tornando possível o isolamento seletivo de um analito ou grupo de analitos em amostras complexas.⁴⁷

Inicialmente, a cromatografia de afinidade foi utilizada quase que exclusivamente para isolamento e purificação de micro ou macromoléculas em misturas biológicas complexas,⁶¹ mas, nos últimos tempos, tem se revelado como uma poderosa ferramenta para monitorar as interações ligante-proteína, substrato-proteína, inibidor-proteína e ligante-receptor^{10,13} demonstrando grandes vantagens como uma das técnicas de *high throughput screening* (HTS).^{21,62,63}

A cromatografia de afinidade envolve, essencialmente, três passos: a imobilização de um alvo; a avaliação das modificações sofridas pela biomolécula, após a imobilização e, a determinação dos parâmetros de ligação do ligante, depois da inserção da proteína imobilizada no sistema de separação.¹³

Um fator importante que pode ser usado na distinção entre métodos de afinidade de baixa e de alta eficiência é o material usado

Tabela 2. Histórico do desenvolvimento de IMER para utilização *on line*

ano		Ref
1910	Starkenstein E. utilizou colunas contendo amido em estudos das ligações com a enzima α -amilase.	40
1916	Nelson e Griffin observaram a preservação da atividade catalítica da enzima invertase após adsorção em carvão ativo e alumina. Essa tecnologia foi utilizada de maneira pioneira pelos imunologistas na imobilização de antígenos a suportes sólidos para separação de anticorpos específicos.	41
1920-1930	Relatos do isolamento de enzimas ou substratos de enzimas.	39
1951	Campbell e colaboradores utilizaram uma forma ativada de celulose para imobilizar covalentemente a albumina sérica e isolar anticorpos anti-albumina. Considerado o marco para o desenvolvimento da cromatografia de afinidade.	41
1964	Desenvolvimento de esferas de agarose e do método de imobilização ciano brometo para ligar proteínas e peptídeos a polissacarídeos.	42
1968	Cuatrecas e colaboradores desenvolveram colunas usando um inibidor de nuclease para purificação de proteínas. Iniciou-se o uso do termo cromatografia de afinidade para descrever o isolamento de agentes biológicos por ligantes imobilizados a suportes cromatográficos.	43
1969	Takasaki e colaboradores descreveram a isomerização de glucose a frutose pela glucose isomerase.	44
1969	Chibata e colaboradores imobilizaram por adsorção iônica sobre DEAE-Sephadex uma amilase de <i>Aspergillus aryzae</i> . O biorreator foi utilizado na resolução do racemato dos ácidos acilaminos e produção de L-aminoácidos.	45
1970	Desenvolvimento de sílica diol. Desenvolvimentos tecnológicos como a sofisticação dos métodos de imobilização e o desenvolvimento de novas reações de acoplamento. (Tabela 3)	46, 47
1974	Dunn e Chaiken descreveram o primeiro uso da eluição zonal no estudo de ligação soluto-ligante, quando examinaram a retenção da estafilococos nuclease em uma coluna contendo timidina-5'-fosfato-3-aminofenilfosfatase.	48
1975	Kasai e Ishii utilizaram a eluição frontal com colunas de afinidade de baixo desempenho na investigação da interação soluto-ligante.	49
1979	Lagercrantz descreveu as primeiras aplicações envolvendo sistemas e fármaco-proteína utilizando colunas de baixa performance de sefarose na avaliação das interações de ácidos graxos, esteróides e várias drogas com BSA imobilizada.	50
Anos de 1980	Em meados dos anos 80, a eluição zonal foi utilizada como parte de sistemas para examinar as propriedades de proteínas em fases estacionárias quirais. A partir do final dos anos 80 aparecem os relatos da utilização da eluição zonal em estudos quantitativos das interações fármaco-proteína.	51, 52
1992	Lou e Hage relataram o uso da cromatografia por eluição frontal na caracterização de ligação de HSA imobilizada para vários solutos.	53
Década de 90	Os IMERs são desenvolvidos, demonstrando grande utilidade nas mais diversas áreas	22, 23, 36, 54-60

Tabela 3. Visão geral das técnicas e tecnologias importantes em imobilização de enzimas desenvolvidas nos anos de 1970⁴¹

Suportes	Métodos de ativação ou de ligação	Técnicas/Métodos importantes desenvolvidos	Vantagens e Desvantagens
Suportes sintéticos ativos	Reação de Ugi	Confinamento pela técnica <i>wet spinning</i>	Resulta em alta carga de enzima imobilizada.
Halogênios, anéis epóxidos, aldeídos, anidridos, acilazida, carbonato, isocianato	Alquilação com epóxido	Imobilização por afinidade	Combina condições de imobilização suaves com a reversibilidade da ligação.
Polímeros funcionalizados para confinamento	Ativação de aldeído	Imobilização por coordenação	Combina a imobilização com a regeneração do suporte.
PVA-SbQ	Carbonildiimidazol para grupos hidroxilas	Imobilização enzimática orientada	Proporciona aumento da retenção da atividade enzimática quando comparada com a imobilização randômica.
PEG-DMA	Oxidização de enzimas glucosiladas	Introdução de espaçador/Imobilização covalente via espaçador	Favorece a modulação e a retenção da atividade da enzima.
PEG-CA	Benzoquinona	Complementaridade por fixação multipontos.	Favorece o aumento da estabilidade da enzima.
ENTP		Imobilização de enzimas em solventes orgânicos	Explora outra química de ligação, que trabalha exclusivamente em ausência de água.
Suportes inorgânicos para ligação covalente		Imobilização de enzimas em suportes solúveis	Atua sobre os substratos solúveis.
Sílica	Carbonatos	Enzimas reversíveis solúveis	Combina as vantagens de enzimas solúveis com enzimas imobilizadas.
Polímeros naturais e derivados	Imidoéster	Modificação e imobilização	Combina as técnicas de modificação química com as técnicas de imobilização.
Gelatina, alginato, agarose, colágeno	Divinilsulfona	Confinamento covalente	Promove a ocorrência concomitante do confinamento das enzimas e as ligações covalentes das moléculas da enzima.
	Glutaraldeído para poli(acrilamida)	Ligação covalente por adsorção Balanço entre a hidrofiliidade-hidrofobicidade do suporte Acoplamento reversível e ligação cruzada intramolecular.	

como suporte. Idealmente esse material deve ter pouca ou nenhuma interação específica com os componentes da amostra, deve ser reativo para a introdução de espaçador e deve ser estável sob condições de vazão, solvente e pressão empregados na análise. Em colunas de afinidade de baixa eficiência o suporte geralmente é constituído de materiais não rígidos e com grande diâmetro (por exemplo, gel de carboidratos ou um polímero orgânico sintético).^{10,64} A baixa pressão de volta produzida por esses suportes permite sua utilização sob baixa gravidade ou com bombas peristálticas, o que confere facilidade e baixo custo em sua utilização para purificação ou pré-tratamento de amostra. No entanto, essa mesma característica limita sua utilização sob condições de alta vazão e pressão inviabilizando seu uso em aplicações analíticas de alta eficiência.⁶⁵

A cromatografia de afinidade de alta eficiência (HPAC) é caracterizada pela utilização de suportes com partículas rígidas, pequenas e capazes de resistir a altas pressões e/ou vazões.⁶⁶ A melhor precisão e rapidez neste tipo de análise tornam a HPAC preferida para aplicações analíticas. Quando as colunas de afinidade são utilizadas como

ferramentas para o estudo das interações soluto-ligante é também chamada de biocromatografia.^{12,13}

Em biocromatografia a eluição zonal é a mais utilizada nos estudos de interações biológicas. Este método baseia-se na injeção do soluto, na coluna cromatográfica, de modo a formar uma zona estreita e medida posterior de seu tempo ou volume de eluição.⁶⁷ As concentrações de amostra são geralmente baixas com condições lineares de eluição, e a fase móvel (geralmente tampões) contém, freqüentemente, concentrações fixas de agentes de competição. Uma vantagem importante dessa técnica é a necessidade de pouca quantidade de soluto por injeção (nmol-pmol). Além disso, há a possibilidade de examinar mais de um composto a cada injeção e pode ser facilmente realizado em sistemas padrão de HPLC.

O segundo método cromatográfico mais comum no estudo de interações biológicas é a análise frontal. Ela difere da análise zonal por envolver a aplicação contínua do analito na coluna. Após completa saturação da coluna (biorreator) pelo analito, este começa a eluir junto com a fase móvel.^{10,67}

Os IMERs foram introduzidos nos anos 90 e têm se mostrado como uma alternativa útil e econômica a métodos convencionais em diversas áreas.^{23,64-70}

No final da década de 90, IMERs contendo receptores e transportadores *trans*-membrana imobilizados foram desenvolvidos para triagem *on-line* de misturas complexas no desenvolvimento racional de fármacos. Os receptores de membrana são mediadores das etapas iniciais da atividade dos fármacos. Wainer e colaboradores iniciaram estudos com receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) imobilizados^{35,62} ou co-imobilizados com receptores do ácido γ -amino butírico (GABA) e receptores N-metil-D-aspartame (NMDA),⁷⁰ além da imobilização dos transportadores da P-glicoproteína.^{71,72} Nesses estudos, foram determinadas as afinidades de ligação (valores de K_d) de compostos para os dois diferentes subtipos de receptores. Esses valores foram usados na identificação e distinção entre os inibidores competitivos e não-competitivos. Uma vez que os receptores imobilizados foram capazes de distinguir entre as atividades dos diferentes subtipos de nAChR ficou demonstrada a possibilidade de aplicação desses IMERs em estudos farmacológicos *on-line* e triagens rápidas para o isolamento e a identificação de candidatos a fármacos a partir de misturas biológicas ou químicas.⁶⁹

Alguns exemplos das recentes aplicações de IMER-HPLC como ferramenta na descoberta de novos fármacos são ilustrados na Tabela 4.³³

Configurações de IMERs em estudos *on-line*

Os IMERs podem ser utilizados em um sistema de cromatografia líquida, como pré- ou pós-coluna analítica, ou fazendo uso da cromatografia multidimensional, através de válvulas de desvio. Como pré-colunas, podem ser utilizados para *clean up* de amostras através de pré-tratamento enzimático, na síntese de compostos quirais ou aquirais, ou em *high throughput screening*. Como pós-coluna, os IMERs podem ser considerados como um detector. Em sistemas *on-line* observou-se que a atividade da enzima imobilizada reflete a atividade da enzima não-imobilizada. Assim, os IMERs podem ser usados nos estudos cinéticos e na determinação das constantes K_M e $V_{máx}$.^{24,58,59,84,85} Algumas vantagens do uso do IMER, como colunas, nos sistemas de HPLC são: a fácil automação e controle; refletem processos biológicos e, podem ser usados diretamente para síntese

e purificação.

Os IMERs utilizados como pré-colunas são facilmente combinados com outros sistemas cromatográficos. Utilizando válvulas de desvio, são sistemas que trabalham independentemente. Pode-se utilizar, também, uma coluna intermediária para o acúmulo do produto da reação enzimática. Através de uma válvula de desvio o produto acumulado pode ser eluído para a coluna analítica, com solvente orgânico adequado, sem causar danos ao IMER.⁷⁴ Dessa forma, evita-se a desnaturação da enzima causada pela utilização de solventes orgânicos e tampões ou pH necessários à separação cromatográfica.⁷⁵

A integração da pré-reação enzimática e etapas de separação do produto são de interesse na análise de metabólitos em matrizes complexas, como urina^{73,76} e tecidos biológicos,⁷⁷ no *clean up* de interferentes presentes em matrizes complexas,⁷⁸ na síntese enantioselectiva *on line* e na purificação de moléculas quirais.^{25,26} Todas, áreas de interesse da indústria farmacêutica.

O IMER preparado com a enzima β -glucuronidase, por exemplo, foi utilizado na determinação de metabólitos de benzeno presentes em urina. Essa matriz complexa foi injetada diretamente no IMER sem qualquer pré-tratamento e os metabólitos analisados em coluna analítica C18 e detecção por fluorescência.⁷⁸

Nos processos estereoquímicos IMERs contendo enzimas como as lipases,^{25,79} a penicilina G acilase⁸⁰ e a quimiotripsina⁸⁰ mostraram-se úteis uma vez que essas enzimas produzem misturas enantiomericamente enriquecidas. Quando se faz uma triagem rápida da capacidade estereosseletiva da enzima contra diferentes substratos, o IMER é acoplado a uma coluna analítica aquiral. Por outro lado, quando se deseja maximizar o rendimento e a pureza dos produtos, utiliza-se como coluna analítica uma coluna quiral.^{54,70-72}

Os ensaios de alta eficiência para triagem de inibidores enzimáticos são métodos fundamentais para a identificação de novos ligantes. Os métodos mais utilizados usualmente envolvem ensaios calorimétricos ou fluorimétricos, utilizando o formato de multi-poços. Entretanto, tais ensaios apresentam desvantagens como: necessidade de reagentes colorimétricos e fluorimétricos adequados para gerar um sinal; interferências causadas por compostos que absorvem ou fluorescem em comprimentos similares ao reagente; ineficiência para triagem em misturas; usualmente utilizam complexos sistemas robotizados.⁸¹ Vários grupos têm descrito análises *off-line* do substrato, produtos

Tabela 4. Aplicações de IMER-HPLC na pesquisa racional de novos fármacos⁸

Enzima imobilizada	Doença alvo	Inibidor	Substrato
Feniletanolamina N-metiltransferase	Hipertensão	Benzilamina, N-etilmaleimida, Ácido <i>p</i> -cloromercuriofenilsulfônico S-Adenosil-L-homocisteína Metildopa	Nometanefrina, Norepinefrina
Dopamina β -hidroxilase	Hipertensão	Captopril, ácido fusárico	Tiramina, ácido ascórbico
Acetilcolinesterase	Mal de Alzheimer Miastenia grave Glaucoma	Tacrina, donepezil, rivastigmina	Acetilcolina, acetilcolina
Glutamina sintetase	Epilepsia, Intoxicação por fármacos.	Fenitoína, carbamazepina, sulfoximina metionina, AMP	Glutamato
N-Acetilglicosaminil transferase-V	Tumores mamários, hepatocelulares e pancreáticos malignos.	Trissacarídeos	UDP-N-acetilglicosamina

ou inibidores no espectrômetro de massas.^{82,83} Como desvantagem, esses sistemas exigem novas alíquotas de enzimas para cada análise, além da entrada da enzima no sistema de massas.

Como alternativa pode-se fazer uso de IMERs acoplados diretamente ao espectrômetro de massas ou utilizados em sistemas de cromatografia de alta eficiência multidimensional, com diferentes sistemas de detecção, como UV e fluorescência e MS, podendo utilizá-los para triagem rápida de misturas.⁸⁴ Utilizando-se espectrometria de massas *tandem* com ionização por *electrospray* (ESI-MS/MS) é possível determinar a identidade dos compostos mais retidos na coluna enzimática, mesmo que presentes em misturas complexas.²¹

Um exemplo muito interessante envolve a enzima acetilcolinesterase (AChE). A enzima AChE está envolvida na hidrólise do neurotransmissor ativo acetilcolina aos compostos colina e ácido acético. Baixos níveis de acetilcolina são encontrados em portadores do Mal de Alzheimer e estão relacionados com o desenvolvimento da doença. Assim, inibidores de AChE são atualmente utilizados no tratamento da doença de Alzheimer, favorecendo o aumento dos níveis de acetilcolina nos pacientes, o que torna essa enzima um ótimo alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento dessa doença.⁸⁵ Andrisano e colaboradores vêm desenvolvendo biorreatores contendo AChE para estudos *on-line* utilizando como suporte, principalmente, os monolitos.³² A enzima AChE foi covalentemente imobilizada sobre discos de monolito etilenodiamina (EDA) usando o glutaraldeído com reagente na derivação. Esse monolito é composto de um material polimérico macroporoso conhecido como CIM (da sigla em inglês para meio de interação conectivo). O micro-biorreator resultante AChE-EDA-CIM foi acoplado a um sistema cromatográfico *on-line* e utilizado como a própria coluna cromatográfica. A eficácia do método para o estudo de inibição foi comprovada utilizando inibidores conhecidos da AChE e os biorreatores foram aplicados aos estudos de determinação da capacidade inibitória IC_{50} (concentração do inibidor capaz de reduzir pela metade a banda do produto obtida em condições de saturação) dos inibidores selecionados e na determinação do mecanismo de ação e das constantes de inibição.³²

Vários trabalhos estão descritos na literatura sobre a inibição e a determinação de constantes cinéticas de diferentes biorreatores^{21,23,30,32,33,76,86,87} A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), por exemplo, é uma oxidase cofator-dependente (NAD^+) responsável pela oxidação fosforilativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (D-G3P), produzindo 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPGA), na presença de NAD^+ com formação de NADH e está envolvida na etapa vital do parasita *Trypanosoma cruzi*, o que a torna um alvo interessante na busca por novos ligantes. As condições para a imobilização, tanto da GAPDH humana quanto a do *Trypanosoma cruzi*, em capilares de sílica fundida, foram recentemente desenvolvidas, com sucesso, assim como as condições cromatográficas para mensurar o NADH formado na reação enzimática através de cromatografia multidimensional. A estabilidade dos IMER, em função do tempo, foi superior a 5 meses para o IMER-GAPDH-Hu⁸⁸ e de 1 mês para o IMER-GAPDH-Tc.⁸⁹

Esses sistemas quando usados na identificação de inibidores seletivos podem fornecer, também, informações sobre o modo de inibição e o cálculo do valor de K_i do inibidor. Entretanto, apenas Wainer e Brenann, utilizando diferentes métodos de análise, têm realizado estudos sobre mecanismo de ação de inibidores. Wainer fez uso, por exemplo, do biorreator de α -quimiotripsina com detecção por UV e adição inicial do inibidor à fase móvel, para equilibrar o biorreator, seguido da adição do substrato.⁸⁶ Pelo método de Brenann, o biorreator é diretamente acoplado ao espectrômetro de massas (ESI-MS/MS) com a infusão simultânea do substrato e do inibidor através do IMER (usado como coluna). O grande diferencial desse método é a determinação de K_i por MS. Usando o modo de múltiplo monitoramento de reação (MRM) os íons específicos do substrato (S) e do

produto (P) são monitorados independentemente para se obter uma razão produto/substrato. Uma vez que a soma de S+P é uma constante conhecida no sistema, a razão P/S pode ser usada com precisão para determinar a concentração do produto que elui do biorreator. Na presença de inibidores essa razão sofre alteração em favor do substrato.²¹ No entanto, em ambos os casos a presença simultânea do substrato e do inibidor na fase móvel pode causar interferências através da forte absorção na detecção por UV e supressão do íon no MS.

Quando os IMERs são usados como pós-coluna, os analitos são inicialmente separados, de maneira convencional, em uma coluna analítica. Apenas os analitos de interesse passam através do IMER e são convertidos nos produtos, usualmente com aumento da absorção, fluorescência ou detecção eletroquímica. Os benefícios dessa técnica são: a possibilidade de evitar a interferência de artefatos, usualmente observados em reações comuns de derivação; a alta reprodutibilidade, mesmo no caso da incompleta conversão pela enzima ou da instabilidade do produto de reação.⁹⁰ As desvantagens são geralmente devidas ao alargamento da banda cromatográfica e aos efeitos de diluição de reagentes eventualmente adicionados; à necessidade de, algumas vezes, aumentar a sensibilidade do método analítico pela derivação do produto; à necessidade de modificar as condições experimentais utilizadas na etapa de separação, que são diferentes daquelas necessárias para que ocorra a reação enzimática como, por exemplo, mudança no valor de pH, troca dos solventes orgânicos ou alteração na temperatura.⁹¹

Quando possível, o uso do IMER, como pós-coluna analítica, se torna uma boa escolha uma vez que pode ser conectado diretamente a detectores específicos e não há necessidade de sucessivas etapas de separação.

Exemplos de ensaios utilizando enzimas imobilizadas, em diferentes suportes cromatográficos, acopladas a sistemas de HPLC para estudos *on-line* são encontrados na literatura recente. Alguns exemplos são sumarizados na Tabela 5.

MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Os vários métodos de imobilização empregados baseiam-se nas ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte. Os mais utilizados são: adsorção física (interações hidrofóbicas e de van der Waals) e química (ligação covalente e iônica), imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula e ligação cruzada. Esses métodos são sumarizados na Figura 1.

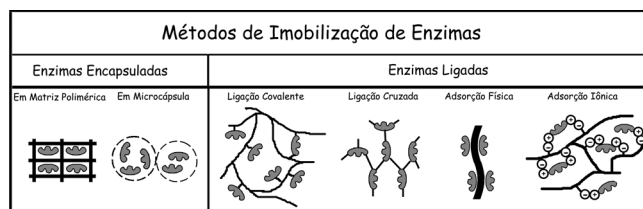


Figura 1. Principais métodos de imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas pode ser feita *in batch* ou *in situ*. No processo *in batch*, a enzima é primeiramente imobilizada sobre o suporte cromatográfico e, em seguida, empacotada na coluna. Já no processo *in situ*, a enzima é imobilizada diretamente na coluna previamente empacotada. Alguns estudos de comparação entre os dois modos na imobilização da *Penicilium G* acilase (PGA), utilizando vários suportes derivados de sílica, demonstraram que os melhores resultados em termos de quantidade de PGA ligada foram obtidos pela técnica *in situ*. Observou-se, ainda, que durante o processo *in batch* a atividade catalítica pode ser diminuída.⁷³

Na *imobilização por adsorção física* a enzima fica retida na su-

Tabela 5. Diferentes suportes e enzimas imobilizadas e aplicações dos IMER obtidos

Suporte	Técnica de imobilização	Agentes ativantes	Enzima	Comentários	Ref.
Sílica Aminopropilada	Covalente	DSC ou DSS	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Imobilização <i>in situ</i> . Emprego no estudo de reações enantiosseletivas.	25
Octadecil Sílica	Adsorção		Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Imobilização <i>in situ</i> . Emprego no estudo de reações enantiosseletivas	25
Monolítica	Covalente	3-glicidopropil-metox-isilano	tripsina	Digestão <i>on-line</i> e identificação de proteínas. Uso do sistema de LC-ESI-MS-MS	30, 92
Sílica	Covalente		uridina difosfato glucuronosiltransferase (UDPGT)	A sílica nucleosil é convertida à forma diol e, então, a um aldeído. A enzima é imobilizada e a Base de Schiff formada reduzida usando cianoborodreto de sódio.	93
Tiopropil sefarose	Ligação covalente (S-S)		Diidrofolato Redutase de <i>Plasmodium falciparum</i>	Avaliação de inibidores com maior afinidade pela enzima a partir de bibliotecas de moléculas (química combinatória)	94
Meio de interação conectivo monolítico formato de disco (CIM) EDA-CIM Epoxi-CIM Glutaraldeído-P	Covalente	glutaraldeído	Acetilcolinesterase recombinante humana (rhAChE)	Estudo e caracterização de inibidores reversíveis e pseudo-reversíveis. Determinação de IC ₅₀	31, 32, 95
Aminopropila-CPG	Covalente	glutaraldeído	Fosfatase ácida	Imobilização <i>in batch</i> . Emprego na determinação de riboflavinas fosfatase totais.	96, 97
Sílica	Covalente		β -glucuronidase	Análise de metabólitos de glucuronide na urina.	22
Resina Metacrilato	Covalente	Avidina	P-glicoproteína	Membranas de pgp. Imobilização <i>in batch</i> . Cromatografia frontal.	71
monolito	Intercruzamento		γ -glutamyl transpeptidase	Processo de sol-gel biocompatível. Otimização da retenção e da atividade enzimática. Coluna capilar. Comparação entre 35 diferentes composições de sílica.	98
monolito	Intercruzamento (sol-gel)		Receptor trans-membrana de acetilcolina	Colunas capilares de afinidade para utilização em cromatografia frontal acoplado a espectrometria de massas.	99
Aminopropil-CPG	Covalente	glutaraldeído	Acetilcolina esterase/ Colina oxidase	Imobilização <i>in batch</i> , pós-coluna. Co-imobilização. Utilização em análises de colina e acetilcolina em amostras e urina.	99
Aminopropil- CPG	Covalente	nitrato de sódio	Glucose oxidase	Imobilização <i>in batch</i> , pós-coluna. Emprego na análise de glucose e seus metabólitos em amostras de urina.	100
Sílica altamente porosa	Covalente	Glutaraldeído	Endoglucanases	Imobilização <i>in situ</i> , pré-coluna. IMER no formato de <i>microchip</i> empregado na hidrólise de metil celulose.	101
Capilar de sílica fundida	Covalente	Glutaraldeído	Lipossomos	Imobilização <i>in situ</i> . Empregado na análise de interações fármaco-membrana.	102
Capilar de sílica fundida	Covalente	Glutaraldeído	Gliceraldeído-3-fosfato hidrogenase humana e de <i>T. cruzi</i>	Imobilização <i>in situ</i> . Determinação de K _M e V _{máx} .	88, 89
IAM (membrana artificial imobilizada)			Álcool Desidrogenase	Imobilização <i>in situ</i> , pré-coluna. Emprego na síntese estereosseletiva de álcoois.	26

Tabela 5. continuação

Suporte	Técnica de imobilização	Agentes ativantes	Enzima	Comentários	Ref.
Aminopropil CPG	Covalente	Glutaraldeído	Tirosinase	Imobilização <i>in situ</i> . Determinação de K_M e $V_{máx}$. Emprego na remoção de fenóis em solução aquosa.	17, 103
Nanoesferas de Sílica	Encapsulação		Butirilcolinesterase	Determinação de K_M e $V_{máx}$. Emprego na triagem de inibidores seletivos.	104
sfílica	Encapsulação usando PEI (polímero poliaminado) como mediador		nitrobenzeno nitroreductase	Microrreator. Aplicação: triagem de pró-fármacos para o tratamento de câncer.	105
IAM			Monoamina Oxidase A e B	Imobilização <i>in situ</i> . Determinação de K_M e $V_{máx}$. Estudos de inibição com determinação do IC_{50} .	23
Aminopropil Sílica (com diâmetro do poro de 100 e 200 Å) e Coluna epoxi	Covalente		Penicilina G acilase	Comparação entre a imobilização <i>in situ</i> e <i>in batch</i> e a utilização de dois diferentes suportes.	106
IAM e glutaraldeído-P	Covalente		Dopamina β -hidroxilase	Imobilização <i>in batch</i> , pré-coluna. Determinação de K_M e $V_{máx}$.	60
Aquapore® Ax-300 troca iônica	Adsorção		Colina oxidase	Imobilização <i>in situ</i> , pós-coluna. Análise de colina em plasma humano.	107
Algodão	Covalente	Glutaraldeído	β -galactosidase	IMER operando em larga escala. Hidrólise da lactose no leite.	108
monolítica	Intercruzamento		<i>Horsersadish</i> peroxidase (HRP)	Processo de sol-gel biocompatível. Otimização da retenção e da atividade enzimática.	109
Glutaraldeído-P	Covalente		phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT)	Determinação de K_M e $V_{máx}$. Emprego no estudo de inibição seletiva.	110
IAM			α -quimiotripsina e tripsina	Estudo da influência de pH e temperatura e interações enzima/substrato e enzima/inibidor.	111
Celulose	Adsorção		α -quimiotripsina e tripsina	Estudo do efeito do pH e da concentração de enzima. Elucidação do mecanismo de adsorção da enzima sobre a celulose.	112
Capilar de sílica fundida	Covalente	APTS-biotina-avidina-biotina	Tripsina	Imobilização <i>in situ</i> . Aplicação na digestão de proteínas.	113
sfílica mesoporosa mesocelular (HMMS)	Adsorção seguida de ligação cruzada usando Glutaraldeído	Glutaraldeído	α -quimiotripsina e lipase	Uso de agregados de enzima com ligação cruzada. Estudo da estabilidade enzimática frente ao emprego de um novo suporte.	114
Membrana de polisulfona	Covalente	Cloreto de acrilóila	Endo-1,4- β -xilanase	Avaliação de um novo suporte. Caracterização física da membrana antes e após a imobilização.	115
Capilar de sílica fundida	Covalente		(TPCK)-tripsina e pepsina	Imobilização <i>in situ</i> . Emprego na digestão de proteínas <i>on-line</i> . Acoplado ao ESI-TOF-MS.	116
IAM	Covalente		Glutamina sintetase	Determinação de K_M e $V_{máx}$. Emprego no estudo de inibidores.	117

perfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, através de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas. Tal método promove pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima. Porém, apresenta como desvantagem a dessorção da enzima durante sua utilização.^{118,119}

Na **imobilização por adsorção iônica**, a enzima se une ao suporte através de atrações eletrostáticas estabelecidas entre as cargas opostas presentes, tanto na superfície do suporte, quanto da enzima. Essa união é mais efetiva que a adsorção física, mas é inferior quando comparada com outros métodos.^{38,118,119}

A imobilização por ligação covalente é um dos métodos mais utilizados no preparo de IMERs. Envolve a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima [(NH₂) da lisina e arginina, o CO₂H do ácido aspártico ou glutâmico, o (OH) da serina ou tionina e o grupo (SH) da cisteína]. Nesse procedimento estão envolvidas duas etapas químicas: na primeira, os grupos funcionais do suporte (aminoalquila, aminoarila, 3-glicidoxipropil-carboxila, etc) são ativados por reagentes específicos como, por exemplo, o glutaraldeído, que introduz um grupo carbonila, susceptível a reações com os grupos nucleofílicos da enzima. No caso de formação de bases de Schiff, estas são reduzidas, quando necessário, utilizando-se reagentes, como o cianoborodireto de sódio, o tetraidroborato de sódio ou o borodireto de sódio (Esquema 1).^{96,97}

Os grupos imino presentes em suportes aminopropilados também podem ser eliminados utilizando-se carbonato de N-N'-disuccinimidila (DSC) (Esquema 2a) ou do suberato de N-N'-disuccinimidila (DSS) (Esquema 2b) como agentes ativadores ou, ainda, pela introdução de cadeias carbônicas longas entre o suporte aminopropilado e a enzima a fim de aumentar a hidrofobicidade do IMER. O grupo carboxila introduzido à superfície do suporte através dos reagentes é altamente susceptível a reações com os grupos nucleofílicos da enzima, favorecendo a reação.¹²⁰

O processo de silanização é realizado para introduzir um espaça-

dor entre a enzima e o suporte. Uma solução de 3-aminopropiltri-etoxissilano (APTS), ou outro reagente silanizante, reage com os grupos hidroxilas ou silanóis do suporte. Os grupos aminopropila servem, então, para a imobilização da enzima. (Esquema 3)

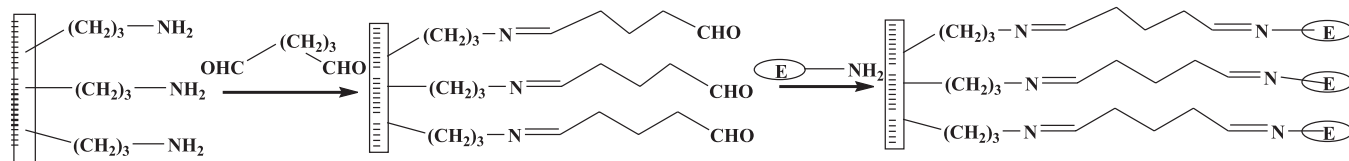
Como vantagens, a imobilização covalente evita o fenômeno de dessorção, a diminuição da velocidade de desativação espontânea, além de aumentar o tempo de vida útil e da estabilidade térmica do biorreator. As ligações covalentes promovem rigidez na estrutura da enzima, limitando seu movimento quando submetida a altas temperaturas. No entanto, apresenta como desvantagem a facilidade em alterar a estrutura terciária nativa da enzima, com subsequente redução da atividade catalítica.¹²⁰

Na **imobilização em matriz de gel**, a enzima está livre em solução, mas com seu movimento restrito por uma rede de gel ou polímero. A enzima é misturada aos componentes que formarão o gel e, quando esse é formado, a enzima fica presa à matriz. A porosidade da matriz deve evitar a perda de enzima e, ao mesmo tempo, permitir o livre movimento do substrato e do produto.^{38, 119,120}

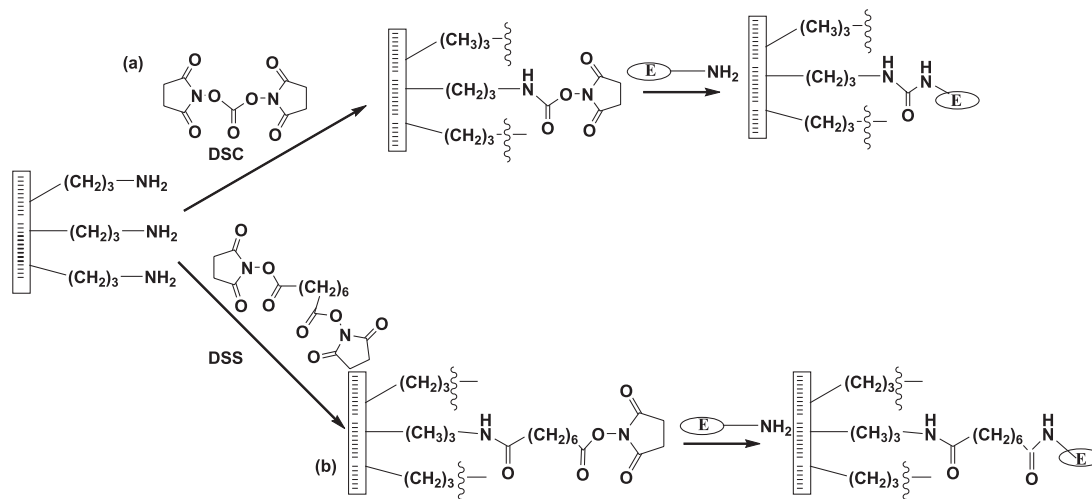
O **método de sol-gel biocompatível** para a imobilização, por aprisionamento, tem sido aplicado por diferentes grupos de pesquisa em uma grande variedade de proteínas solúveis,^{121,122} proteínas de membrana^{29,123} e, também, no preparo de colunas de bioafinidade.⁹⁸ No processo de preparo das colunas, tanto a formulação do gel quanto as condições de processamento devem ser ajustadas para produzir materiais com diâmetros de mesoporos adequados que proporcionem o aumento da quantidade de proteínas imobilizadas, além de uma considerável melhora nas propriedades de vazão.^{122,124}

A **imobilização em microcápsula** pode ser obtida pelo envolvimento das enzimas por membranas semipermeáveis, ou por micelas reversas formadas por surfactantes. As enzimas permanecem livres em solução, mas em um espaço restrito.¹¹⁸

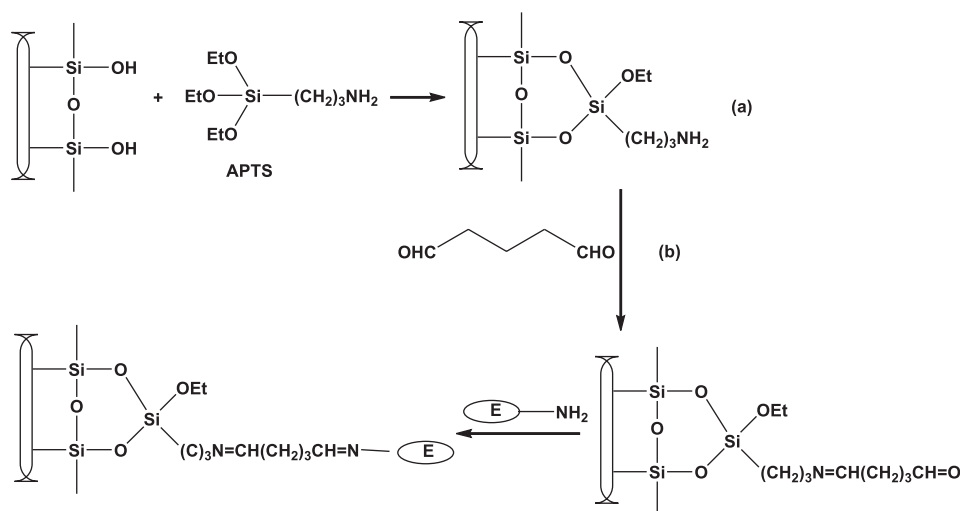
A **imobilização por ligação cruzada** é livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa. Pode



Esquema 1. Reação de suportes aminopropilados para imobilização covalente, usando o glutaraldeído como agente de ativação



Esquema 2. Reações de suportes aminopropilados para imobilização covalente, usando como agentes ativadores (a) o carbonato de N-N'-disuccinimidil (DSC) e (b) o suberato de N-N'-disuccinimidila (DSS)



Esquema 3. Imobilização por ligação covalente: (a) silanização, (b) adição do reagente espaçador, reação com glutaraldeído

ser obtida via métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi- ou multifuncionais. Como desvantagens do método estão a baixa retenção da atividade e a baixa estabilidade mecânica, que dificulta sua aplicação industrial, além de pouca reprodutibilidade.¹²⁵ Como alternativas ao método convencional foram desenvolvidos os métodos por ligação cruzada utilizando enzimas cristalinas (CLEC - *cross-linked enzymes crystals*) e o método de formação de agregados físicos, por precipitação, e subsequente entrecruzamento (CLEAs - *cross-linked enzyme aggregates*) das enzimas do agregado.¹²⁵ O uso dos CLEAs tem atraído a atenção, por sua simplicidade, extensa aplicação, alta estabilidade e preservação da atividade.^{12,125,127}

Maiores detalhes sobre tais métodos de imobilização podem ser vistos na recente revisão de Sheldon.¹²⁵

EFEITOS DA IMOBILIZAÇÃO NA BIOMOLÉCULA

Após a imobilização, as propriedades físicas e químicas da enzima podem sofrer modificações. Devem ser considerados os efeitos da imobilização sobre a estabilidade, as propriedades cinéticas e especificidade além da produtividade da enzima.¹²⁸ As diferenças no comportamento da enzima imobilizada, quando comparada à sua forma em solução, devem-se aos seguintes fatores: efeitos conformacionais - modificação conformacional da molécula de enzima devido à alteração na estrutura terciária do sítio ativo; efeitos estereoquímicos - uma parte da molécula da enzima é imobilizada numa posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível; efeitos difusionais ou de transferência de massa - têm origem na resistência de difusão do substrato até o sítio catalítico da enzima, e do produto da reação; efeitos microambientais - resultantes do método de imobilização utilizado ou da presença e natureza (hidrofóbica ou hidrofílica) do suporte na vizinhança da enzima. Todos esses fatores podem influenciar as propriedades da enzima imobilizada que adquirem novas propriedades cinéticas, modificações em seus valores de K_M e V_{max} (velocidade máxima de reação enzimática), deslocamento dos valores de pH e comportamento diferente, em relação à temperatura.³

O aumento da estabilidade pode se dar em função da estabilização da estrutura da proteína ou simplesmente porque enzimas imobilizadas estão menos acessíveis a agentes desnaturantes ou a ataques de microorganismos.³⁸ Essa estabilidade é regida pelo número e a natureza das ligações formadas entre a enzima e o suporte; pelo grau de confinamento da enzima ao suporte; pelo micro-ambiente formado entre a enzima e o suporte e as condições de imobilização.¹²⁹

Algumas estratégias podem ser utilizadas para aumentar a estabilidade de enzimas imobilizadas.^{15,127,128} A imobilização multipontual, por exemplo, pode promover o aumento da rigidez da molécula da enzima tornando-a mais resistente a mudanças conformacionais.¹⁵ Outra estratégia é a introdução de espaçadores, o que permite o distanciamento entre a enzima e suporte promovendo maior liberdade reduzindo assim, a ocorrência de impedimentos estéricos.^{15,129} Além disso, a resistência à transferência de massa diminui com o aumento da vazão e da agitação,¹³⁰ tornando importante a investigação do efeito da vazão sobre os valores de K_M e V_{max} em enzimas imobilizadas.^{28,58}

Propriedades cinéticas de enzimas imobilizadas

O efeito da imobilização sobre as moléculas de enzima pode ser investigado comparando-se a atividade da enzima imobilizada com aquela observada na enzima em solução. A razão entre essas atividades é chamada de eficiência de imobilização (η).²⁹

$$\eta = \frac{AE_i}{AE_s}$$

onde: AE_i = atividade da enzima imobilizada; AE_s = atividade da enzima em solução; η = eficiência de imobilização, geralmente é menor que 1.

Além do efeito de impedimento estérico causado pelo suporte, as mudanças conformacionais e na estrutura tridimensional da molécula da enzima, especialmente no sítio ativo, tornam esse centro menos acessível causando uma diminuição da atividade catalítica. A estrutura terciária das enzimas é formada através de interações intermoleculares, como ligações hidrogênio, ligações π - π , ponte de dissulfeto e interações eletrostáticas. As interações eletrostáticas são sensíveis ao pH de sua vizinhança e mudanças nesse pH podem resultar em mudanças no padrão de cargas e, conseqüentemente, em mudanças na estrutura terciária da enzima. Essas mudanças podem alterar o sítio ativo da enzima, promovendo o aumento ou diminuição da atividade enzimática. Estudos do efeito no ambiente da enzima, causado pelo processo de imobilização, demonstraram que o uso de suportes com cargas pode causar o deslocamento do pH de maior atividade da enzima.^{131,132}

Para diminuir os efeitos do deslocamento de pH na atividade das enzimas imobilizadas algumas estratégias são usadas: o tipo e a força iônica do tampão de imobilização utilizado, alteração do tamanho da partícula do suporte e co-imobilização de enzimas que capturem os

prótons gerados durante a reação de imobilização.¹³³

Um aspecto fundamental durante o processo de imobilização é que a enzima mantenha sua atividade catalítica. Para tanto, deve-se assegurar que o sítio ativo não reaja durante o processo de imobilização. Isso pode ser feito pela imobilização da enzima na presença do substrato, do produto da reação catalítica, ou de um inibidor competitivo em concentrações de saturação. Esse procedimento reduz a percentagem de enzima imobilizada em conformação não catalítica. A atividade da enzima imobilizada pode então ser restaurada pela simples lavagem do IMER, removendo essas micromoléculas.¹¹⁹

SUPORTES CROMATOGRÁFICOS

O suporte ideal deve ser inerte, estável e resistente à força mecânica. Outras propriedades também devem ser consideradas: forma, distribuição e tamanho de poro, capacidade de expansão, além das cargas.¹²⁰ Uma variedade de suportes encontra-se disponível comercialmente, entre estes os de polissacarídeos, como a celulose, a dextrana e a agarose, e os suportes de sílica, como a sílica comum ou derivada. Muitas vezes o aumento da estabilidade, da seletividade e da atividade da enzima é obtido através da combinação de diferentes técnicas de imobilização e da seleção apropriada do suporte.^{16,17,120} A Tabela 5 lista uma variedade de suportes cromatográficos e diversas aplicações. Assim, as vantagens e desvantagens entre os métodos e suportes devem ser consideradas em cada caso específico.

CONCLUSÃO

A diversidade de modos de aplicação dos IMERs mostra a sua utilidade nas variadas áreas da ciência. Merecem destaque os métodos desenvolvidos para triagem seletiva de inibidores.

Essa revisão discutiu de modo aprofundado os parâmetros que influenciam a atividade, a cinética e a estabilidade das enzimas imobilizadas. Foram, também, discutidos os cuidados necessários e efeitos causados pela seleção do suporte para imobilização. Mostrou, ainda, um levantamento histórico do desenvolvimento e uso dos IMERs. Espera-se que essa revisão desperte o interesse para os novos modos de uso da cromatografia de afinidade.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de pesquisa de Iniciação Científica, mestrado e pós-doutoramento e auxílio financeiro via projeto de auxílio à pesquisa. Ao CNPq pelo apoio financeiro através da reserva técnica de pesquisador.

REFERÊNCIAS

- Dixon, M.; Webb, E. C.; *Enzymes*, Academic Press: New York, 1979.
- Koeller, K. M.; Wong, C. H.; *Nature* **2001**, 409, 232.
- Markoglou, N.; Wainer, I. W. Em *Bioanalytical Separations*; Wilson, I. D., ed.; Elsevier Science: New York, 2003, cap. 7.
- Hasan, F.; Ali Shah, A.; Hameed, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39, 235.
- Van Beilen, J. B.; Li, Z.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 338.
- Liang, J. F.; Li, Y. T.; Yang, V. C.; *J. Pharma. Sci.* **2000**, 89, 979.
- Amine, A.; Hasna Mohammadi, H.; Ilhame Bourais, I.; Palleschi, G.; *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 1405.
- Copeland, R. A.; *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal Chemists and Pharmacologists*, Wiley: New Jersey, 2005.
- Freitag, R.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1999**, 722, 279.
- Hage, D. S.; Tweed, S. A.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1997**, 699, 499; Emnéus, J.; Marko-Varga, G.; *J. Chromatogr., A* **1997**, 703, 191.
- Wainer, I. W.; Kaliszán, R.; Noctor, T.; *J. Pharm. Pharmacol.* **1993**, 45, 367.
- Hage, D. S.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, 768, 3.
- Kaliszán, R.; Wainer, I. W. Em *Chromatographic Separations Based on Molecular Recognition*; Jinno, K., ed.; Wiley: New York, 1997.
- Shimada, K.; Oe, T. J.; *Chromatogr. Biomed. Appl.* **1989**, 492, 345; Bao, J. J.; Fujima, J. M.; Danielson, N. D.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1997**, 669, 481.
- Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorete, G.; Guisa, J. M.; Fernandez-Lorete, R.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, 40, 1451.
- Zhang, Y.; Xiao, Y.; Kellar, K. J.; Wainer, I. W.; *Anal. Biochem.* **1998**, 264, 22.
- Girelli, A. M.; Mattei, E.; Messina, A.; *Sens. Actuators B* **2007**, 121, 515.
- Boer, A. R.; Lingeman, H.; Niessen, W. M. A.; Irth, H.; *Trends. Anal. Chem.* **2007**, 26, 867; Zhou, S.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, 797, 63; Bao, J. J.; Fujima, J. M.; Danielson, N. D.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1997**, 669, 481.
- Liese, A.; Villela Filho, M.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10, 595.
- Urban, P. L.; Goodall, D. M.; Bruce, N. C.; *Biotechnol. Advances* **2006**, 24, 42.
- Hodgson, R. J.; Besanger, T. R.; Brook, M. A.; Brennan, J. D.; *Anal. Chem.* **2005**, 77, 7512.
- Pasternyk, M.; Ducharme, M. P.; Descorps, V.; Felix, G.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., A* **1998**, 828, 135.
- Markoglou, N.; Hsuesh, R.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, 804, 295.
- Bertucci, C.; Petri, A.; Felix, G.; Perini, B.; Salvatori, P.; *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, 10, 455.
- Calleri, E.; Temporini, C.; Furlanetto, S.; Loiodice, F.; Fracchiolla, G.; Massolin, G.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 32, 715.
- Sotolongo, V.; Johnson, D. V.; Wahnón, D.; Wainer, I. W.; *Chirality* **1999**, 11, 39.
- Calleri, E.; Temporini, C.; Perani, E.; Stella, C.; Rudaz, S.; Lubda, D.; Mellerio, G.; Veuthey, J.-L.; Caccialanza, G.; Massolini, G.; *J. Chromatogr., A* **2004**, 1045, 99.
- Temporini, C.; Perani, E.; Mancini, F.; Bartolini, M.; Calleri, E.; Lubda, D.; Felix, G.; Andrisano, V.; Massolini, G.; *J. Chromatogr., A* **2006**, 1120, 121.
- Besanger, T. R.; Chen, Y.; Deisingh, A. K.; Hodgson, R.; Jin, W.; Mayer, S.; Brook, M. A.; Brennan, J. D.; *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2382.
- Bartolini, M.; Cavrini, V.; Andrisano, V.; *Anal. Biochem.* **2005**, 342, 163.
- Bartolini, M.; Cavrini, V.; Andrisano, V.; *J. Chromatogr., A* **2007**, 1144, 102.
- Bartolini, M.; Cavrini, V.; Andrisano, V.; *J. Chromatogr., A* **2004**, 1031, 27.
- Bertucci, C.; Bartolini, M.; Gotti, R.; Andrisano, V.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, 797, 111.
- Andrisano, V.; Bartolini, M.; Gotti, R.; Cavrini, V.; Felix, G.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2001**, 753, 375.
- Baynham, M. T.; Patel, S.; Moaddel, R.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, 772, 155.
- Lysenko, V.; Delhomme, G.; Soldatkin, A.; Strikha, V.; Dittmar, A.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; *Talanta* **1996**, 43, 1163; Katz, E.; Riklin, A.; Heleg-Shabtai, V.; Willner, I.; Buckmann, A. F.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, 385, 45; Savitri, D.; Mitra, C. K.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, 47, 67; Atanasov, P.; Yang, S.; Salehi, C.; Ghindilis, A. L.; Wilkins,

- E.; Schade, D.; *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 669; Fang, Q.; Shi, X. T.; Sun, Y. Q.; Fang, Z. L.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3570; Zhang, Y. Q.; Zhu, J.; Gu, R. A.; *Appl Biochem. Biotechnol.* **1998**, *75*, 215; Pandey, P. C.; Upadhyay, S.; Pathak, H. C.; *Electroanalysis* **1999**, *11*, 59; Zhou, D. M.; Ju, H. X.; Chen, H. Y.; *Sens. Actuators, B* **1997**, *40*, 89; Markovarga, G.; Appelqvist, R.; Gorton, L.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, *179*, 371; Marzouk, S. A. M.; Cosofret, V. V.; Buck, R. P.; Yang, H.; Cascio, W. E.; Hassan, S. S. M.; *Anal. Biochem.* **1997**, *69*, 2646; Marazuela, M. D.; Cuesta, B.; Moreno Bondi, M. C.; Quejido, A.; *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 233; Gilmartin, M. A. T.; Hart, J. P.; *Analyst* **1994**, *119*, 2332.
37. Mosbach, K.; *FEBS Lett.* **1976**, *62*, E-80.
 38. Marconi, W.; *Reactive Polymers* **1989**, *11*, 1.
 39. Hage, D. S.; Ruhn, P. F. Em *Handbook of Affinity Chromatography*; Hage, D. S., ed.; CEC Press: Boca Raton, 2005.
 40. Starkestein, E.; *Biochem. Z.* **1910**, *24*, 210.
 41. Campbell, D. H.; Luescher, E.; Lerman, L. S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1951**, *37*, 575.
 42. Hjerten, S.; *Biochem. Biophys. Acta* **1964**, *79*, 393.
 43. Cuatrecasas, P.; Wilchek, M.; Anfinsen, C. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1968**, *68*, 636.
 44. Takasaki, Y.; Kosugi, Y.; Kanbayashi, K. Em *Fermentation Advances*; Perlman, D., ed.; Academic Press: New York, 1969.
 45. Tosa, T.; Mori, T.; Chibata, I.; *Agr. Biol. Chem.* **1969**, *33*, 1053; Tosa, T.; Mori, T.; Fusen, N.; Chibata, I.; *Agr. Biol. Chem.* **1969**, *33*, 1047; Chibata, I.; *Immobilized Enzymes*, John Wiley & Sons: New York, 1978.
 46. Cao, L. Em *Carrier-bound Immobilized Enzymes: principles, applications and Design*; Cao, L.; Schmid, R. D., eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2006.
 47. Schiel, J. E.; Mallik, R.; Soman, S.; Joseph, K. S.; Hage, D. S.; *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 719.
 48. Dunn, B. M.; Chaiken, I. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, *71*, 2382.
 49. Kasai, K.-I.; Ishii, S.-I.; *J. Biochem.* **1975**, *78*, 653.
 50. Lagercrantz, C.; Larson, T.; Karlsson, H.; *Anal. Biochem.* **1979**, *99*, 352.
 51. Allenmark, S.; Bomgren, B.; Boren, H.; *J. Chromatogr.* **1984**, *316*, 617; Allenmark, S.; Andersson, S.; Bojarski, J.; *J. Chromatogr.* **1988**, *436*, 479.
 52. Loun, B.; Hage, D. S.; *J. Chromatogr.* **1992**, *579*, 225; Noctor, T. A. G.; Wainer, I. W.; Hage, D. S.; *J. Chromatogr.* **1992**, *577*, 305; Dalgaard, L.; Hansen, J. J.; Pedersen, J. L.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1989**, *7*, 361; Kalisznan, R.; Noctor, T. A. G.; Wainer, I. W.; *Mol. Pharmacol.* **1992**, *42*, 512.
 53. Loun, B.; Hage, D. S.; *J. Chromatogr.* **1992**, *579*, 225.
 54. Boppana, V. K.; Lynn, R. K.; Ziemniak, J. A.; *J. Pharm. Sci.* **1989**, *78*, 127; Akasaka, R.; Mashino, T.; Hirode, M.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *301*, 355; Di Marco, M. P.; Felix, G.; Descorps, V.; Ducharme, M.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1998**, *715*, 379
 55. Calleri, E.; Massolini, G.; Loiodice, F.; Fracchiolla, G.; Temporini, C.; Felix, G.; Tortorella, P.; Caccialanza, G.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *958*, 131; Massolini, G.; Calleri, E.; Lavecchia, A.; Loiodice, G.; Lubda, D.; Temporini, C.; Fracchiolla, G.; Tortorella, P.; Novellino, E.; Caccialanza, G.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 535.
 56. Jadaud, P.; Thelohan, S.; Schonbaum, G. R.; Wainer, I. W.; *Chirality* **1989**, *1*, 38; Jadaud, P.; Wainer, I. W.; *Chirality* **1990**, *2*, 32; Felix, G.; Descorps, V.; *Chromatogr.* **1999**, *49*, 595.
 57. Markoglou, N.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *948*, 249; Greaney, M. D.; Marshall, D. L.; Bailey, B. A.; Acworth, I. N.; *J. Chromatogr.* **1993**, *622*, 125; Gunatna, P. C.; Wilson, G. S.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 402; Potter, P. E.; Meek, J.; Neff, N. H.; *J. Neurochem.* **1983**, *41*, 188; Leon-Gonzalez, M. E.; Townshend, A.; *J. Chromatogr.* **1991**, *539*, 47; Salamoun, J.; Remiem, J.; *J. Pharma. Biomed. Anal.* **1992**, *10*, 931; Zhang, B.; Palcic, M. M.; Schiemer, D. S.; Alvarez-Manilla, G.; Pierce, M.; Hindsgaul, O.; *Anal. Biochem.* **2001**, *299*, 173; Schiemer, D. C.; Bundle, D. R.; Li, L.; Hindsgaul, O.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 3383.
 58. Bartolini, M.; Andrisano, V.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *978*, 331
 59. Markoglou, N.; Wainer, I. W.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *48*, 61.
 60. Markoglou, N.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2001**, *766*, 145.
 61. Bailon, P.; Ehrlich, G. K.; Fung, W.-J.; Berthold, W., eds.; *Methods in Molecular Biology: Affinity Chromatography-Methods and Protocols*, Humana Press Inc.: Totowa, 2000, vol. 147.
 62. Moaddel, R.; Lu, L. L.; Baynham, M.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *768*, 41.
 63. Kamimore, H.; Konishi, M.; *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 1085.
 64. Hage, D. S. Em *Handbook of HPLC*; Katz, E.; Eksteen, R.; Shoemaker, P.; Miller, N., eds.; Marcel Dekker: New York, 1998, p. 483-498.
 65. Walters, R. R.; *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1099A.
 66. Larsson, P. O.; *Methods Enzymol.* **1987**, *104*, 212; Hage, D. S.; *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 593.
 67. Chaiken, I. M.; *Analytical Affinity Chromatography*, CRC Press: Boca Raton, 1987.
 68. Zhang, Y.; Xiao, Y.; Kellar, K. J.; Wainer, I. W.; *Anal. Biochem.* **1998**, *264*, 22; Wainer, I. W.; Zhang, Y.; Xiao, Y.; Kellar, K. J.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1999**, *724*, 65; Moaddel, R.; Wainer, I. W.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *30*, 1715.
 69. Moaddel, R.; Jozwiak, K.; Yamaguchi, R.; Cobello, C.; Whittington, K.; Sankar, B.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *813*, 235.
 70. Moaddel, R.; Cloix, J.-F.; Erten, G.; Wainer, I. W.; *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 104.
 71. Moaddel, R.; Bullock, P. L.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *799*, 255.
 72. Lu, L.; Leonessa, F.; Clarke, R.; Wainer, I. W.; *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 64; Zhang, Y.; Leonessa, F.; Clarke, R.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2000**, *739*, 33.
 73. Calleri, E.; Marrubini, G.; Massolini, G.; Lubda, D.; Fazio, S. S.; Furlanetto, S.; Wainer, I. W.; Manzo, L.; Caccialanza, G.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *35*, 1179.
 74. Yamato, S.; Kawakami, N.; Shimada, K.; Ono, M.; Idei, N.; Itoh, Y.; Tachikawa, E.; *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 210; Ono, M.; Idei, N.; Nakajima, T.; Itoh, Y.; Kawakami, N.; Shimada, K.; Yamato, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *29*, 325; Yamato, S.; Kawakami, N.; Shimada, K.; Ono, M.; Idei, N.; Itoh, Y.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *896*, 171.
 75. Tomer, S.; Dorsey, J. G.; Berthod, A.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *223*, 7.
 76. Jen, J. F.; Tsai, M. Y.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1994**, *658*, 87.
 77. Kato, T.; Liu, L.; Yamamoto, K.; Osborne, P. G.; Niwa, O.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1996**, *682*, 162.
 78. Tsai, T. R.; Cham, T. M.; Chen, K. C.; Chen, C. F.; Tsai, T. H.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1996**, *678*, 151.
 79. Kawakami, K.; Abe, D.; Urakawa, T.; Kawashima, A.; Oda, Y.; Takahashi, R.; Sakai, S.; *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3077; Vulfson, E. N. Em *Lipases: Their Structure, Biochemistry and application*; Woolley, R.; Petersen, S. B., eds.; Cambridge University Press: Cambridge, 1994, p. 271-288.
 80. Liljeblad, A.; Kanerva, L. T.; *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 5831; Estruch, I.; Tagliani, A. R.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R.; Alcántara, A. R.; Tomad, L.; Terreni, M.; *Enzyme Microbiol. Technol.* **2008**, *42*, 121.
 81. Houston, J. G.; Banks, M.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 734.
 82. Bothner, B.; Chavez, R.; Wei, J.; Strupp, C.; Phung, Q.; Schneemann, A.; Siuzdak, G.; *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13455; Benetton, S.; Kameoka,

- J.; Tan, A.; Wachs, T.; Craighead, H.; Henion, J. D.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6430; Lei, Q. P.; Lamb, D. H.; Heller, R. K.; Shannon, A. G.; Ryall, R.; Cash, P.; *Anal. Biochem.* **2002**, *310*, 122; Pi, N.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R.; Leary, J.; *Biochemistry* **2002**, *41*, 13283; Pi, N.; Leary, J. A.; *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2004**, *15*, 233.
83. de Boer, A. R.; Letzel, T.; van Elswijk, D. A.; Lingeman, H.; Niessen, W. M. A.; Irth, H.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3155.
84. Ng, E. S. M.; Yang, F.; Kameyama, A.; Palcic, M. M.; Hingsgaul, O.; Scheimer, D. C.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6125.
85. Bartus, R. T.; *Science* **1982**, *217*, 408; Gualtieri, F.; Dei, S.; Manetti, D.; Romanelli, M. N.; Sacpecchi, S.; Teodori, S.; *Il Farmaco* **1995**, *50*, 489.
86. Alebic-Kolbah, T.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., A* **1993**, *653*, 122.
87. Chan, N. W.; Lewis, D. F.; Rosner, P. J.; Kelly, M. A.; Schriemer, D. C.; *Anal. Biochem.* **2003**, *319*, 1; Seong, G. H.; Heo, J.; Crooks, R. M.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3161.
88. Cardoso, C. L.; Lima, V. V.; Zottis, A.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D.; Wainer, I. W.; Moaddel, R.; Cass, Q. B.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1120*, 151.
89. Cardoso, C. L.; Guido, R. V. C.; Moraes, M. C.; Zottis, A.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D.; Wainer, I. W.; Moaddel, R.; Cass, Q. B.; *Analyst* **2008**, *133*, 93.
90. Brinkman, U. A. Th.; *Chromatographia* **1987**, *24*, 190.
91. Dalgaard, L.; *Trends Anal. Chem.* **1986**, *5*, 185.
92. Massolini, G.; Calleri, E.; *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 7.
93. Kim, H. S.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *823*, 158.
94. Thongpanchang, C.; Taweechai, S.; Kamchonwongpaisan, S.; Yuthavong, Y.; Thebtaranonth, Y.; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5006.
95. Bartolini, M.; Cavrini, V.; Andrisano, V.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *1065*, 135.
96. Yamato, S.; Kawakami, N.; Shimada, K.; Ono, M.; Idei, N.; Itoh, Y.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, *406*, 191.
97. Yamato, S.; Kawakami, N.; Shimada, K.; Ono, M.; Idei, N.; Itoh, Y.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *896*, 171.
98. Besanger, T. R.; Hodgson, R. J.; Green, J. R. A.; Brennan, J. D.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *564*, 106.
99. Besnager, T. R.; Hodgson, R. J.; Guillon, D.; Brennan, J. D.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *561*, 107.
100. Emteborg, M.; Irgum, K.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. Th.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *357*, 111.
101. Melnader, C.; Momcilovic, D.; Nilsson, C.; Bengtsson, M.; Schagerlof, H.; Tjerneld, F.; Laurell, T.; Reimann, C. T.; Goston, L.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3284.
102. Yang, Q.; Liu, X.; Miyake, J.; Toyotama, H.; *Supramol. Sci.* **1998**, *5*, 769.
103. Girelli, A. M.; Mattei, E.; Messina, A.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *580*, 271.
104. Luckarift, H. R.; Johnson, G. R.; Spain, J. C.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, *843*, 310.
105. Berne, C.; Betancor, L.; Luckarift, H. R.; Spain, J. C.; *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2631.
106. Massolini, G.; Calleri, E.; De Lorenzi, E.; Pregnotato, M.; Terreni, N.; Félix, G.; Gandini, C.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *921*, 147.
107. Fossati, T.; Colombo, M.; Castiglioni, C.; Abbiati, G.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1994**, *656*, 303.
108. Li, X.; Zhou, Q. Z. K.; Chen, X. D.; *Chem. Eng. Process.* **2007**, *46*, 497.
109. Lin, T. Y.; Wu, C. H.; Brennan, J. D.; *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1861.
110. Markoglou, N.; Wainer, I. W.; *Anal. Biochem.* **2001**, *288*, 83.
111. Chui, W. K.; Wainer, I. W.; *Anal. Biochem.* **1992**, *201*, 237.
112. Kotel'nikova, N. E.; Mikhailova, S. A.; Vlasova, E. N.; *Russian J. Appl. Chem.* **2007**, *80*, 322.
113. Stigter, E. A. C.; de Jong, G. J.; van Bennekom, W. P.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1967.
114. Kim, M.; Kim, J.; Lee, J.; Jia, H.; Na, H. B.; Youn, J. K.; Kwak, J. H.; Dohnalkova, A.; Grate, J. W.; Wang, P.; Huenon, T.; Park, H. G.; *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96*, 210.
115. Cano, A.; Minguilón, C.; Palet, C.; *J. Membr. Sci.* **2006**, *280*, 383.
116. Křenková, J.; Klepárník, K.; František, F.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1195*, 110.
117. Cloix, J-F.; Wainer, I. W.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *913*, 133.
118. Bickerstaff, G. F. *Em Immobilization of enzymes and cells*; Bickerstaff, G. F., ed.; Human Press: New Jersey, 1997, cap.1, p. 1-11.
119. Chaplin, M. F.; Bucke, C.; *Enzyme technology*; Cambridge University Press: Cambridge, 1990.
120. Girelli, A. M.; Mattei, E.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *819*, 3.
121. Avnir, D.; Braun, S.; Lev, O.; Ottolenghi, M.; *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1605; Gill, I.; *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3404.
122. Besanger, T. R.; Chen, Y.; Deisingh, A. K.; Hodgson, R.; Jin, W.; Mayer, S.; Brook, M. A.; Brennan, J. D.; *Anal. Chem.* **2003**, *7*, 2382.
123. Luo, T. M.; Soong, R.; Esther, L.; Dunn, B.; Montemagno, C.; *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 220; Besanger, T. R.; Easwaramoorthy, B.; Brennan, J. D.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6470; Lee, M.; Park, C.; Dordick, J.; Clark, D. S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 938.
124. Gill, I.; *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3404; Besanger, T. R.; Brennan, J. D.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1094.
125. Sheldon, R. A.; *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289.
126. Quiocho, F. A.; Richards, F. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1964**, *52*, 833.
127. Josic, D.; Buchcher, A.; Jungbauer, A.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2001**, *752*, 191.
128. Markoglou, N.; Wainer, I. W.; *Methods em enzymology immobilized enzymes*, Academic Press: New York, vol. XLIV, 1976.
129. Cao, L.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 217.
130. Balcao, V. M.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Malcata, F. X.; Guisan, J. M.; *Biotechnol. Prog.* **2001**, *17*, 537.
131. Chapman, J. D.; Hultin, H. O.; *Biotechnol. Bioeng.* **1975**, *17*, 1783.
132. Goldstein G.; *J. Chromatogr.* **1976**, *129*, 61.
133. Tischer, W.; Kasche, V.; *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 326.