Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Co-imobilização das enzimas acetilcolinesterase e β-secretase1: estudo de condições para triagem de ligantes

Adriana Ferreira Lopes Vilela

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2018

Adriana Ferreira Lopes Vilela

Co-imobilização das enzimas acetilcolinesterase e β-secretase1: estudo de condições para triagem de ligantes

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências, Área de concentração: Química

Orientadora: Profa Dra Carmen Lúcia Cardoso

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Vilela, Adriana Ferreira Lopes

Co-imobilização das enzimas acetilcolinesterase e β-secretase1: estudo de condições para triagem de ligantes. Ribeirão Preto, 2017

130 p. : il. 30 cm

Tese (Doutorado em ciências) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, Área de concentração: Química.

Orientadora: Cardoso, Carmen Lúcia.

1. co-imobilização de enzimas. 2. acetilcolinesterase. 3. β-secretase. 4. triagem de ligantes. 5. doença de Alzheimer.

Janus

Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Aluno: 59138 - 5750476 - 2 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Adriana Ferreira Lopes Vilela no Programa: Química, do(a) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 23 dias do mês de março de 2018, no(a) Sala 02 - Bloco 8 superior realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Adriana Ferreira Lopes Vilela, apresentada para a obtenção do título de Doutora intitulada:

"Co-imobilização das enzimas acetilcolinesterase e β-secretase1: estudo de condições para triagem de ligantes"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Carmen Lúcia Cardoso	Presidente	FFCLRP - USP	APROVADA
Quezia Bezerra Cass	Titular	UFSCar - Externo	Aprovado
Vanderlan da Silva Bolzani	Titular	UNESP - Externo	Aprovado
Marcela Cristina de Moraes	Titular	UFRJ - Externo	Aprovada
Ivone Carvalho	Suplente	FCFRP - USP	Aprovada

Resultado Final: aprovada

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Maria Fabiana Cardoso Tavares Shimizu _____, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Preto, aos 23 dias do mês de março de 2018.

Quezia Bezerra Cass

Vanderlan da Silva Bolzani

Marcela Cristina de Moraes

Ivone Carvalho

Carmen Lúcia Cardoso
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em _____ e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutora em Ciências obtido no Programa Química.

_____
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

A minha mãe

Agradecimentos

Em especial a Professora Dra. Carmen Lúcia Cardoso, pela orientação, dedicação, paciência, e direcionamento neste trabalho. Por ter me dado à oportunidade de estar em seu grupo de pesquisa, e muito mais pela confiança depositada em mim. Sou grata a você por todos estes anos de convivência e ensinamentos, que muito contribuiu para o meu crescimento científico e intelectual. Por mais que eu descreva não conseguirei te agradecer por tudo que você fez por mim, serei eternamente grata.

A Olímpia Paschoal (Olimpiazinha), obrigada pelo seu auxílio, incentivo e amparo em todos os momentos, mas principalmente pela sua amizade.

A Juliana Maria (Jú), pelo companheirismo, apoio, auxílio e incentivo. Obrigada pela sua amizade. Jamais me esquecerei da sua frase de conforto:"Força, foco e fé! Que tudo vai dar certo".

A Claúdia Seid (Clau), pela força, auxílio, companhia e amizade.

Um agradecimento em conjunto, a Clau e Jú, por tudo que desenvolvemos juntas no laboratório, pelo conhecimento compartilhado. Aprendi muito com vocês, cada momento que vivemos ficou marcado na minha vida.

Ao grupo GCBPN, uma bela equipe formada, obrigada pela colaboração no trabalho, compartilhamento de conhecimentos, e momentos de descontração.

A todos que já passaram pelo grupo GCBPN, Luana Magalhães, Luciana Freitas, Felipe Calil, Luiz César, André Marquês, Victor Senno. Vivemos bons momentos no laboratório. Obrigada a todos pela força, companhia e amizade.

Aos funcionários, docentes, corpo técnico e administrativo do Departamento de Química da FFCLRP-USP.

A Profa. Dra. Ivone Carvalho, que juntamente com seu aluno Dr. Peterson, cederam às amostras para a execução da aplicação da metodologia desenvolvida na parte I.

A Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass e Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo pela contribuição dada ao trabalho no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. César Mateo, pesquisador do Instituto de Catalisis y Petroleoquimica da Universidad Autónoma de Madrid, por ter me recebido no seu grupo para a realização do meu estágio no exterior, obrigada pela orientação e ensinamentos, além da confiança depositada em mim durante o meu estágio.

A todos que conheci durante o estágio em Madrid; José Miguel, Robson Alnoch, Javier Iniestra, David Lopez, Rocío Benavente, Isabelle O´Mahony, Pearse O'brien e Mariana Tacin. De colegas de laboratório a uma amizade que foi aflorando dia após dia. Obrigada a todos pelo apoio, incentivo, companheirismo e momentos de descontração. Foi muito bom conviver com vocês!

A toda minha família; meu pai, Antônio Milton Lopes, por ter me dado à vida, pelos ensinamentos, amor paterno e amparo nos momentos difíceis.

A minha irmã Alessandra, obrigada pela amizade e carinho.

A Maria, pelo carinho e compreensão.

A minha tia Beth e tio Maciel, que sempre estão presentes na minha vida me acompanhando a cada conquista. Obrigada pelo amor e carinho.

A irmã Lurdinha, que se tornou uma mãe para mim, sempre ao meu lado em todas as circunstâncias. Obrigada por tudo, mas principalmente pelas orações a Deus, e amor materno.

A Luana Bozzolo, também como uma irmã para mim, pelos nossos momentos de descontração, desabafo, e muito mais pela amizade.

Ao meu esposo Clério, pela paciência, incentivo, compreensão, incansável amparo e amor incondicional ao longo destes anos. Obrigada pela força, pela sua sabedoria, por me fazer enxergar, de uma forma simples, que os desafios que aparecem em nossa vida nos tornam mais sábios. As palavras não expressam a minha gratidão por ter você em minha vida.

A todos os meus amigos.

A agência de fomento FAPESP, processos nº 2016/02873-0 e BEPE n° 2016/15037-5, pelas bolsas de estudo concedidas. Aos processos n° 2013/01710-1 correspondente ao projeto temático vinculado a este trabalho de doutorado, e 2014/50299-5 referente ao equipamento multiusuário utilizado no decorrer do mesmo.

Também as agências de fomento CAPES e CNPq.

Finalizo com gratidão especial a Deus, pela minha existência e saúde, por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho para que este trabalho fosse concretizado. Agradeço a Deus por mais uma vez ter iluminado a minha vida com teu Espírito Santo e ter sido o meu o meu bálsamo consolador em todos os momentos difíceis.

Resumo

VILELA, A. F. L. **Co-imobilização das enzimas acetilcolinesterase e β-secretase1: estudos de condições para triagem de ligantes**. 2017. 130f. Tese de doutorado – Faculdade Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017

As enzimas, acetilcolinesterase (AChE) e β-secretase1 (BACE1), são alvos validados para o tratamento da Doença de Alzheimer (DA) uma vez que atuam no sistema nervoso central contribuindo para o avanço da doença. Neste contexto, o interesse por inibidores destas enzimas e a busca por ensaios enzimáticos seletivos e eficazes tem importância crucial. Neste trabalho é descrito o desenvolvimento de metodologias *on-line*, em capilares de sílica fundida, e *off-line*, em esferas de agarose para triagem de ligantes envolvendo as enzimas AChE e BACE1 via imobilização e co-imobilização por ligação covalente. Nos métodos *on-line*, a imobilização da BACE1 e a co-imobilização das enzimas AChE e BACE1 em capilares de sílica fundida foram realizadas via ligação amino-glutaraldeído e as atividades das enzimas foram monitoradas *on-line* por cromatografia líquida de alta de eficiência e espectrometria de massa (CLAE-EM) através da medida das massas correspondentes aos produtos das clivagens enzimáticas. Nestes, foram possíveis se determinar os parâmetros cinéticos para as enzimas imobilizadas como; variações de pH e temperatura, as constantes cinéticas (K_{Map}) e validação com inibidores padrão. Ressaltando também a aplicação na triagem de uma coleção de oito compostos sintéticos com identificação de dois compostos e a caracterização dos mesmos. Nos métodos *off-line*, a imobilização da AChE e da BACE1 em suportes de agarose foram realizadas partindo de diferentes tipos de ligação com grupos nucleófilos previamente ligados ao suporte. Os diferentes suportes de agarose com a AChE imobilizada foram estudados usando o propionato de *p*-nitrofenil como substrato por meio da medida da absorbância do produto formado *p*-nitrofenol a 348 nm. O sistema com a enzima imobilizada agarose-trietilamina-AChE (agarose-TEA-AChE) ótimo foi utilizado para validação do método para triagem de ligantes com o inibidor padrão sendo determinado os parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inibição, tais como; potência inibitória (IC_{50}), constante de inibição (K_i) e constante de dissociação (K_D). Já para a enzima BACE1, a atividade enzimática foi monitorada por fluorescência a λ_{em}= 495 nm (λ_{ex}= 395 nm) utilizando o substrato IV, sendo possível a seleção do melhor método para imobilização da BACE1. Em ambos os métodos, *on-line* e *off-line*, a imobilização foi eficiente refletindo na atividade de cada enzima após o processo. Os métodos para triagem desenvolvidos neste trabalho são inéditos para ambas as enzimas e reportam grandes avanços comparados aos ensaios já consolidados, uma vez que a co-imobilização contribuiu para a construção de um modelo de triagem inovador, sendo possível a avaliação das interações específicas de um ligante contra dois alvos biológicos em um mesmo sistema (CLAE-EM) automatizado. Ressaltando também que os métodos com a AChE e BACE1 em duas matrizes distintas forneceram modelos de ensaios com formatos diferentes que podem ser aplicados de acordo com as ferramentas analíticas disponíveis, desde as mais simples como espectrofotometria no UV-Vis, fluorescência, aos mais sofisticados e automatizados como CLAE-EM.

Palavras chave: co-imobilização de enzimas. acetilcolinesterase. β-secretase1. triagem de ligantes. Doença de Alzheimer.

Abstract

VILELA, A. F. L. **Co-immobilisation of enzymes acetylcholinesterase and β-secretase1: study of conditions for screening ligands**. 2017. 130f.
Tese de doutorado – Faculdade Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017

The enzymes, acetylcholinesterase (AChE) and β-secretase1 (BACE1), are targets validated for the treatment of Alzheimer's Disease (AD) because they act in the central nervous system contributing to the disease advance. In this context, the interest in inhibitors of these enzymes and the search for selective and effective enzymatic assays is of crucial importance. This work describes the development of on-line methodologies, in fused silica capillaries, and off-line in agarose beads for screening ligands involving the AChE and BACE1 enzymes via immobilization and co-immobilization by covalent attachment. In the on-line methods the immobilization of BACE1 and co-immobilization of AChE and BACE1 enzymes in fused silica capillaries were performed via amino-glutaraldehyde bonding and the enzyme activities were monitored on-line employing high performance liquid chromatography and mass spectrometry (HPLC-MS) by measuring the masses corresponding to the products of the enzymatic cleavages. In these enabled the determination of kinetic parameters for immobilized enzymes such as; pH and temperature variations, kinetic constants (K_{Map}) and validation with standard inhibitors. Also, the application in the screening of a collection of eight synthetic compounds with identification and characterizations of two compounds was carried out. In the off-line methods, the immobilizations of AChE and BACE1 on agarose supports were performed through different types of binding with nucleophilic groups previously attached to the support. The different active-agarose supports with immobilized AChE were studied using p-nitrophenyl propionate as substrate by measuring the absorbance of the product formed p-nitrophenol at 348 nm. The system with the immobilized enzyme optimal agarose-triethylamine-AChE (agarose-TEA-AChE) was used for validation of the method for screening ligands with the standard inhibitor being determined the kinetic and thermodynamic parameters of inhibition, such as; inhibitory power (IC_{50}), inhibition constant (K_i) and dissociation constant (K_D). For BACE1 enzyme, the enzymatic activity was monitored by fluorescence at λ_{em} = 495 nm (λ_{ex} = 395 nm) using the substrate IV, and it was possible to select the best method for immobilization of BACE1. In both methods, both on-line and off-line, the immobilizations procedures were efficient reflecting on the activity of each enzyme after the process. The screening methods developed in this work are unprecedented for both enzymes and represent an improvement to the already consolidated screenings assays, because the co-immobilization contributed to the construction of an innovative screening model, being possible the evaluation of the specific interactions of a ligand against two biological targets in the same automated system. It is worth emphasizing that the AChE and BACE1 methods in two different matrices have provided models of assays in different format that can be applied according to the available analytical tools, from the simplest ones such as UV-Vis spectrophotometry, fluorescence, to the automated systems such as HPLC-MS.

Keywords: co-immobilization of enzyme. acetylcholinesterase. β–secretase1. screening inhibitors. Alzheimer’s disease.

Lista de figuras

Figuras fundamentos teóricos

Figura 1. Ilustração dos métodos de imobilização para enzimas. 3

Figura 2. Classificação dos suportes para imobilização para enzimas. 7

Figura 3. Abordagem química para co-localização de sistemas multienzimáticos co-imobilizados. a) Randômica, b) sequencial, c) afinidade, d) específica, e) ligação cruzada (combi-CLEACs). Reproduzido de Schoffelen; van Hest *et al.* (2013)[36] com permissão *Copyright* © 2013 Elsevier Ltd. 10

Figura 4. A) Ilustração do sítio ativo da AChE na presença de acetilcolina. B) Representação do mecanismo de reação de hidrólise catalisada pela AChE no sítio ativo. Reproduzido de Zhou *et al.* (2010)[58] com permissão *Copyright* © 2010, American Chemical Society.....11

Figura 5. Estrutura tridimensional para a AChE. A) Tetrâmero da AChE*ee* (Fonte: https://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId= 1C2O) e B) Dímero da AChE*hu*. (Fonte: https://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3LII). 12

Figura 6. Estrutura tridimensional para BACE1 (recombinante humana). (Fonte: https://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1FKN&opt=3). 12

Figura 7. Estrutura para o sítio ativo da BACE1. Reproduzida de Shimizu, Tosaki *et al.* (2008)[63] com permissão Copyright © 2008 American Society for Microbiology.....13

Figura 8. Representação do mecanismo de reação de hidrólise catalisada pela BACE1 no sítio ativo. Reproduzido de Mancini *et al.* (2011)[64] com permissão da Copyright © 2011, Springer Nature. 14

Figura 9. Catálise da AChE empregando acetiltiocolina como substrato e posterior derivatização com reagente de Ellman. 18

Figura 10. Catálise da AChE empregando acetilcolina como substrato e seus valores de $[M+H]^+$ para detecção no EM. 18

Figura 11. Substratos peptídicos para a BACE1, a forma nativa e mutada da APP770. 21

Figura 12. Ilustração dos princípios de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) clivado pela BACE1. 22

Figura 13. Ilustração de gráficos de Lineweaver-Burk para classificação dos tipos de mecanismos de inibição. 25

Figuras parte I

Figura I.1. ICER-BACE1 imobilizada sob duas diferentes condições de pH: ___ pH 6,0 e ___ pH 7,4. Cromatograma de íons extraídos referente a injeção de 5 µL JMV2236 50 µmol.L^{-1} no sistema CLAE-EM com o ICER-BACE1 monitorando o produto de hidrólise enzimática

$[M+H]^+$ 464*m/z*. Condições: 0,02 mL.min^{-1}, fase móvel: solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}. 40

Figura I.2. Diluição da BACE1 para imobilização sob diferentes condições de pH. ___ pH 7,0; ___ pH 7,4; e ___ pH 8,0. Cromatogramas de íons extraídos (EIC) referente a injeção de 5 µL JMV2236 50 µmol.L^{-1} no sistema CLAE-EM com o ICER-BACE1 monitorando o produto de hidrólise enzimática $[M+H]^+$ 464*m/z*. Condições: 0,02 mL.min^{-1}, fase móvel: tampão acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}. 41

Figura I.3. Cromatograma de íons extraídos (A) e espectro de massas (B) referente a injeção de 5 µL JMV2236 50 µmol.L^{-1} no sistema CLAE-EM com o ICER-BACE1 monitorando o produto de hidrólise enzimática $[M+H]^+$ 464*m/z*. Condições: 0,02 mL.min^{-1}, fase móvel: solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}. 42

Figura I.4. Atividade do ICER-BACE1 com a variação da concentração da fase móvel. Condições: solução de acetato de amônio, pH 4,5, a 0,02 mL.min^{-1}, injeção de 10 µL de JMV2236 50 µmol.L^{-1}. 43

Figura I.5. Atividade do ICER-BACE1 com a variação do pH da fase móvel. Condições: solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}, a 0,02 mL.min^{-1}, injeção de 10 µL de JMV2236 50 µmol.L^{-1}. 44

Figura I.6. Atividade do ICER-BACE1 com a variação do fluxo da fase móvel. Condições: solução de acetato de amônio 10 mmol.L^{-1}, pH 4,5, injeção de 10 µL de JMV2236 50 µmol.L^{-1}. 45

Figura I.7. Atividade do ICER-BACE1 com a variação do tempo de reação. Condições: solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}, pH 4,5, a 0,02 mL.min^{-1}, injeção de 5 µL de JMV2236 50 µmol.L^{-1}. 45

Figura I.8. Atividade do ICER-BACE1 com a variação do volume de injeção de substrato. Condições: solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}, pH 4,5, a 0,02 mL.min^{-1}. 46

Figura I.9. Atividade do ICER-BACE1 com a variação da temperatura. Condições: solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}, pH 4,5, a 0,02 mL.min^{-1}, injeção de 5 µL de JMV2236 50 µmol.L^{-1}. 47

Figura I.10. Curva de calibração para o produto de hidrólise enzimática $[M+H]^+$ 464,26*m/z*. 48

Figura I.11. Hipérbole de Michaelis para o ICER-BACE1. Condições: vide tabela I.1. 50

Figura I.12. (A) Curva de potência inibitória. **B)** duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o inibidor de β-secretase. 51

Figura I.13. (A) Curva de potência inibitória. **B)** duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o composto **PDJ26**. 53

Figura I.14. (A) Curva de potência inibitória. **B)** duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o composto **PDJ28**. 53

Figura I.15. Tempo de uso para o ICER-BACE1. 54

Figuras parte II

Figura II.1. A) Influência do pH da fase móvel na atividade enzimática do ICER-AChE*hu*. B) Sobreposição dos estudos da influência do pH na atividade do ICER-AChE*hu* e BACE1 Condições de análise Tabela II.1. 61

Figura II.2. Sobreposição dos cromatogramas de íons extraídos referente aos produtos de hidrólise para o ICER-AChE*hu* e BACE1 realizados individualmente após a injeção de 10 µL de ACh e JMV2236 a 50 µmol.L^{-1}. Condições: tabela II.1. 61

Figura II.3. Hipérbole de Michaelis para o ICER-AChE*hu* em A) pH 8,0 (fase móvel) e B) pH 4,5 (fase móvel). Condições tabela II.1. 62

Figura II.4. Espectro de massas referente a injeção de 10 µL JMV2236 70 µmol.L^{-1} no sistema CLAE-EM com o ICER-AChE*hu*+BACE1 monitorando os produtos de hidrólise $[M+H]^+$ 464,23*m/z* e $[M+H]^+$ 542,22*m/z.* Condições, tabela II.1. 63

Figura II.5. Espectro de massas referente a injeção de 10 µL ACh 70 µmol.L^{-1} no sistema CLAE-EM com o ICER-AChE*hu*+BACE1 monitorando o produto de hidrólise $[M+H]^+$ 103,95*m/z.* Condições, tabela II.1. 64

Figura II.6. Sobreposição dos cromatogramas de íons extraídos [M+H]+ 464,2*m/z* da atividade da BACE1 no sistema ICER-AChE*hu*+BACE1 empregando JMV2236 a 100 µmol.L^{-1}.....64

Figura II.7. Sobreposição dos cromatogramas de íons extraídos [M+H]+ 103,95*m/z* da atividade da AChE*hu* no sistema ICER-AChE*hu*+BACE1 empregando ACh a 100 µmol.L^{-1}...65

Figura II.8. Hipérbole de Michaelis para o ICER-AChE*hu* em A) pH 8,0 (fase móvel) e B) pH 4,5 (fase móvel). Condições tabela II.1. 65

Figura II.9. Curva de potência inibitória: A) para a AChE*hu* e B) para a BACE1 no sistema ICER-AChE*hu*+BACE1.. Condições, tabela II.1. 66

Figuras parte III

Figura III.1. Hidrólise enzimática da AChE*ee* com p-NPP em A) variação concentração de enzima e B) variação concentração de substrato. 83

Figura III.2. Representação das reações químicas de heterofuncionalização dos suportes de Agarose. Adaptado de Mateo *et al.* (2010).....84

Figura III.3. Representação das reações químicas da ativação dos suportes de agarose com glutaraldeído. A) agarose-EDA-Glut e B) agarose-IDANi^{2+}-EDA-Glut. 86

Figura III.4. Ilustração das reações envolvidas no procedimento de imobilização sob suporte agarose-glioxil. Adaptada de Mateo *et al.* (2010). 87

Figura III.5. Inativação térmica para a AChE*ee* em solução. 89

Figura III.6. Inativação térmica para os derivados imobilizados e AChE em solução. A) a 45 °C e B) a 50°C. 90

Figura III.7. Curva dose-resposta de inibição. A) log da concentração de tacrina contra AChE*ee* em solução e B) log da concentração de tacrina contra AChE*ee*-agarose-TEA-CHO..91

Figura III.8. Duplo recíproco Lineweaver–Burk. A) tacrina contra AChE*ee* solúvel e (B) tacrina contra AChE*ee*-agarose-TEA-CHO. 92

Figura III.9. A) espectro de absorção no UV para tacrina a 5 μmol.L^{-1}, e B) curva de calibração a 240 nm para tacrina. 93

Figura III.10. Curva de saturação para o equilíbrio entre tacrina e AChE*ee*-agarose-TEA-CHO. 94

Figura III.11. Reciclos para a adsorção-dessorçao da tacrina no derivado AChE*ee*-agarose-TEA-CHO..... 95

Figura III.12. Espectro de fluorescência obtido pela hidrólise enzimática com a BACE1 em solução e substrato IV a 20 μmol.L^{-1}. Condições: solução de acetato de sódio, 20 mmol.L^{-1}, pH 4.5, λ_{em} = 495 nm (λ_{exc} at 355 nm). 96

Figura III.13. Hipérbole de Michaelis para a BACE1 co-imobilizada empregando o substrato IV a λ_{em} = 495 nm (λ_{exc} at 355 nm). 98

Figura III.14. Curva dose-resposta de inibição da atividade da BACE1 co-imobilizada utilizando o substrato IV (200 μmol.L^{-1}) na presença de diferentes concentrações de inibidor de β-secretase a λ_{em} = 495 nm (λ_{exc} at 355 nm). 99

Lista de tabelas

Tabelas parte I

Tabela I.1. Melhores condições para o ensaio com o ICER-BACE1. 47

Tabela I.2. Precisão intra - dia (n = 5) e exatidão do método de análise para o produto formado através da injeção de substrato no ICER-BACE1. 49

Tabela I.3. Porcentagem de atividade inibitória dos compostos a 50 μmol.L^{-1}, valores de IC_{50}, constante de inibição (K_i) e mecanismo de ação para os compostos **PDJ26** e **PDJ28** contra o ICER-BACE1. 52

Tabelas parte II

Tabela II.1. Condições para determinação da atividade para o ICER- AChE*hu*+BACE1. 57

Tabela II.2. Comparação dos valores de K_{Map} obtidos para os métodos co-imobilizado e imobilizado individualmente. 66

Tabelas parte III

Tabela III.1. Quantificação do procedimento de imobilização da AChE*ee* realizado para cada suporte preparado. 88

Tabela III.2. t½ vida para a AChE*ee* imobilizada e em solução. 90

Tabela III.3. Quantificação da imobilização da BACE1 em cada suporte preparado. 96

Tabela III.4. $t_{1/2}$ vida para a BACE1 imobilizada e solução. 97

Lista de esquemas

Esquema I.1. Ilustração do sistema CLAE-EM utilizado para o monitoramento do ICER-BACE1. 37

Esquema I.2. Reações químicas envolvidas no processo de imobilização da BACE1 adotado. 39

Esquema II. 1. Ilustração da configuração instrumental CLAE-EM utilizado para o monitoramento do ICER-AChE*hu*+BACE1. 63

Esquema III.1. Esquema ilustrativo do procedimento realizado para o monitoramento da atividade da AChE*ee* empregando p-NPP como substrato. 82

Lista de equações

$V_0 = \frac{V_{Máx} \cdot [S]}{K_M + [S]}$ Equação (1). 23

$\% I = 100 - [\left(\frac{P_i}{P_0}\right) x\ 100]$ Equação (I.1). 33

$\frac{v}{V_{Max}} = \frac{[S]}{Ks\left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right) + [S]\left(1 + \frac{[I]}{\alpha Ki}\right)}$ Equação (I.2). 35

$EI\ (\%) = 100 - 100 \times \left(\frac{atividade\ sobrenadante\ da\ suspensão}{atividade\ inicial}\right)$ Equação (III.1). 73

$RA\ (\%) = \frac{100 \times atividade\ imobilizado}{EI/_{100} \times atividade\ inicial}$ Equação (III.2). 74

$C\ (mol.L^{-1}) = \frac{A\ x\ V_t\ x\ 1000}{\varepsilon\ x\ V_E}$ Equação (III.3). 74

$\% I = 100 - [\left(\frac{A_i}{A_0}\right) x\ 100]$ Equação (III.4). 76

$E + I \underset{K_D}{\overset{K_A}{\rightleftharpoons}} EI$; $K_D = \frac{[E]\ [I]}{[EI]}$; $Y = \frac{[EI]}{[E]_{total}}$ Equação (III.5).....78

Lista de abreviaturas, símbolos e fórmulas

λ Comprimento de onda

λ_{em} Comprimento de onda emissão

λ_{ex} Comprimento de onda excitação

Aβ Peptídeo amiloide

AChE Enzima acetilcolinesterase

AChE*ee* Enzima acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus*

AChE*hu* Enzima acetilcholinesterase *Human recombinant*

ACh Acetilcolina

ACN Acetonitrila

ACThI Iodeto de Acetiltiocolina

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APTES Aminopropiltrietoxisilano

BACE1 Enzima β-secretase1

BSA Albumina Sérica Bovina

C_{12} 1-dodecanotiol

CHO Adeído

CLAE Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-EM Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massa

CV Coeficiente de Variação

CO_2H Grupo carboxila

DA Doença de Alzheimer

Da Dalton

d.i. Diâmetro Interno

DMSO Dimetilsulfóxido

DQ Departamento de Química

E Enzima livre

EC *Enzyme Commission*

EDA Etilenodiamino

[E] Concentração de enzima

EI Complexo enzima-inibidor

EI Eficiência de imobilização

ES Complexo enzima-substrato

ESI Ionização por eletronspray (*Electronspray ionization)*

EtOH Etanol

FFCLRP Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto

FRET Transferência de energia de ressonância por fluorescência

Glut glutaraldeído

HCl Ácido Clorídrico

HTS Ensaios Biológicos automatizados em larga escala (*High Throughput Screening*)

IDA Ácido iminodiacético

IT Analisador por aprisionamento de íons (*Ion trap*)

[I] Concentração de inibidor

IC_{50} Potência Inibitória

ICER Reator capilar com enzima imobilizada (*Immobilized Capillary Enzyme Reactor)*

IMER Reator com enzima imobilizada (*Immobilized Enzyme Reactor)*

JMV2236 Substrato orto-aminobenzoil (Abz)-(Asn670,Abz-(Asn^{670}, Leu^{671})-proteína precursora β amiloide A4

(669-674)- etilenodiamino 2,4- dinitrofenol (EDDnp) trifluoroacetato

K_D	Constante de dissociação
KH_2PO_4	Hidrogenofosfato de Potássio
K_i	Constante de inibição
K_M	Constante de Michaelis
K_{Map}	Constante de Michaelis aparente
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
LD	Limite de Detecção
LIQ	Limite inferior de Quantificação
MS	Espectrômetro de massa (*Mass spectrometer*)
MeOH	Metanol
µL	Microlitro
$\mu mol.L^{-1}$	Micromolar
$NaHCO_2$	Bicarbonato de sódio
$NaHB_4$	Borohidreto de sódio
$NaIO_4$	Periodato de sódio
nm	Nanômetro
Ni^{2+}	Níquel $^{2+}$
$NiCl_2.6H_2O$	Cloreto de níquel hexahidratado
[P]	Concentração de produto
p-NPP	substrato propionato de p-nitrofenil
P	Produto da reação enzimática
pH	Potencial Hidrogeniônico
RA	Recuperação da atividade
SIM	*Single Ion monitoring*
[S]	Concentração de substrato
Substrato IV	[(NH_2-Arg-Glu (Ácido N-(aminoetil)-5-naftilamina-1-sulfônico)-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Lys (Ácido 4-(4-dimetilamino)fenil) benzóico)-Arg-COOH)
TEA	trietilamina
t½ vida	Tempo de meia vida
USP	Universidade de São Paulo
UV-Vis	Ultravioleta visível
V_E	Volume de enzima
V_0	Velocidade de reação enzimática inicial
$V_{Máx}$	Velocidade de reação enzimática máxima
V_t	volume total

Sumário

Resumo VIII
Abstract IX
Lista de figuras X
Lista de tabelas XIV
Lista de esquemas XV
Lista de equações XV
Lista de abreviaturas, símbolos e fórmulas XVI
1. Fundamentos teóricos 1
1.1 Métodos para imobilização de enzimas 2
1.1.1 Desenvolvimento de uma metodologia com enzima imobilizada 5
1.1.2 Co-imobilização de enzimas 8
1.1.3 Cromatografia de bioafinidade aplicada na triagem de ligantes 10
1.2 As enzimas 12
1.2.1 A enzima acetilcolinesterase 12
1.2.2 A enzima β-secretase1 (BACE1) 14
1.3 A doença de Alzheimer (DA) 16
1.4 Métodos com AChE e BACE1 imobilizadas para triagem de ligantes 18
1.4.1 Métodos com AChE imobilizada 18
1.4.2 Métodos com BACE imobilizada 21
1.5 Caracterização de inibidor 23
2. Objetivos 26
2.1 Objetivos específicos 26
Parte I – Imobilização da enzima BACE1 em capilar de sílica fundida - Método *on-line* para a triagem de ligantes 27
I.1 Introdução 27
I.2 Procedimento experimental parte I 28
I.2.1 Materiais 28
I.2.2 Instrumentação 28
I.2.3 Preparo do ICER-BACE1 29
I.2.4 Condições do sistema CLAE-EM 30
I.2.5 Fase móvel e substrato 30
I.2.6 Otimização das condições de acoplamento CLAE-EM 31
I.2.7 Determinação da atividade e estabilidade do ICER-BACE1 32
I.2.8 Validação do método 32
I.2.9 Parâmetro cinético aparente (K_{Map}) para ICER-BACE1 33
I.2.10 Estudos de inibição 33
I.2.11 Aplicação do ICER-BACE1 34
I.3 Resultados e discussão parte I 36
I.3.1 Imobilização da BACE1 37
I.3.2 Determinação da atividade do ICER-BACE1 41
I.3.3 Estudo das condições de acoplamento ICER-BACE1-EM 42
I.3.4 Validação do ICER-BACE1 48
I.3.5 Parametro cinético K_{Map} 49
I.3.6 Estudos de inibição 50
I.3.7 Aplicação do ICER-BACE1 51
I.3.8 Reutilização 53
I.4 Conclusão parte I 54
Parte II - Coimobilização das enzimas AChE recombinante humana (AChE*hu*) e BACE1 – método *on-line* para triagem de ligantes 55

II.1 Introdução 55
II.2 Procedimento experimental parte II 55
II.2.1 Materiais 55
II.2.2 Co-imobilização AChE*hu* e BACE1 em capilar de sílica fundida (ICER-AChE*hu*+BACE1) 55
II.2.3 Determinação das atividades enzimáticas no ICER-AChE*hu*+BACE1 56
II.2.4 Determinação da K_{Map} para as enzimas no ICER-AChE*hu*+BACE1 57
II.2.5 Estudos de inibição para as enzimas no ICER-AChE*hu*+BACE1 58
II.3 Resultados e discussão parte II 60
II.3.1 Co-imobilização 62
II.3.2 Parâmetro cinético K_{Map} 65
II.3.3 Potência inibitória (IC_{50}) 67
II.4 Conclusão parte II 67
Parte III. Imobilização e co-imobilização das enzimas AChE peixe elétrico (AChE*ee*) e BACE1 em derivados de agarose – Métodos *off-line* para triagem de ligantes 69
III.1 Introdução 69
III.2 Procedimento experimental parte III 69
III.2.1 Materiais 69
III.2.2 Instrumentação 70
III.2.3 Preparo soluções de trabalho 71
III.2.4 Suportes para imobilização das enzimas 71
III.2.5 Estudos para AChE*ee* 73
III.2.5.1 Imobilização 73
III.2.5.2 Determinação da atividade 75
III.2.5.3 Estabilidade térmica 76
III.2.5.4 Estudos de inibição 76
III.2.5.5 Determinação da constante de dissociação (K_D) e fração de saturação (Y) 78
III.2.5.6 Reutilização 79
III.2.6 Estudos para a enzima BACE1 80
III.2.6.1 Imobilização 80
III.2.6.2 Determinação da atividade 80
III.2.6.3 Estabilidade térmica 81
III.2.7 Co-imobilização AChE*ee* e BACE1 em agarose-EDA-glut (AChE*ee*+BACE1-agarose-EDA-glut) 81
III.2.7.1 Co-imobilização 81
III.2.7.2 Estudos com AChE*ee*+BACE1-agarose-EDA-Glut 81
III.3 Resultados e discussão 83
III.3.1 AChEee 83
III.3.2 BACE1 96
III.3.3 Co-imobilização AChE*ee*+BACE1 98
III.4 Conclusão parte III 100
3.Conclusão final 102
Referências bibliográficas 104

1. Fundamentos teóricos

As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram vários processos celulares através da diminuição da energia de ativação. Elas apresentam propriedades únicas como especificidade e seletividade, operam sob condições amenas de temperatura, pressão e pH, não são tóxicas, e podem ser reguladas através de ativadores e/ou inibidores. Todas estas características lhes conferem seu elevado potencial de aplicação [1, 2].

A grande demanda do mercado industrial aliada aos crescentes avanços no entendimento da etiologia das doenças faz com que suas funções sejam desejadas de modo contínuo e estável. No entanto, suas limitações operacionais relacionadas a baixa estabilidade e vida útil em armazenamento a longo prazo impedem seu uso e/ou tornam seu custo elevado. Assim sendo, na tentativa de superar estas limitações, técnicas de imobilização de enzimas surgem como alternativa para estudos *in vitro.* [3-6]

Uma aplicação promissora é o uso de metodologias com enzimas imobilizadas na pesquisa racional de novos fármacos [7], uma vez que a cura ou tratamento de diversas doenças são muitas vezes realizados por inibição seletiva de enzimas que estão envolvidas em processos celulares nos organismos infecciosos. [1, 8-10].

Esta é uma área de aplicação que vêm recebendo destaque, desde o início da década de 90, com o desenvolvimento dos primeiros IMER (*Immobilized Enzyme Reactors*), até os dias atuais, com a grande disponibilidade de recursos tecnológicos e conhecimento do genoma humano que auxiliam no entendimento e mapeamento do sítio ativo das enzimas contribuindo na síntese de moléculas que atuem contra um alvo patogênico [1, 7].

O paradigma para a descoberta de um fármaco é multidisciplinar e constituído por várias etapas ou estágios. Este preconiza que as informações funcionais das moléculas que são identificadas como possíveis candidatas devem ser reunidas e validadas para produzir a eficácia desejada em alvos clinicamente relevantes. Portanto é fundamental o uso de bioensaios robustos para a identificação e caracterização de novos "*hits*".

Deste ponto de vista e aliada a grande disponibilidade de instrumentos analíticos com elevada sensibilidade, é necessário o desenvolvimento de métodos/modelos de bioensaios que possam identificar ligantes de uma maneira efetiva e precisa, corroborando com a resposta em ensaios *in vivo*.

Considerando a importância desta temática, este trabalho consistiu do desenvolvimento de metodologias com as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e β-secretase1 (BACE1) imobilizadas e sua aplicabilidade na triagem de ligantes. Estas enzimas selecionadas são consideradas cruciais na patologia da doença de Alzheimer (DA), uma doença ainda sem cura, e, portanto, esforços para a descoberta de novos tratamentos devem ser realizados a fim de alterar o curso da doença e beneficiar os portadores desta demência. Portanto, a contribuição dos grupos de pesquisa nas diferentes etapas que envolvem o desenvolvimento de um novo fármaco é muito importante.

A seguir, são descritos os conceitos teóricos principais envolvidos neste trabalho.

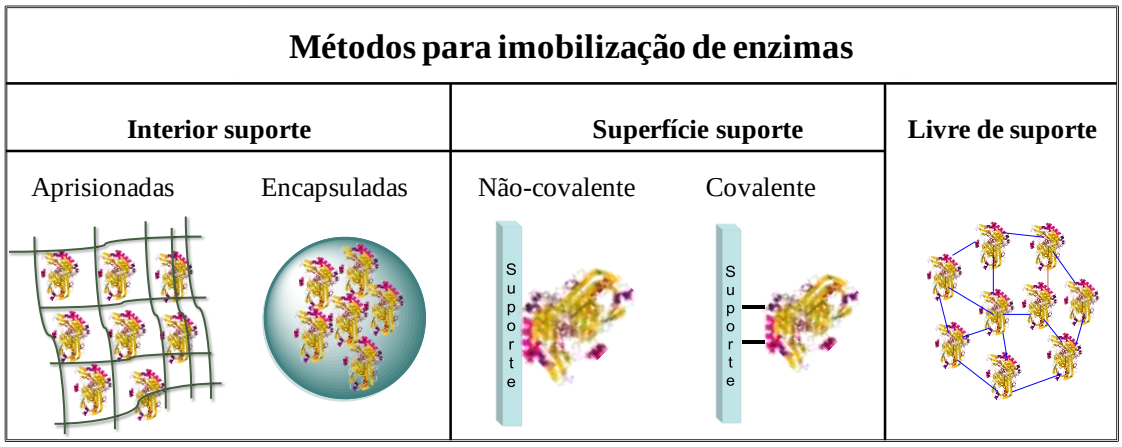
1.1 Métodos para imobilização de enzimas

A imobilização de uma enzima é o processo pelo qual um catalisador homogêneo pode ser convertido em um catalisador heterogêneo, ou seja, processo pelo qual a enzima está em uma fase distinta da fase onde o seu substrato está presente [11].

Os benefícios da utilização da catálise heterogênea com enzimas são diversos dentre eles; a reutilização, resultados reprodutíveis, aumento da estabilidade da enzima frente a ambientes não convencionais como agentes desnaturantes (solventes orgânicos e variações bruscas de temperatura), e facilidade de separação do meio reacional [3, 4].

Os métodos para retenção das enzimas em um suporte são constituídos basicamente de duas formas [8, 12], elas podem ser imobilizadas no interior de um suporte através de encapsulação ou aprisionamento, e, imobilizadas na superfície interna de um suporte por ligações covalentes e/ou não covalentes. Também, podem ser imobilizadas entre si, através de ligações cruzadas, sem a presença de um suporte, formando uma enzima insolúvel [5, 13]. A figura 1 ilustra genericamente tais métodos.

Figura 1. Ilustração dos métodos de imobilização para enzimas.



A ligação das enzimas na superfície do suporte por ligações não-covalentes e covalentes, se baseia nas interações físicas e químicas entre eles.

Os métodos não covalentes podem ser subdivididos em adsorção física, iônica, e quelação com metal [14]. Estes envolvem interações reversíveis, são governados por interações fracas como, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, e/ou ligações de hidrogênio.

Na adsorção física, a enzima é retida na superfície do suporte através das forças de Van der Waals. Na adsorção iônica, a interação da enzima com o suporte ocorre através das cargas opostas presentes em ambos e são regidas por interações eletrostáticas. A adsorção por quelação com metal consiste primeiramente na ativação do suporte com um agente quelante, seguido da presença de um metal de transição, por exemplo, $FeCl_2$ e $TiCl_3$, e finalmente a enzima, formando um quelato entre a enzima e o suporte. Nestes, a atividade da enzima imobilizada é alta porque provoca pouca/ou nenhuma distorção da estrutura da enzima, é um processo simples e econômico e o suporte pode ser regenerado. Mas, muitas vezes ocorre a dessorção da biomolécula devido à natureza fraca da ligação [14].

Já no método por ligação covalente, as interações entre enzima e o suporte são fortes, e a ligação envolve reação química entre resíduos de aminoácidos ativos presentes na enzima com os grupos funcionais ativos presentes no suporte. Normalmente o suporte é pré-ativado antes da imobilização.

As ligações covalentes podem ser classificadas em: reações de diazotização (-N=N-), formação de ligação amida (-CO=NH-), alquilação (-CH_2-NH-), arilação (-CH_2-

S-), formação de base de Schiff (-CH=N-), amidinação (-CNH-NH-), e troca de tiol (-S-S-) [15].

As reações envolvidas neste caso são irreversíveis, muitas vezes este processo estabiliza a enzima imobilizada devido à força da ligação, ou seja, ela não se solta facilmente do suporte na presença do substrato e/ou a altas concentrações iônicas, evitando assim, a perda da enzima [5]. Todavia, um efeito negativo do acoplamento covalente na atividade de uma enzima imobilizada envolve a restrição do acesso ao sítio ativo pelo substrato, em função de alterações e/ou distorção desse sítio após a reação. No entanto, estas limitações podem ser evitadas através da imobilização da enzima na presença do seu substrato ou inibidor, e estes serem posteriormente removidos [16].

No interior do suporte, a imobilização pode ser realizada por aprisionamento ou encapsulação. A diferença entre os dois métodos está no tipo de matriz formada na presença da enzima pelo agente de formação da mesma.

Por aprisionamento ocorre à formação de uma matriz na presença da enzima por meio de agentes de reticulação ou geleificação (poliacrilamida, sol-gel) via processos químicos ou físicos [13, 17]. Aqui a enzima tem sua mobilidade dominada pela matriz.

Já por encapsulação, uma barreira física esférica tipo membrana em torno da preparação enzimática é formada através de agentes encapsulantes (alginato, polissacarídeos, e quitosana) também por processos químicos ou físicos. As membranas devem ser permeáveis ou semipermeáveis permitindo a passagem dos substratos e produtos. Neste caso, a enzima fica livre, porém dentro de um espaço restrito [18].

As vantagens destes métodos são; inclusão de outras enzimas, proteção contra agentes externos microbianos, estabilidade mecânica e térmica, tolerância a solventes orgânicos. No entanto, pode ocorrer inativação da enzima por reação radicalar com os monômeros, e/ou desnaturação pelo calor durante a formação da membrana ou matriz, e/ou polimerização [13].

A imobilização por ligação cruzada das moléculas de enzimas, livre de suporte, é obtida pelo uso de agentes de intercruzamento, como o glutaraldeído ou dextran-polialdeído, formando ligações covalentes entre seus grupos amino e a extremidade funcional dos agentes [19-21]. Dois tipos de agregados podem ser desenvolvidos, os CLECs do inglês (*Crosslinked enzyme cristals*), ou os CLEAs (*Crosslinked enzyme agregates*). Nos CLECs é necessário a prévia purificação e cristalização da enzima e posteriormente a formação da ligação cruzada via agente intercruzante. Já em CLEAs

primeiramente a enzima é sujeita a precipitação na presença de agentes desnaturantes e depois a formação do agregado.

Nestes casos, as enzimas podem também ser co-agregadas com outras proteínas como a albumina e gelatina ou enzimas. Os agregados imobilizados apresentam alta atividade volumétrica por massa, maior pureza e menor interferência e/ ou transferência de massa quando comparadas às enzimas imobilizadas em suporte. Seu uso é vantajoso em processos que necessitam de altos rendimentos e produtividade [19]. Porém, a perda da atividade enzimática pode ocorrer devido à alteração conformacional provocada pelo processo de imobilização.

1.1.1 Desenvolvimento de uma metodologia com enzima imobilizada

Para o desenvolvimento de uma metodologia com enzima imobilizada, além do método de ligação, alguns fatores devem ser considerados, como a enzima e o suporte, com isto, o processo global pode ser otimizado possibilitando a obtenção de um sistema com estabilidade operacional e de armazenamento. Assim, esses dois componentes e consequentemente o método de ligação, fornecerão um sistema com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicos. [15, 16, 22]

Para a enzima destaca-se a importância das suas propriedades bioquímicas e cinéticas. O conhecimento das propriedades bioquímicas permite informações sobre estrutura da enzima como; sua massa molecular, unidade (s) monomérica (s), e, sequência de aminoácidos (aa) (tanto na estrutura quanto no sítio ativo). Com estas informações, o método adequado para a ligação ou adsorção da enzima no suporte poderá ser direcionado.

Em relação aos parâmetros cinéticos como; atividade específica (nº de unidade por mg proteína), perfil de pH e temperatura, fornecerão dados sobre a pureza da enzima e parâmetros ótimos para o exercício da catálise com eficiência [8, 15]. Portanto, todas estas propriedades implicam na conformação da enzima, na velocidade de transferência de massa e na reação enzimática do sistema com a enzima imobilizada [16].

Com relação ao suporte, este é o contribuinte que mais afeta o desempenho da enzima após a imobilização. Este é a matriz onde ocorre a ligação, e por esta razão, a estrutura química do suporte deve possuir grupos reativos capazes de favorecer a ligação da enzima e também ser livre de impedimento estérico. Assim, a acessibilidade

do substrato ao sítio ativo da enzima contribuindo também na manutenção da estrutura terciária da enzima [22].

Previamente à seleção deste, é importante serem analisadas criteriosamente suas propriedades físicas e químicas, e para além a possibilidade de regeneração. Mais especificamente, a natureza hidrofílica/hidrofóbica, estabilidade química, mecânica e térmica, resistência, composição, tamanho da partícula, diâmetro, área superficial e volume acessível [16].

Generalizando, um suporte adequado para imobilização requer o preenchimento de algumas características como: 1) Apresentar área superficial suficiente permitindo a imobilização da enzima em quantidades significativas. Por exemplo, suportes porosos (grande área superficial) e não-porosos (baixa área superficial);

2) A natureza hidrofílica/hidrofóbica, que prediz a sua afinidade pela água. Suportes hidrofílicos permitem boa difusão do substrato melhorando a atividade e estabilidade das enzimas, ao contrário dos hidrofóbicos;

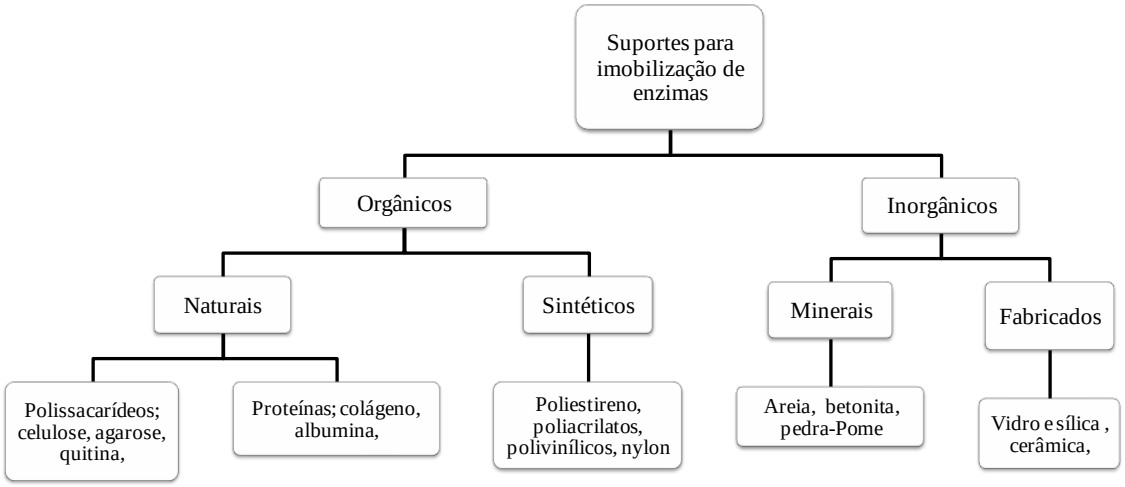
3) A composição química, ou seja, a presença de grupos funcionais que possam permitir a ligação da enzima (covalente/não-covalente), e/ou que possam ser facilmente ativados e/ ou modificados previamente à imobilização;

4) Apresentar resistência mecânica e ao escoamento durante e após a imobilização. Permitir o uso de filtração, agitação, centrifugação quando necessário, bem como, variações na temperatura. Além da resistência a altas vazões quando se utiliza sistemas a altas pressões;

5) Os grupos reativos envolvidos na imobilização devem ser estáveis para permitir a reutilização do suporte enzimático, impedindo interações inespecíficas (secundárias).

A figura 2 esboça a classificação dos suportes e alguns exemplos dos mais utilizados.

Figura 2. Classificação dos suportes para imobilização para enzimas.



Os orgânicos naturais são amplamente utilizados uma vez que apresentam compatibilidade com as enzimas/proteínas. Os inorgânicos são mais utilizados em indústrias devido à alta resistência mecânica e estabilidade térmica [12].

Cabe destacar também, que os suportes podem ser modificados através do uso de agentes modificadores previamente à imobilização. Assim, se obtêm uma variedade de suportes visando à melhoria da interação da enzima aumentando o fator de estabilização do sistema final [14, 23, 24].

Entre os agentes modificadores destaca-se o glutaraldeído, um agente extremamente reativo e amplamente empregado, tanto como um agente de ligação cruzada quanto como um espaçador [24-26]. Também podem ser utilizadas as aminas, etilenodiamina (EDA), trietilamina (TEA), devido à sua capacidade de formar ligações de hidrogênio. E, polímeros como polietilenoimina (PEI) [27]. Os modificadores de suportes de sílica também merecem destaque, o aminopropiltrietoxisilano (APTES), mercaptopropiltrietoxisilano, etc. E, os ácidos carboxílicos de cadeia longa, por exemplo, o ácido eurúcico e os tióis como; octanotiol, ambos utilizados para aumentar a cadeia hidrofóbica do suporte [28].

Diante todas estas possibilidades e descrição dos métodos de ligação, as vantagens e desvantagens devem ser consideradas em cada caso em específico, e, a seleção adequada depende também da aplicação e formato do sistema com a enzima imobilizada [22].

A combinação de métodos é frequentemente utilizada para melhorar a atividade e estabilidade da enzima [23, 29, 30]. Caso haja mais de um alvo de interesse, a co-imobilização pode ser aplicada.

1.1.2 Co-imobilização de enzimas

A co-imobilização é a retenção de duas ou mais enzimas em um mesmo suporte ou ligadas entre si, formando sistemas multi-enzimáticos. A criação destes sistemas possibilita a mimetização de um ambiente celular, no qual as enzimas atuam em um ciclo de reações (dentro de um compartimento) para a manutenção da vida na célula [31, 32]. Deste modo, esta abordagem pode ser considerada como modelo *in vitro* para processos celulares.

A co-imobilização normalmente é realizada para enzimas que atuam com cooperatividade, fornecendo sistemas que melhoram ou aumentam a eficiência de uma das enzimas pela geração do seu substrato, com isto, os processos que tradicionalmente eram realizados em várias etapas são reduzidos a uma única etapa [33]. Também pode ser usada para eliminação de subprodutos indesejados de uma reação enzimática [34]. Ou para combinação de vários biocatalisadores para a síntese de produtos, reciclagem de cofatores [31], ou biossensores para detecção/diagnóstico de doenças [35], etc.

Portanto, o desenvolvimento destes sistemas multi-enzimáticos co-imobilizados é altamente interessante do ponto de vista ambiental e econômico.

A construção do sistema envolve a imobilização separada ou em conjunto das enzimas na matriz selecionada, e também abrange diferentes métodos de imobilização. Assim sendo, a co-imobilização pode ser realizada de maneira randômica ou sequencial, por afinidade, específica e livre de suporte. Randômica (figura 3a), consiste na imobilização aleatória das enzimas sobre o suporte. Os métodos empregados são; por aprisionamento em matriz sólida como o sol-gel, ou também através de interações covalentes, iônicas, e/ou hidrofóbicas. O mais comum é o uso do método covalente utilizando o suporte previamente ativado com glutaraldeído ou epóxido e ligação via grupo(s) amino das enzimas [36].

A co-imobilização sequencial (figura 3b), envolve a retenção das enzimas no suporte baseado nos mesmos princípios da randômica, porém com controle da sequência em que as enzimas são ligadas. Este modo é frequentemente utilizado envolvendo enzimas cooperativas simulando um sistema de reações em cascata. A co-imobilização é realizada com a ligação da primeira enzima de interesse, e a partir daí a segunda, e na

sequência as demais. Para isto, a enzima e o suporte são pré-funcionalizados, a enzima pelos seus grupos amino [37] e o suporte por epóxidos, glutaraldeído, e /ou polímeros [37, 38].

Por afinidade (figura 3c), o processo acontece através da prévia ligação ao suporte de um ligante de afinidade, assim as enzimas são ligadas ao suporte de acordo com a afinidade pelo ligante adicionado, criando assim domínios químicos diferentes para cada enzima. Este modelo de co-imobilização é usado para desenvolvimento de sistemas de DNA-proteínas para aplicações analíticas (análise de ácidos nucleicos, e proteínas) e sistemas nanoestruturados para aplicações biomédicas [39]. Nestes sistemas, o DNA é funcionalizado através de grupos tiol e a proteína/enzima através dos grupos amino e/ ou sulfidrila.

A co-imobilização pode ser também específica (figura 3d). Nesse caso, a imobilização acontece através de um sítio de ligação na enzima a um sítio do suporte. Por exemplo, o resíduo de cisteína da enzima ligado ao grupo maleimida previamente adicionado no suporte. Ou, os aminoácidos das enzimas sofrem modificação provendo grupos de aminoácidos não naturais para a ligação específica no suporte.

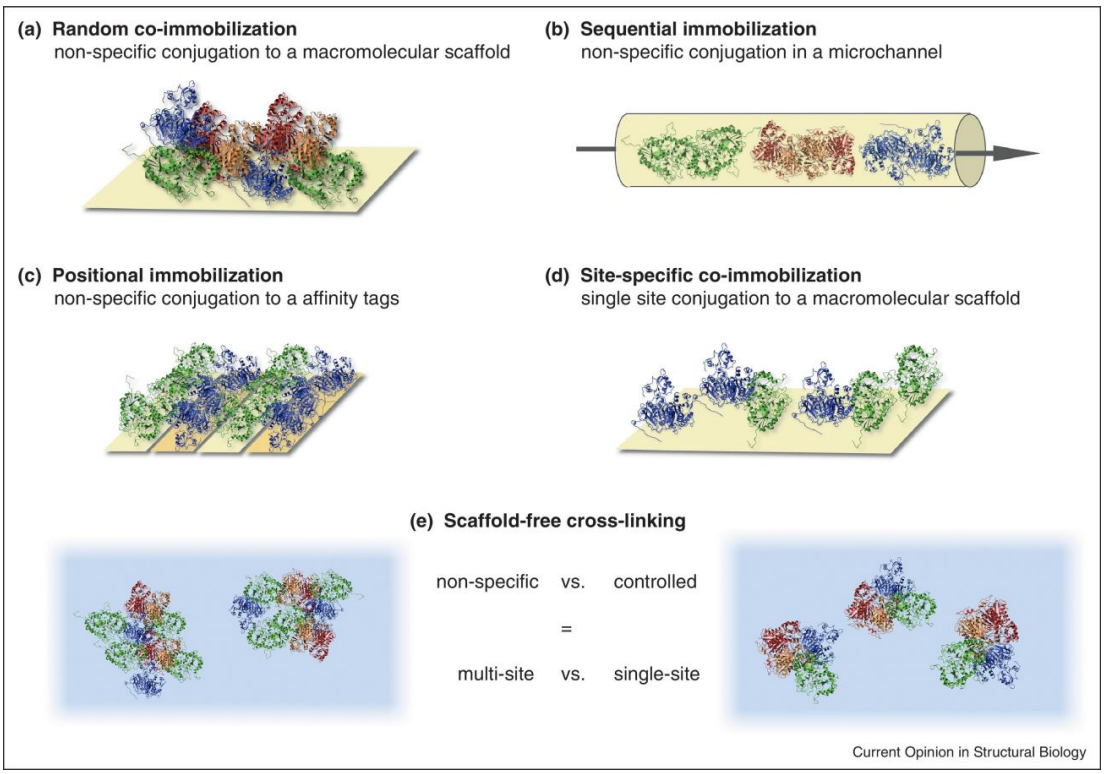
O princípio desta técnica visa uma imobilização uniforme por um único ponto da enzima. Método muito utilizado para enzimas que contém resíduos de lisina no sítio ativo.

E, finalmente, têm-se a co-imobilização de enzimas livre de suporte (figura 3e), como descrito anteriormente, através de agentes de intercruzamento com formação de “combi-CLEACs” [40].

Portanto, o método e a forma de conduzir a co-imobilização direciona a localização da enzima no suporte possibilitando variações no *design* do sistema dependendo da aplicação desejada.

A preparação destes sistemas com múltiplas enzimas é desafiadora, uma vez que requer a otimização específica de cada componente do sistema; enzimas, suporte, e método de ligação, de modo a preservar a atividade catalítica de todas as enzimas envolvidas, e fornecer uma estabilização operacional global.

Figura 3. Abordagem química para co-localização de sistemas multienzimáticos co-imobilizados. a) Randômica, b) sequencial, c) afinidade, d) específica, e) ligação cruzada (combi-CLEACs).



Fonte: Reproduzido de [36] com permissão *Copyright* © 2013 Elsevier Ltd.

Após a imobilização e co-imobilização as propriedades das enzimas (seletividade e especificidade) apresentarão modificações. Embora, em muitos casos, um efeito negativo das propriedades da enzima seja observado, provenientes da distorção da estrutura da enzima devido à interação com o suporte, em outros casos, pode ocorrer um efeito positivo devido à imobilização. Estes efeitos deverão ser avaliados pós-imobilização da enzima através da determinação dos parâmetros cinéticos.

Neste trabalho ambas as técnicas, imobilização e co-imobilização foram empregadas visando o desenvolvimento de biorreatores com as enzimas selecionadas para serem aplicados na identificação e caracterização de ligantes. Para isto, foi utilizado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tendo como fase estácionária os biorreatores com as enzimas imobilizadas e co-imobilizadas.

1.1.3 Cromatografia de bioafinidade aplicada na triagem de ligantes

A cromatografia de bioafinidade (CB) é um termo empregado quando se tem um agente biológico (proteínas, enzimas, anticorpos) imobilizado em uma matriz e este

utilizado como fase estacionária em análises cromatográficas. A separação neste caso é baseada pela interação específica entre o agente de ligação e a biomolécula imobilizada apresentando alta seletividade, especificidade, reprodutibilidade, e ensaios não destrutíveis [41-43]. Neste contexto, a cromatografia de bioafinidade é uma poderosa ferramenta para monitorar as interações ligante-proteína, substrato-proteína, inibidor-proteína, e é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos métodos para triagem de ligantes.

A construção de um sistema em CB envolve primeiramente a imobilização da biomolécula em um suporte que será posteriormente utilizado como fase estacionária no sistema CLAE. A imobilização por ligação covalente é a mais indicada em CB devido o sistema ser em fluxo evitando-se assim o fenômeno da dessorção.

Com relação aos suportes utilizados, o capilar tubular aberto de sílica fundida é um formato promissor a ser empregado uma vez que possui baixa pressão de volta e minimiza interações não específicas [8, 44-46] .Também se utiliza suportes de materiais monolíticos baseados; em sílica [47], polímeros orgânicos [48], e os discos monolíticos de material polimérico macroporoso (nome comercial: CIM® disk monolithic column) [49, 50]. Estes materiais também são vantajosos uma vez que suportam altas variações de vazão do sistema CLAE e posuem baixa pressão de volta.

Várias outras matrizes podem ser utilizadas como suporte; os materiais de sílica comum como; octilsílica (C_8)[51], octadecilsílica (C_{18}) [52], etc.

As fases estacionárias contendo as enzimas imobilizadas normalmente são denominadas IMER (do inglês: *Immobilized Enzymes Reactor*), eles são conectados ao sistema de CLAE, e a saída da coluna, dependendo do tipo de análise a ser realizada, pode ser acoplado a distintos detectores, UV-Vis, fluorescência e EM, ou serem utilizados em sistemas de CLAE multidimensional [41].

A avaliação dos IMER ou biorreatores em ensaios para triagem de ligantes pode ser realizada de duas maneiras [53]. Primeira, o monitoramento da capacidade do ligante em modular a atividade biológica da biomolécula imobilizada [54, 55], e segunda, monitoramento da afinidade do ligante pela biomolécula imobilizada [56].

Os ensaios que envolvem a técnica cromatográfica podem ser conduzidos através de dois modos de eluição, a zonal e a frontal. No modo zonal é realizado injeções de pequenas quantidades de amostra, de uma só vez, o perfil de eluição é obtido por zonas de acordo com a concentração da amostra injetada, retenção versus tempo de análise. No modo frontal, a amostra deve ser injetada continuamente ou estar presente na fase

móvel até a completa saturação, o perfil de eluição é obtido com o aumento gradual amostra pelo tempo de análise.

Neste trabalho foi empregado o acoplamento CLAE-EM, sendo este uma ferramenta analítica de grande aplicabilidade, pois combina a capacidade de separação de diferentes compostos da cromatografia líquida com a capacidade de analisar massas da EM. O monitoramento dos biorreatores no sistema CLAE-EM foram baseados na atividade das enzimas e a capacidade de modulação dos ligantes nas mesmas por eluição zonal.

O sistema utilizado nos forneceu um ensaio rápido, não destrutível, *on-line* e automatizado, combinando a seletividade e reprodutibilidade da biomolécula imobilizada.

Segue uma descrição das enzimas empregadas bem como suas funções biológicas.

1.2 As enzimas

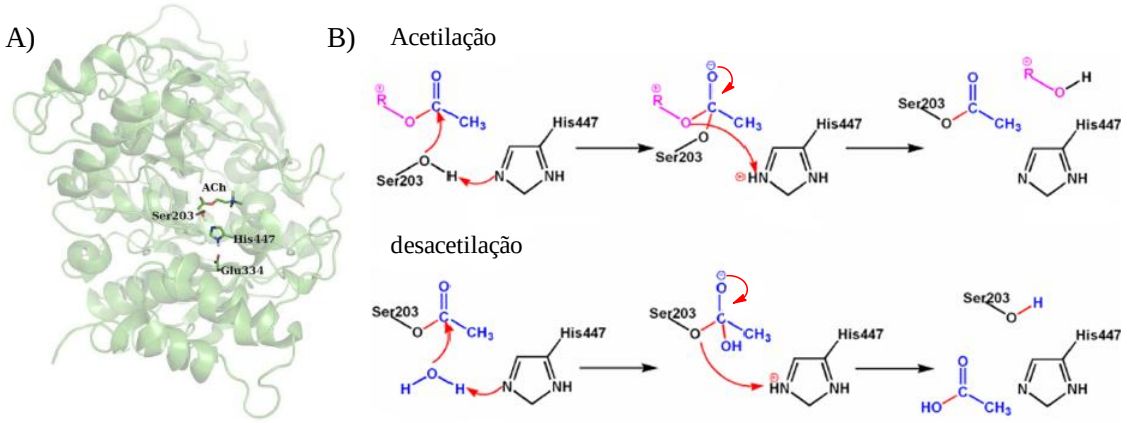
As enzimas selecionadas para estudo neste trabalho foram; a Acetilcolinesterase (AChE, *EC* 3.1.1.7), de duas espécies *Electrophorus electricus* (AChE*ee*) e *human recombinant* (AChE*hu*), e a enzima β-secretase1, *human recombinant* (BACE1, *EC* 3.4.23.48).

1.2.1 A enzima acetilcolinesterase

A enzima AChE, é uma serina-esterase encontrada nas junções neuromusculares e nas sinapses cerebrais colinérgicas. A sua atividade está relacionada com a regulação do término da transmissão do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas [57].

Seu sítio ativo é composto por três resíduos de aminoácidos Serina (Ser), Histidina (His) e ácido Glutâmico (Glu), que são determinantes para a manutenção da função da enzima (figura 4A). A reação enzimática no sítio ativo ocorre por um mecanismo de acetilação-desacetilação. Primeiramente, com a entrada do substrato há o ataque nucleofílico à carbonila da ACh pela Ser, formando um intermediário, em seguida a His transfere um próton e a ruptura do produto colina acontece. O ciclo da reação é fechado com a desacetilação, que também é iniciada como ataque nucleofílico provocado pela hidrólise com a água, liberando o ácido acético (figura 4B) [58].

Figura 4. A) Ilustração do sítio ativo da AChE na presença de acetilcolina. B) Representação do mecanismo de reação de hidrólise catalisada pela AChE no sítio ativo.

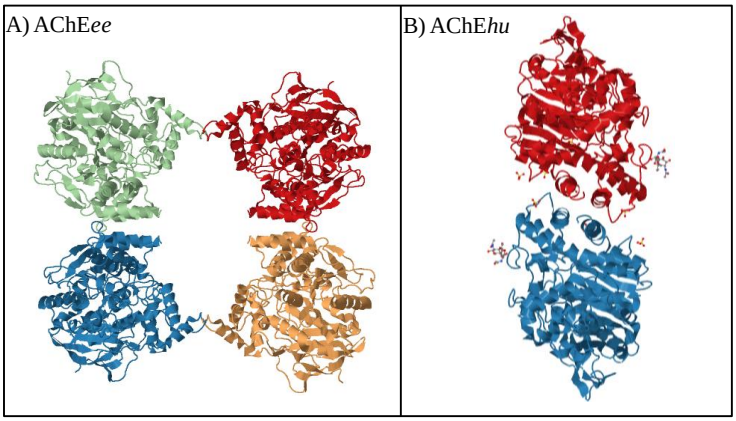


Fonte: Reproduzido de [58] com permissão *Copyright* © 2010, American Chemical Society.

A redução colinérgica no sistema nervoso central causado por um funcionamento desordenado da enzima AChE é uma das características reconhecidas da Doença de Alzheimer (DA) [57, 59, 60]. A enzima AChE é um alvo validado para a DA uma vez que o tratamento sintomático consiste no uso de medicamentos que inibem esta enzima. Baseado nesta temática, esta enzima foi selecionada para o desenvolvimento de metodologias para triagem de ligantes. A AChE*ee* foi empregada como enzima modelo nos estudos devido a sua estabilidade e custo, e a AChE*hu* utilizada após a prévia otimização dos métodos com AChE*ee* por ser de alto custo.

A AChE*ee* utilizada possui 4 subunidades (tetrâmero) onde cada subunidade possui massa molecular de 70 kDa e um sítio ativo, figura 5A. E a AChE*hu* é um dímero de 60kDa e também com um sítio ativo cada subunidade, figura 5B.

Figura 5. Estrutura tridimensional para a AChE. A) Tetrâmero da AChE*ee*. B) Dímero da AChE*hu*.

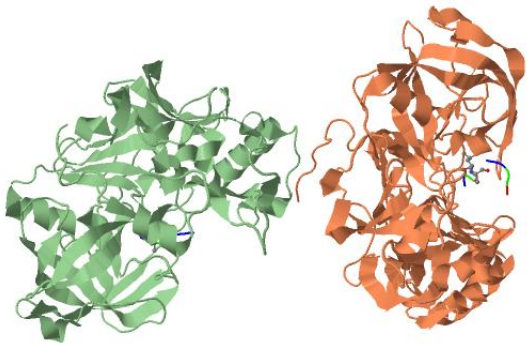


Fonte: A) http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId= 1C2O) e B) Fonte: http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3LII.

1.2.2 A enzima β-secretase1 (BACE1)

A enzima BACE1, é uma ácido aspártico-protease, também conhecida como memapsin-2, ou aspartil protease 2, é constituída de duas subunidades monoméricas formando um dímero de aproximadamente 70 kDa [61].

Figura 6. Estrutura tridimensional para BACE1 (recombinante humana).

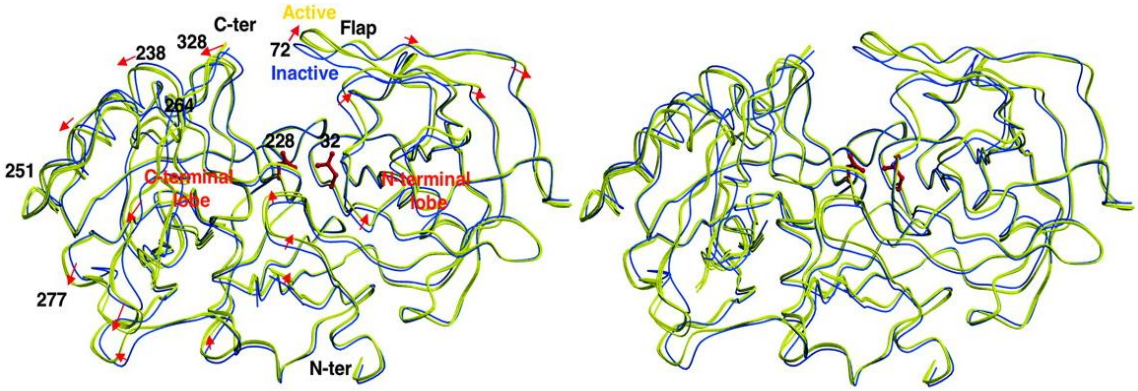


Fonte: http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1FKN&opt=3.

A BACE1, em humanos, é encontrada no cérebro com função importante na formação da bainha de mielina em células dos nervos periféricos [62]. Ela inicia a clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide (APP) na extremidade lumenal da membrana celular, formando o fragmento C-terminal que posteriormente é clivado pela γ-secretase na extremidade N-terminal gerando o peptídeo amilóide (Aβ peptídeo).

Seu sítio ativo possui dois ácidos aspárticos, Asp32 e Asp228, no centro da estrutura e próximos um do outro, recobertos por abas (*flap*) hidrofílicas (ativa-amarelo) e hidrofóbicas (inativa-azul) que controlam o acesso do substrato ao sítio ativo e o configura na geometria correta para a catálise, figura 7. [63]

Figura 7. Estrutura para o sítio ativo da BACE1.



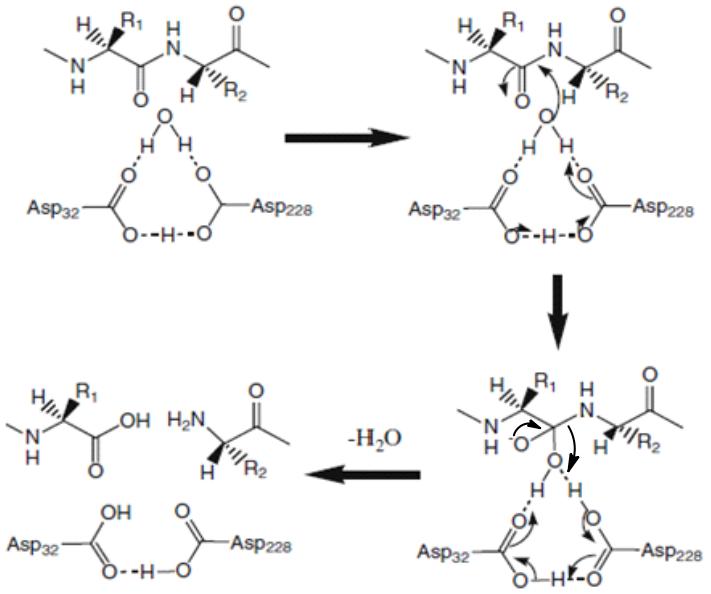
Fonte: Reproduzida de [63] com permissão *Copyright* © 2008 American Society for Microbiology.

A catálise enzimática se dá através de um mecanismo ácido-base. A presença de moléculas de água no sítio ativo da BACE1 é determinante na função da enzima, bem como na sua estabilidade [64]. Figura 8.

Após a ligação do substrato, o par de Asp livre forma ligação de hidrogênio com uma molécula de água. Em seguida, acontece o ataque nucleofílico do oxigênio da água na carbonila do substrato peptídico, formando um intermediário tetraédrico, que é estabilizado por ligações de hidrogênio com o grupo carboxila da Asp. E, finalmente a ruptura da ligação peptídica é acompanhada pela transferência de um próton de Asp para o grupo de saída amino, resultando na liberação dos dois produtos, N-terminal e C-terminal, e a enzima é então restaurada para outro ciclo de catálise.

A primeira molécula de água é envolvida na proteólise para a formação do intermediário tetraédrico, enquanto que a segunda molécula de água estabiliza a conformação aba fechada [63, 64].

Figura 8. Representação do mecanismo de reação de hidrólise catalisada pela BACE1 no sítio ativo.



Fonte: Reproduzido de [64] com permissão da Copyright © 2011, Springer Nature.

Quando há uma clivagem anormal deste Aβ peptídeo, provocada pela BACE1, estes se acumulam no tecido extracelular cerebral formando placas (agregados insolúveis) que são os responsáveis pela neurotoxicidade da DA. Justificando o uso desta enzima para o estudo.

1.3 A doença de Alzheimer (DA)

A DA[1] é a forma mais comum de demência associada à perda de memória, distúrbios cognitivos, deficiência física e comportamental, atingindo principalmente a população idosa [65]. Esta doença pode ser dividida em estágios; inicial (assintomático), moderado (pré-demencial), e severo (perda da autonomia e morte) [66-68]. Embora a aparição mais comum ocorra ao redor dos 60 anos, a incidência da doença em pessoas com idade ao redor dos 40 anos, é também observada e, neste caso, o fator genético tem um importante papel.

Com o aumento da expectativa média de vida, a DA tem atraído grande atenção, especialmente em países desenvolvidos, pois se observa o aumento de sua incidência. De acordo com dados reportados em Alz.Org (2017), nos Estados Unidos, cerca de 5,5

1 Descoberta em 1906 pelo médico alemão Alois Alzheimer.

milhões americanos são portadores da doença, no Brasil 1,2 milhões de brasileiros, e no mundo cerca de 36 milhões de portadores da doença. Estima-se que a partir dos 65 anos, 1 a cada 10 pessoas serão afetadas, e para além houve um aumento de 89% de mortes devido a DA do ano de 2010 a 2014. Portanto, a ausência de tratamentos eficientes para a DA constitui um problema de saúde pública global.

A etiologia da DA é uma síndrome multifatorial, resultante de um conjunto complexo de fatores neuroquímicos. Estudos genéticos realizados em humanos e em modelos animais transgênicos sugerem que vários eventos desencadeiam um caminho patobiológico convergente levando ao mau funcionamento e morte celular.

Do ponto de vista neuroquímico, o quadro de sinais e sintomas desta doença está associado a déficits dos diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina (mais importante), a noradrenalina, a serotonima, dopamina e glutamato. Assim, a atividade colinérgica no sistema nervoso central encontra-se reduzida em portadores da DA [57, 69, 70].

Histopatologicamente no cérebro de pacientes portadores da doença observa-se o depósito de placas senis e emaranhados neurofibilares, acompanhado por perda massiva de neurônios [71, 72]. O peptídeo β-amilóide, produzido por ação de secretases, é o principal componente das placas senis, que formam agregados fibrilares não-covalentes e insolúveis que se depositam no tecido neuronal implicando na neurotoxicidade da DA [73, 74]. Os emaranhados neurofibilares são formados com o acúmulo da proteína *tau* e esta proteína é responsável pela estabilização dos axônios que por sua vez, são responsáveis pela formação e manutenção dos contatos neuronais, e consequentemente, um mau funcionamento da proteína *tau* também está relacionado à DA [75, 76].

Os tratamentos existentes para a DA podem ajudar com os sintomas cognitivos e comportamentais. Os medicamentos para a perda de memória se fundamentam em retardar a evolução da doença, diminuir o quadro de sintomas e alterações comportamentais. [67]

A *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou dois tipos de medicamentos, os inibidores de Colinesterases (Ch) e a memantina. Os inibidores de ChE são: Aricept (Donepezil) aprovado para todas as fases da doença; o Exelon (Rivastigmina) para o estágio moderado; e o Razadyne (galantamina) também para estágio moderado. Estes prescritos para perda de memória, confusão e problemas de pensamento e raciocínio.

A memantina (Namenda) e também o Namzaric, que é uma combinação de memantina e donepezil, foram aprovados para o estágio severo da DA. Memantina é um

antagonista do receptor de glutamato, que está envolvido no processamento, armazenamento e recuperação das informações. Este é prescrito para melhorar a capacidade de realização das tarefas diárias.

Até a presente data a DA não tem cura, porém esforços estão sendo realizados através de diversas pesquisas buscando novos tratamentos para alterar o curso da doença e melhorar a qualidade de vida das pessoas com esta demência.

Os inibidores de colinesterases demonstraram maior eficiência no tratamento clínico na DA. Mas devido à neurotoxicidade da DA, a hipótese amilóide, norteia a pesquisa por novas entidades químicas para o tratamento assintomático da doença se baseando na intervenção da formação dos agregados insolúveis do Aβ peptídeo, que são os responsáveis pelo avanço da doença, morte cerebral, uma vez que estão envolvidos no processo neuroinflamatório e na histopatologia geral da DA [77, 78]. Portanto, existe um grande interesse também na descoberta de inibidores seletivos para a BACE1.

Devido a etiologia heterogênea e o envolvimento de diferentes enzimas em sua progressão, a modulação de uma única enzima pode não ser suficiente para produzir a eficácia desejada. Há também interesse na descoberta de novos fármacos que possam atuar em ambas as enzimas os chamados "*dual inhibitors*" [76, 79-82].

Em virtude das poucas alternativas de medicamentos utilizados no tratamento da DA, esta pesquisa está voltada no desenvolvimento de métodos capazes de reconhecerem compostos com atividade biológica que atinjam os diferentes alvos envolvidos.

Na próxima sessão são apresentadas as metodologias existentes com as enzimas AChE e BACE1 imobilizadas e o monitoramento de sua atividade e inibição.

1.4 Métodos com AChE e BACE1 imobilizadas para triagem de ligantes

1.4.1 Métodos com AChE imobilizada

A AChE, além dos seus substratos naturais os ésteres de colina (acetilcolina, butirilcolina), também hidrolisa outros ésteres, tanto naturais como sintéticos, alguns exemplos são os ésteres de tiocolina (acetiltiocolina, butiriltiocolina, propioniltiocolina), acetato de *o*-nitrofenil, propionato de *p*-nitrofenil, etc. Muitos destes compostos foram explorados e diferentes estratégias de análise para a atividade e inibição da AChE foram descritas envolvendo métodos espectrométricos (UV-Vis, fluorescência, espectrometria

de massa-EM), radiométricos, e biosensores [83]. Os mais utilizados são os espectrométricos.

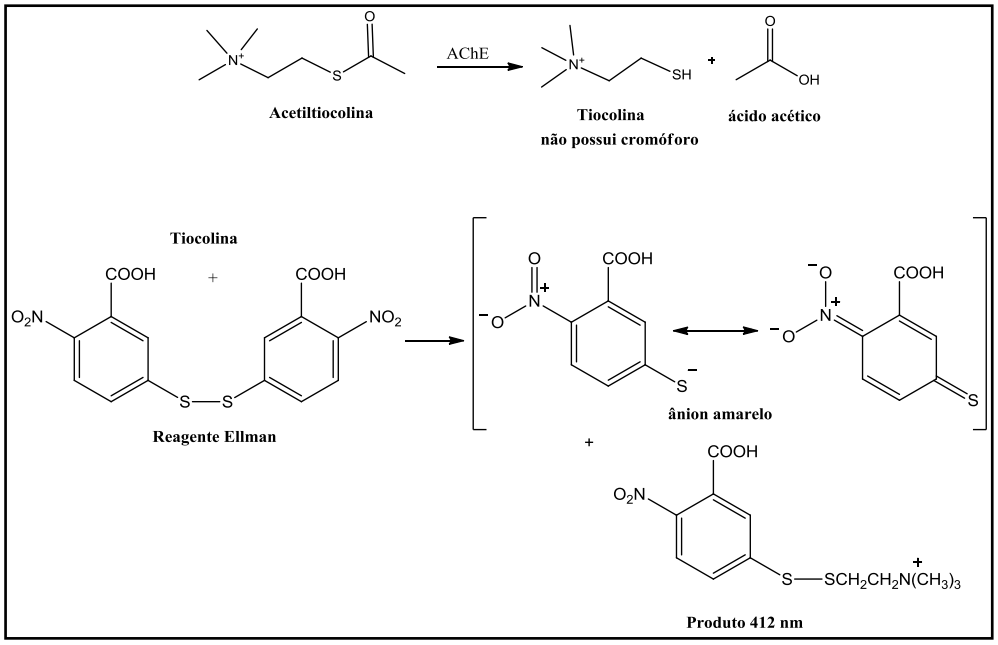
Os ensaios envolvendo UV-Vis normalmente são feitos através de reagentes de derivatização, baseados no trabalho de Ellman [84] empregando o substrato acetiltiocolina, e Marston [85] através do acetato de 1-naftil. Também pode ser realizado por colorimetria empregando um substrato incolor (propionato de *p*-nitrofenil) que após a hidrólise gera um produto amarelo o *p*-nitrofenol [86].

Por fluorescência, é utilizado um substrato que inicialmente não exibe fluorescência, e após a hidrólise da enzima, dá origem a um produto fluorescente. Por exemplo, o substrato butirato de resorufina que forma um ânion fluorescente após a hidrólise [87].

Cabe destacar aqui o método desenvolvido por Ellman e colaboradores [84] sendo o método mais empregado para o monitoramento da AChE. Em tal método a tiocolina formada pela hidrólise enzimática reage com o Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis{2-nitrobenzóico]) formando um ânion amarelo de intensa absorção em 412 nm (figura 9).

Este método é vantajoso devido a sua simplicidade e praticidade, porém apresenta resultados falso-positivos, onde a presença de compostos como aldeídos e/ou aminas podem reagir com o reagente de Ellman mascarando o resultado de inibição [88].

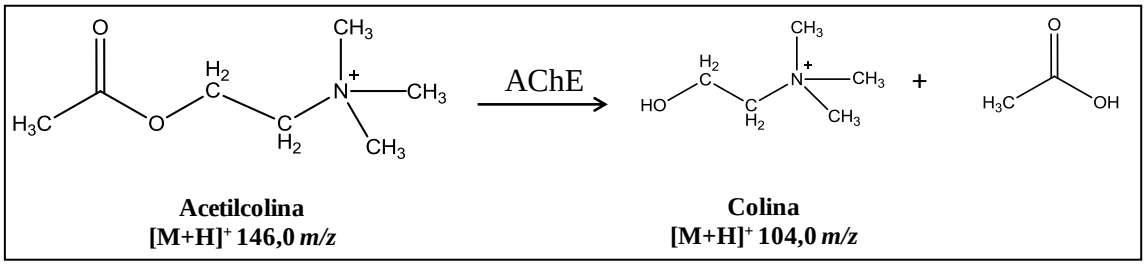
Figura 9. Catálise da AChE empregando acetiltiocolina como substrato e posterior derivatização com reagente de Ellman.



Fonte: Adaptado de Ellman *et al.* (1961) [84].

Por espectrometria de massa (EM), o substrato natural da enzima, acetilcolina, pode ser utilizado e a massa do produto de hidrólise, colina, é diretamente mensurada [89, 90], figura 10. Aqui, não há derivatização contribuindo para eliminação de resultados falso-positivos, como no método de Ellman e colaboradores, e também há a possibilidade de se obter informações da estrutura dos ligantes avaliados através de estudos de fragmentação.

Figura 10. Catálise da AChE empregando aceticolina como substrato e seus valores de $[M+H]^+$ para detecção no EM.



A escolha da técnica para a detecção depende da aplicação e consequentemente do formato do ensaio.

Metodologias de imobilização para a AChE em suportes cromatográficos com monitoramento através do método modificado de Ellman *et al.*(1961) por CLAE, foram reportados, 1) método de ligação covalente envolvendo grupos amino da extremidade N-terminal da enzima via glutaraldeído no suporte em; disco monolítico (CIM) [49, 91], e capilar de sílica fundida [45, 55].

2) Métodos por ligação covalente entre grupos amino dos resíduos de lisina da enzima e grupos epóxidos no suporte em disco monolítico [92, 93].

Outros trabalhos envolvendo a AChE imobilizada utilizando CLAE-EM foram descritos, como; 1) ligação covalente amino-glutaraldeído em capilar de sílica fundida [89], 2) ligação covalente amino-glutaraldeído em partículas magnéticas [94], e 3) encapsulação via sol-gel em disco monolítico [90].

Em Vanzolini *et al.* (2015) foi desenvolvido um novo modelo de ensaio para a AChE “pesca de ligantes em partículas magnéticas”, onde os compostos presente na matriz que possuem afinidade pela biomolécula imobilizada permanecem retidos,

enquanto os que não têm ficam na solução do sobrenadante e são eliminados. Após este processo, a análise dos compostos, retidos e não retidos são realizados através de uma coluna HILIC no sistema CLAE-EM.

Em ambos os casos citados foram concretizados estudos baseados na atividade da enzima utilizando-se o modo deeluição zonal, e a partir disto, calculados os parâmetros cinéticos e de inibição para a enzima tais como; constante de Michaelis (K_{Map}), potência inibitória (IC_{50}) e constante de inibição (K_i).

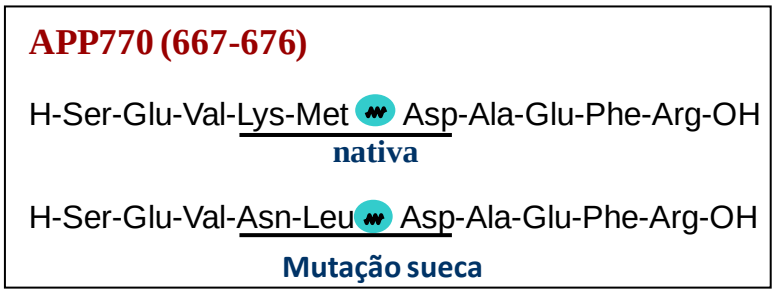
Outras metodologias de imobilização para a AChE em suportes de silicone poroso com monitoramento por meio do método modificado de Ellman *et al.* em espectrofotômetro foram publicados, sendo: 1) ligação covalente amida da enzima no suporte (silicone poroso) via processo NHS/EDC (N-hidroxisuccinimida/carbodiimida) [95]; 2) ligação covalente via reação de aminólise com grupos de ácido carboxílico da AChE e grupos amino N-terminal no suporte (silicone poroso) [95]; 3) adsorção física da enzima em silicone poroso [96]. Nestes casos, somente foram reportados o sucesso da imobilização frente a solúvel e suas possíveis aplicações.

1.4.2 Métodos com BACE imobilizada

A BACE1 catalisa a hidrólise de peptídeos que mimetizam a sequência da proteína precursora amilóide (APP). Os substratos sintéticos disponíveis comercialmente com mutação sueca da APP possuem grupos fluoróforos, e então seu monitoramento fica limitado a detectores de fluorescência [64], podendo também ser utilizado EM [46, 82, 97].

A BACE1 cliva os peptídeos com mutação sueca em torno de 10 vezes mais rápido que a APP na sua forma nativa, figura 11. A diferença consiste nos resíduos da clivagem C-terminal, onde a metionina (Met) é substituída pela leucina (Leu).

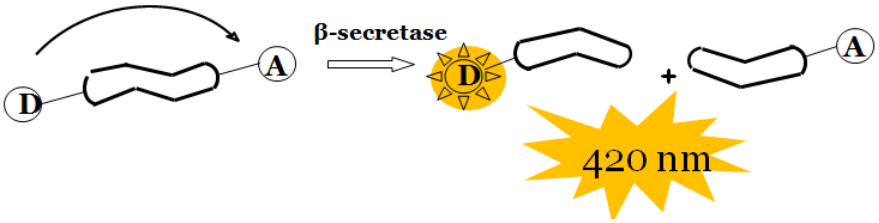
Figura 11. Substratos peptídicos para a BACE1, a forma nativa e mutada da APP770.



Fonte: Adaptada de [61].

O princípio do ensaio por fluorescência pode ser ilustrado como na figura 12. Antes da clivagem da enzima o grupo doador (D) transfere sua energia para o supressor (A), assim quando a cadeia peptídica é clivada pela BACE1, a fluorescência específica do D não é mais suprimida pelo A, e então pode ser medido. O aumento da fluorescência está linearmente relacionado com a velocidade de proteólise.

Figura 12. Ilustração dos princípios de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) clivado pela BACE1.



Fonte: Adaptado de [64]

Estes métodos proporcionam ensaios sensíveis e homogêneos, mas apresentam desvantagens tais como; a análise por um longo período de tempo (geralmente mais de 1 h), alto consumo de enzima, variabilidade devido a diferentes lotes e a fonte da enzima. Também, na triagem de novos compostos com diferentes entidades químicas, interferências podem surgir devido à presença de anéis aromáticos conjugados na estrutura dos produtos sintéticos e naturais gerando resultados falso-positivos e falso-negativos [64, 98].

Metodologias com a BACE1 imobilizada via amino-glutaraldeído em disco monolítico e detecção por CLAE-fluorescência foram reportados [50, 99]. Nestes trabalhos a imobilização foi efetiva, porém, problemas com a solubilidade do substrato e interferência quando usados na triagem impossibilitaram a sua aplicação.

O mesmo grupo de pesquisa publicou dois métodos da BACE1 em disco monolítico com monitoramento por EM [97] [98]. Destacando que o método de imobilização em ambos os casos foi o mesmo, a diferença foi o substrato utilizado em cada trabalho. E, ainda neste grupo de pesquisa, outro trabalho foi reportado contendo uma aplicação do método na triagem de ligantes com a BACE1 imobilizada [82] com monitoramento por fluorescência.

Mais recentemente, um método inédito com a descrição da imobilização da BACE1 em capilar de sílica fundida e monitoramento por EM (ICER-BACE1-EM) para aplicação na triagem de ligantes foi publicado. [46]. Este trabalho faz parte dessa tese de doutorado. Comparado aos métodos já publicados, neste, o sistema foi aplicado na triagem de ligantes (parte I) com reconhecimento de dois ligantes sem problemas de interferência, também o fragmento peptídico da clivagem enzimática foi medido por EM através do monitoramento das massas dos produtos de clivagem enzimática, apresentando vida útil por 11 meses.

Como conclusão, em ensaios envolvendo monitoramento por EM, desvantagens são eliminadas garantindo a inexistência de falso-positivos.

Em função das metodologias existentes para triagem de ligantes de ambas as enzimas, este trabalho foi conduzido para o desenvolvimento de novos modelos de triagem.

A seguir de maneira resumida descreve-se a caracterização dos inibidores/ligantes neste trabalho.

1.5 Caracterização de inibidor

O interesse neste trabalho envolve a aplicação dos métodos com as enzimas imobilizadas na triagem de ligantes, assim sendo, a finalidade do ensaio constitui em identificar os ligantes e caracterizá-los em termos de modalidade de inibição.

A caracterização é realizada com base na influência destes nos parâmetros cinéticos, constante de Michaelis (K_M) e velocidade máxima ($V_{Máx}$), da enzima. Neste trabalho, a avaliação do efeito dos inibidores nestes parâmetros consistiu da determinação da potência inibitória (IC_{50}), mecanismo de ação e constante de inibição (K_i).

As enzimas, AChE e BACE1 apresentam comportamento como descrito por Michaelis-Menten de acordo com a equação 1.

$$V_0 = \frac{V_{Máx} \cdot [S]}{K_M + [S]} \qquad \text{Equação (1)}$$

Onde V_0 é a velocidade inicial da reação, K_M é correspondente a concentração de substrato onde V_0 é metade da $V_{Máx}$. Esta equação 1 é essencial nos estudos de cinética enzimática.

Estes autores propuseram uma condição de equilíbrio rápido onde primeiramente a enzima se combina reversivelmente com o substrato compondo o complexo enzima-substrato (ES), em um passo relativamente rápido. Em seguida, numa segunda etapa, sendo esta lenta e limitante da velocidade da reação, o complexo ES se quebra liberando a enzima livre (E) e o produto da reação (P). A $V_{Máx}$ será atingida quando todas as moléculas de E estiverem na forma complexada ES, e esta condição é favorecida quando a [S] for suficientemente alta para a manutenção do complexo. Esta condição também é denominada saturação [100].

A constante K_M é dependente das condições de pH, força iônica, e temperatura do meio reacional, seu valor exprime a afinidade da enzima pelo substrato. Portanto, de acordo com as condições de análise de cada metodologia desenvolvida, os valores de K_M aparente (K_{Map}) para cada sistema foram investigados de modo a garantir a saturação da enzima com o substrato.

Inibidor enzimático é toda substância que reduz a velocidade da reação enzimática. Há duas classes principais de inibidores, os reversíveis e os irreversíveis [101, 102].

Os reversíveis são compostos que se ligam em sítios específicos na enzima por interações não covalentes, o processo envolve equilíbrio reversível entre o inibidor e a enzima. Dependendo do modo de ação, são subdivididos em competitivos, não-competitivos, incompetitivos, e mistos [103, 104].

Um inibidor competitivo atua competindo com o substrato pelo sítio ativo da enzima, neste caso, o inibidor não se liga no complexo ES. A $V_{Máx}$ não é afetada e a K_{Map} é aumentada pois existe uma fração da enzima sob a forma enzima-inibidor (EI) que não possui afinidade pelo substrato.

O inibidor não-competitivo possui afinidade tanto pela enzima quanto pelo complexo ES, ele pode se ligar tanto na forma E livre quanto ao complexo ES. Neste tipo de inibição a $V_{Máx}$ é menor que a observada na ausência de inibidor pois uma parte da enzima está inativa na forma do complexo enzima-substrato-inibidor (ESI), e a K_M permanece a mesma porque as formas da enzima que podem combinar com o substrato são as mesmas, E e EI [103].

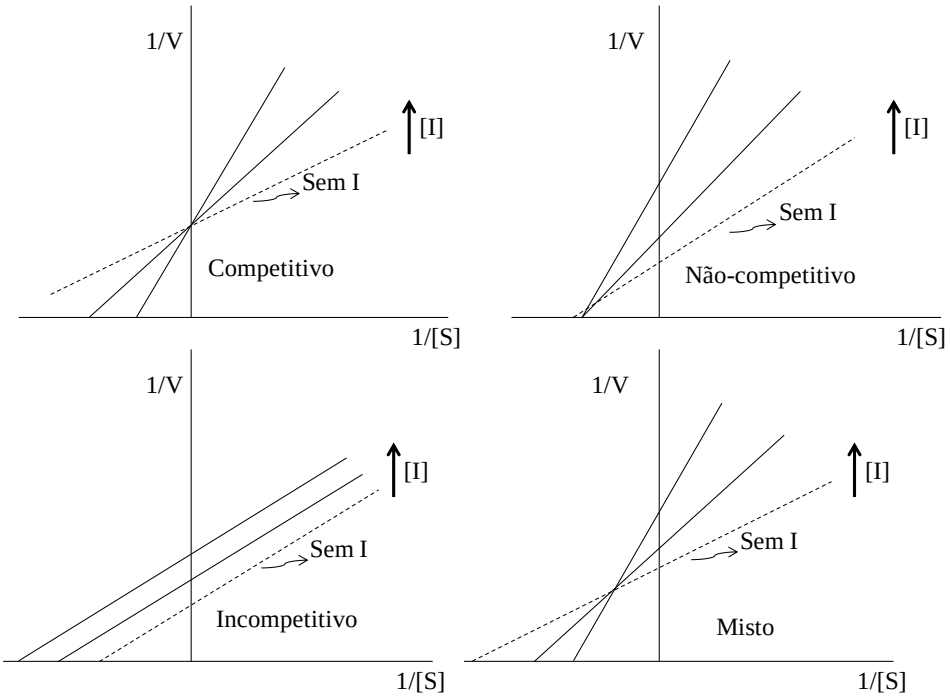
O inibidor incompetitivo demonstra pouca afinidade pela enzima, sendo assim ele se liga apenas ao complexo ES, fornecendo um complexo ESI inativo. Consequentemente $V_{Máx}$ e K_{Map} são diminuídas pelo mesmo valor [103].

Para a inibição do tipo mista o substrato e o inibidor se ligam à enzima em sítios diferentes para formar os complexos ES, EI e ESI [104]. Ambos os valores de $V_{Máx}$ e K_M são afetados. Este tipo de inibição pode ser considerado uma mistura de mecanismos de inibição do tipo competitivo e não competitivo [104].

Já os inibidores irreversíveis reagem covalentemente com a enzima inativando-a, e somente por meios químicos a atividade da enzima pode ser restaurada [102].

Diversas representações podem ser feitas para a determinação do mecanismo de ação de um inibidor, todas são derivadas da equação de Michaelis-Menten (equação 1), como, Lineweaver-Burk, Dixon, Eadie-Hofstee, e Hanees. Aqui foi traçado a representação de Lineweaver-Burk, uma representação duplamente recíproca da equação 1. Assim, de acordo com o perfil gráfico obtido a classificação do mecanismo foi definida [100]. Figura 13.

Figura 13. Ilustração de gráficos de Lineweaver-Burk para classificação dos tipos de mecanismos de inibição.



A seguir serão apresentados os objetivos deste trabalho e na sequência a pesquisa realizada. Devido às diferenças dos métodos de imobilização, substratos e detecção dos sistemas empregados, o trabalho está dividido em três partes.

2. Objetivos

Desenvolver dois métodos analíticos: 1) envolvendo a co-imobilização das enzimas AChE e BACE1 e 2) a imobilização da BACE1 em capilares de sílica fundida. Aplicar os métodos na triagem de inibidores seletivos em coleções de moléculas naturais e combinatórias sintéticas.

2.1 Objetivos específicos

1. Estudo das condições ideais de imobilização para a enzima BACE1;
2. Estudo as condições ideais de co-imobilização para as enzimas AChE-BACE1;
3. Determinação das condições cromatográficas ótimas para o acoplamento dos biorreatores a um sistema cromatográfico multidimensional;
4. Realização dos estudos cinéticos para as enzimas imobilizadas e avaliação da estabilidade nas condições de análise;
5. Validação para uso dos ICER na avaliação da atividade biológica de inibidores, empregando compostos conhecidamente ativos em solução;
6. Aplicação dos métodos desenvolvidos na triagem de novos ligantes.

Parte I – Imobilização da enzima BACE1 em capilar de sílica fundida - Método *on-line* para a triagem de ligantes

I.1 Introdução

A enzima BACE1 é um importante alvo de estudo na pesquisa por fármacos para a DA devido ao seu envolvimento na geração e consequentemente agregação dos peptídeos amilóides, um dos maiores constituintes das plaquetas amilóides em cérebros de pacientes com a DA.

A maioria das metodologias existentes para avaliação da atividade inibitória de compostos contra a BACE1 consiste do envolvimento dos princípios de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET), uma vez que os substratos disponíveis são compostos com grupos fluorogênicos. Porém estas apresentam várias desvantagens [105], e, por esta razão, foi desenvolvida uma metodologia empregando detecção por EM com o objetivo da obtenção de um método capaz de fornecer resultados robustos, reprodutíveis e sem falso-positivos.

Nesta parte do trabalho, o objetivo foi o desenvolvimento do ICER com a BACE1, ICER-BACE1, que consistiu da imobilização covalente da enzima no suporte capilar de sílica fundida. Este foi conectado ao sistema CLAE-EM onde o EM possui fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI) e analisador *Ion trap* (IT). Neste sistema *on-line* a massa correspondente ao produto de hidrólise enzimática foi obtida pela integração da área do pico de massa obtido. O substrato, JMV2236, um peptídeo do tipo mutação sueca de APP, e o inibidor padrão, inibidor de β-secretase (um peptídeo análogo à estatina) foram empregados para o desenvolvimento e validação do método. Posteriormente o ICER-BACE1 foi aplicado no ensaio de ligantes em uma coleção de oito compostos sintéticos.

O método desenvolvido neste trabalho foi publicado na revista *Analytical methods*, 2017, 9, 2189, intitulado "*An on-flow assay for screening of β-secretase ligands by immobilised capillary reactor-mass spectrometry*".

I.2 Procedimento experimental parte I

I.2.1 Materiais

A enzima BACE1 recombinante humana, expressa em células HEK 293 (C-terminal FLAG tagged), domínio extracelular ≥10,000 unidades/mg de proteína, ≥ 90 % SDS-PAGE, e o inibidor, inibidor de β-secretase, liofilizado (1mg), foram adquiridos pela SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA). O substrato peptídico orto-aminobenzoil (Abz)-(Asn670, Abz-(Asn^{670}, Leu^{671})-proteína precursora β amiloide A4 (669-674)- etilenodiamino 2,4- dinitrofenol (EDDnp) trifluoroacetato (JMV2236) foi adquirido pela BACHEM AG (Bubendorf, Switzerland).

Os reagentes e sais como; hidrogeno fosfato de potássio, hepes (ácido 4-(2-hidroxietil piperazina-1-etano sulfônico), acetato de amônio, borohidreto de sódio, monoetanolamina, 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), dimetilsulfóxido (DMSO), glutaraldeído, foram de grau analítico e adquiridos de diversas fontes como, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Merck (Darmstadt, Germany), Synth (São Paulo, Brazil), ou Acros (Geel, Belgium). As colunas enzimáticas foram preparadas utilizando capilares de sílica fundida (0,375 mm x 100 μm d.i.) adquiridos da Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). A água foi deionizada em um sistema Millipore Milli- Q® system (Millipore, São Paulo, Brasil).

I.2.2 Instrumentação

As soluções necessárias para o preparo do capilar com a enzima imobilizada foram percoladas através de uma bomba seringa - 341B syringe pump 2211 plus (Sage instruments, Boston, USA).

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)- nexeraXR (Shimadzu, Kyoto, Japan), composto por duas bombas LC 20ADXR, um injetor automático SIL-20A, um degaseificador DGU-20A, um forno CTO- 20A, interligados através de uma controladora CBM-20A. O sistema CLAE foi acoplado ao espectrômetro de massa (EM) - amaZon speed *Ion Trap* (IT) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipado com uma fonte de ionização do tipo *electro-spray* (ESI). Os espectros de massa foram registrados através do software hystar e trap control. A homogeneização das amostras foi efetuada em um vórtex Heidolph Reax top.

A pesagem dos reagentes foi realizada em uma balança analítica Marte, modelo AY220, com precisão 0,0001g. As medidas de pH em um pH-metro Marte MB 10 com precisão 0,01.

I.2.3 Preparo do ICER-BACE1

A enzima BACE1 foi imobilizada em capilares de sílica fundida com dimensões de 100 cm x 0,375 mm x 100 µm d.i. pelo método de imobilização por ligação covalente utilizando o agente de ligação, glutaraldeído [46] em três etapas.

O preparo da solução enzimática consistiu de uma alíquota de 20 µL da solução comercial (solubilizada em tampão hepes 20 $mmol.L^{-1}$ pH 7,4 contendo 125 $mmol.L^{-1}$ NaCl) diluída em solução fosfato 50 $mmol.L^{-1}$, pH 7,4, correspondendo a 0,04433$mg.mL^{-1}$, com 942.8 $U.mL^{-1}$ ou 565 unidades totais de enzima.

1ª Pré-tratamento do capilar de sílica fundida

Através da bomba seringa percolou-se pelo capilar a 130 $\mu L.min^{-1}$, 2,0 mL de uma solução de HCl (2,0 $mol.L^{-1}$), seguido de 1,0 mL de água deionizada. O capilar foi colocado a 95 °C durante 1 hora. Após, 1,0 mL de uma solução de 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) (10% em água) foi percolada pelo capilar e novamente este deixado a 95°C por meia hora. Depois deste procedimento o capilar permaneceu em temperatura ambiente por 12 horas.

2ª Imobilização da enzima BACE1

Após o período de 12 horas, 1,5 mL de solução de glutaraldeído (1% em KH_2PO_4, 50 $mmol.L^{-1}$, pH 6,0) foi percolado pelo capilar a 130 $\mu L.min^{-1}$, seguido de 2,0 mL de solução KH_2PO_4,50 $mmol.L^{-1}$, pH 6,0.

A partir desta etapa, a vazão da bomba seringa foi modificada para 5 $\mu L.min^{-1}$. Posteriormente 0,5 mL de solução enzimática (942,8 $U.mL^{-1}$) por 10 vezes.

3ª Redução bases de Schiff

Na sequência uma solução de borohidreto de sódio (5 $mg.mL^{-1}$) preparada em solução KH_2PO_4,50 $mmol.L^{-1}$, pH 6,0 foi percolada pelo capilar por 1h, subsequente uma solução KH_2PO_4, 50 $mmol.L^{-1}$, pH 6,0 por 5 minutos e uma solução de monoetanolamina (0,1 $mol.L^{-1}$) por 1h, novamente uma solução KH_2PO_4, 50 $mmol.L^{-1}$, pH 6,0 por 5 minutos, e por fim, 1,0 mL de solução hepes (20 $mol.L^{-1}$, pH 7,4).

Otimização das condições de pH para a imobilização

Variações no pH (6,0 e 7,0) da solução KH_2PO_4 (50 mmol.L^{-1}) utilizada na 2ª e 3ª etapas da imobilização da enzima foram realizadas, bem como variações no pH (7,0; 7,4; e 8,0) para a diluição da enzima.

Ao final, o capilar preparado ICER-BACE1 de 100 cm foi cortado em três capilares com 30 cm cada um. Suas extremidades permaneceram imersas na solução KH_2PO_4, 50 mmol.L^{-1}, pH 7,0 a 4 °C quando não estava em uso.

I.2.4 Condições do sistema CLAE-EM

O ICER-BACE1 preparado (30 cm x 0.375 mm x 0.1 mm di) foi conectado ao sistema CLAE como uma coluna de afinidade e este conectado diretamente ao EM formando um sistema *on-flow* CLAE-EM.

Os parâmetros utilizados para a fonte ESI, selecionados de acordo com o fluxo da fase móvel, consistiram em: voltagem no capilar - 4500 V; *end plate offset* – 550V; pressão do gás de nebulização (N_2)- 17 psi; vazão do gás de secagem (N_2)- 5,5 L.min^{-1}; temperatura da fonte de ionização 250 °C. Os parâmetros do analisador IT foram: isolamento de 1,0*m/z* e amplitude de fragmentação 120%. Nitrogênio e hélio foram utilizados como gás de secagem e colisão, respectivamente.

As análises foram realizadas com o EM operando em *single ion-monitoring* (SIM) em modo de ionização positiva numa faixade 300 a 1000*m/z*, com detecção dos cátions $[M+H]^+$ 987,5*m/z*, correspondente a massa do substrato JMV2236, e os produtos de clivagem enzimática correspondendo aos cátions $[M+H]^+$ 464,26*m/z* e $[M+H]^+$ 542,25 *m/z*. Todos os dados foram coletados e analisados no programa Bruker Daltonics Data Analysis (versão 4.3).

I.2.5 Fase móvel e substrato

A fase móvel utilizada nas análises foi preparada diariamente acrescentando-se 0,077 g de acetato de amônio a um volume final de 100 mL em água, pH ajustado a 4,5 com a adição de solução de ácido fórmico 10% v/v (concentração final de 2 mmol.L^{-1}).

A solução estoque do substrato JMV2236 1 mmol.L^{-1} foi preparada solubilizando-se 1 mg em DMSO a um volume final de 1 mL. A solução de JMV2236 a 50 μmol.L^{-1} foi realizada a partir da diluição da estoque em solução de acetato de amônio 10 mmol.L^{-1} pH 4,5.

I.2.6 Otimização das condições de acoplamento CLAE-EM

Nos estudos descritos a seguir, a influência destes parâmetros na atividade do ICER-BACE1 foi verificada. Os resultados foram avaliados a partir da integração do pico de massa do produto de clivagem enzimática $[M+H]^+$ 464,24*m/z*.

I.2.6.1 Concentração da fase móvel

A concentração da fase móvel (2, 5 e 10 mmol.L^{-1}) na atividade do ICER-BACE1 foi avaliada. O ICER-BACE1 conectado ao sistema CLAE-EM foi deixado sob condicionamento por 30 minutos em cada concentração de fase móvel em estudo, realizado injeções de 5µL da solução de substrato JMV2236 (50 µmol.L^{-1}), em quintuplicata a 0,05 mL.min^{-1}, 25 °C, pH 4,5.

I.2.6.2 pH da fase móvel

O pH da fase móvel, acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}), valores entre 4,0 a 6,0 foi verificado. Após condicionamento do ICER-BACE1 por 30 minutos em cada valor de pH em estudo, alíquotas de 5 µL da solução JMV2236 (50 µmol.L^{-1}), em quintuplicata a 0,05 mL.min^{-1}, 25 °C, foram realizadas.

I.2.6.3 Vazão da fase móvel

O tempo de contato do substrato com a enzima foi determinado com a variação do fluxo da fase móvel de 0,01 a 0,1 mL.min^{-1} e também com a interrupção do fluxo (*stop-flow*) após a injeção do substrato de 3, 5 e 10 minutos.

Para isto, 5 µL da solução de substrato JMV2236 (50 µmol.L^{-1}) foram injetadas, em triplicata, com variações do fluxo (0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1 mL.min^{-1}) da fase móvel acetato de amônio, 2 mmol.L^{-1}, pH 4,5, a 25 °C.

Depois de selecionado o melhor fluxo, interrupções de 3, 5, e 10 minutos foram realizados após a injeção de 5 µL da solução de substrato JMV2236 (50 µmol.L^{-1}). Fase móvel; solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}, pH 4,5), vazão; 0,02 mL.min^{-1} , a 25°C.

I.*2.6.4 Volume de injeção para o substrato*

Alíquotas de 1; 5, e 10 µL da solução JMV2236 (50 µmol.L^{-1}) foram injetadas no ICER-BACE1 em triplicata. Condições; fase móvel; solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}, pH 4,5), vazão; 0,02 mL.min^{-1}, *stop-flow*; 5 minutos, a 25°C.

I.2.6.5 Temperatura de trabalho para o ICER-BACE1

A temperatura na atividade do ICER-BACE1 durante as análises foi avaliada nos valores de 25, 30, e 37°C. O ICER-BACE1 foi condicionado por 30 minutos as respectivas temperaturas, 5 µL da solução de substrato JMV2236 (50 µmol.L^{-1}) foram injetadas (em triplicata). Condições: Fase móvel; solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}, pH 4,5), vazão; 0,02 mL.min^{-1}, *stop-flow*; 5 minutos.

I.2.7 Determinação da atividade e estabilidade do ICER-BACE1

A atividade e estabilidade do ICER-BACE1 foram verificadas pela injeção do substrato JMV2236 no sistema CLAE-EM sob as condições otimizadas de análise, sendo: Fase móvel, solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}, pH 4,5); vazão, 0,02 mL.min^{-1}; *stop-flow*, 5 minutos; volume de injeção, 5 µL; tempo de condicionamento do ICER-BACE1, 30 minutos a 37°C.

I.2.8 Validação do método

O método *on-line* foi validado pela injeção do substrato JMV2236 no ICER-BACE1 ativo. As figuras de mérito avaliadas foram; linearidade, precisão, exatidão, seletividade, repetibilidade, limite de quantificação (LQ), e limite de detecção (LD). A linearidade do método foi investigada a partir de uma curva de calibração com padrão externo empregando uma faixa de concentração de substrato de 10 a 25 µmol.L^{-1}.

As soluções de substrato para a curva foram preparadas a partir da diluição da solução estoque do substrato JMV2236 (1 mmol.L^{-1} em DMSO), nas concentrações de 50, 60, 75, 100, e 125 µmol.L^{-1}. Alíquotas de 10 µL de cada uma destas soluções foram completadas para 50 µL com a solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}, pH 4,5).

As soluções foram preparadas em triplicata, misturadas em um vórtex por 10 s e 5 µL injetadas no ICER-BACE1. A curva de calibração foi construída pela área do produto de hidrólise enzimática versus a concentração de substrato injetada.

A precisão intra–dia e a exatidão do método foram avaliadas pela análise de três controles de qualidade (CQ), valores selecionados a partir da curva de calibração, nas concentrações de 12, 17, e 22 µmol.L^{-1}. As soluções para os CQ foram preparadas pela adição de 10 µL de solução de JMV2236 nas concentrações de 60, 85 e 110 µmol.L^{-1} completado para 50 µL com a solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}, pH 4,5).

As soluções foram preparadas em quintuplicata, misturadas em um vórtex por 10s e alíquotas de 5 µL injetadas no ICER-BACE1. As análises foram realizadas em 3 dias não consecutivos.

A seletividade do método foi avaliada por análises de amostras branco (ausência de substrato) compostas por DMSO e solução de acetato de amônio 2 $mmol.L^{-1}$ a pH 4,5.

A possibilidade de autólise do substrato também foi avaliada pela injeção de solução de JMV2236 (50 $\mu mol.L^{-1}$) em um capilar vazio, nas mesmas condições do ensaio descritas no item I.2.7.

I.2.9 Parâmetro cinético aparente (K_{Map}) para ICER-BACE1

O parâmetro cinético K_{Map} foi obtido através da construção de uma curva cinética a partir das injeções de concentrações crescentes de JMV2236 (10 a 100 $\mu mol.L^{-1}$) no ICER-BACE1.

As soluções de JMV2236 utilizadas para a curva foram preparadas a partir da diluição da solução estoque de 1 $mmol.L^{-1}$ a 20, 30, 40, 50, 80, 100, 150, e 200 $\mu mol.L^{-1}$. Deste modo, as soluções finais para injeção no sistema consistiram de alíquotas de 25 µL de cada concentração de JMV2236 acima descritas a um volume final de 50 µL com solução de acetato de amônio (2 $mmol.L^{-1}$, pH 4.5). Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e, em seguida, 5 µL foram injetadas no ICER-BACE1, em triplicata.

Condições de análise, descritas no item I.2.7.

O parâmetro K_{Map} foi extrapolado usando o programa Sigma Plot 11.0 (SPSS, Inc.) na função de regressão não-linear de melhor ajuste.

I.2.10 Estudos de inibição

I.2.10.1 Validação do ICER-BACE1 com inibidor padrão

O ICER-BACE1 foi validado com o inibidor padrão denominado inibidor de β-secretase [106]. Uma curva de potência inibitória (IC_{50}), a constante de inibição (K_i), e o mecanismo de ação para este inibidor foram determinados.

Para a IC_{50}, determinado variando-se a concentração do inibidor padrão e mantendo-se fixa a concentração de substrato a 50 $\mu mol.L^{-1}$.

As soluções para este ensaio foram obtidas por adição de 10 µL da solução de JMV2236 (50 $\mu mol.L^{-1}$, em DMSO) e 10 µL de cada solução de inibidor de β-secretase

(0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,0 e 10 µmol.L^{-1}, em DMSO). Volume final completado para 50 µL com solução de acetato de amônio (pH 4,5) e 5 µL de cada uma destas soluções foram injetadas no ICER-BACE1, em triplicata.

A área do produto obtida na presença (P_i) e na ausência (P_0) do inibidor foi comparada e a porcentagem de inibição (% I) calculada como descrito na equação I.1. A curva de inibição foi construída pela curva de % de inibição versus a concentração de inibidor. Os parâmetros de regressão não linear foram calculados e o valor de IC_{50} extrapolado utilizando o programa Sigma Plot 11.0 (SPSS, Inc.).

$$\% I = 100 - [\left(\frac{P_i}{P_0}\right) x\ 100] \qquad \text{Equação (I.1)}$$

Para a determinação da constante de inibição (K_i) e mecanismo de ação, uma curva controle (ausência de inibidor) e três curvas na presença de concentrações fixas de inibidor de β-secretase sendo 0,4, 1,4, e 2,0 µmol.L^{-1} foram preparadas e avaliadas.

Para a curva controle, as soluções foram obtidas pela adição de 25 µL de solução de JMV2236 (9,0; 18,0; 34,0 ou 50,0 µmol.L^{-1}) a um volume final de 50 µL completado com solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}, pH 4,5).

Para as curvas na presença do inibidor, as soluções foram constituídas pela adição de 25 µL de solução de JMV2236 (9, 18, 34, ou 50 µmol.L^{-1}) e 10 µL da solução de inibidor de β-secretase nas concentrações de 0,4, 1,4, ou 2,0 µmol.L^{-1}, completados a um volume final de 50 µL com solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}, pH 4,5). As soluções foram injetadas no ICER-BACE1, em triplicata. O duplo-recíproco 1/[área produto] versus 1/[JMV2236] foi construído e K_i determinado pelo *replot* do duplo recíproco.

I.2.11 Aplicação do ICER-BACE1

Oito compostos sintéticos, nomeados; **PDJ15**, **PDJ16**, **PDJ17**, **PDJ26**, **PDJ27**, **PDJ28**, **PDJ29** e **FCT01**, cedidos pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Ivone de Carvalho da FCFRP-USP foram avaliados no ICER-BACE1. Os compostos foram solubilizados em DMSO e soluções estoque de 0,250 mmol.L^{-1} para cada composto foram preparadas.

I.2.11.1 Ensaio com ligantes no ICER-BACE1 a 50 µmol.L^{-1} de cada composto

Um teste de inibição pontual de cada composto candidato a 50 µmol.L^{-1} foi inicialmente realizado. Assim, a partir da diluição das soluções estoque dos compostos (0,250 mmol.L^{-1}) foram preparadas soluções de 50 µmol.L^{-1} de cada composto, sendo: 10 µL da solução estoque do composto candidato a inibidor, 25 µL da solução de JMV2236 (0,1 µmol.L^{-1}) e 15 µL da solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}, pH 4,5). O volume final foi de 50 µL. As soluções foram preparadas em duplicatas e alíquotas de 5 µL injetadas no ICER-BACE1.

Antes da análise de cada composto, foi realizado um controle positivo, que consistiu na avaliação da atividade enzimática sem o composto candidato a inibidor, constituído de: 15 µL da solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}, pH 4,5), 25 µL da solução de JMV2236 (0,1 µmol.L^{-1}), e 10 µL do solvente de solubilização dos compostos (DMSO).

Também foi realizado um controle negativo, que consiste da avaliação de um branco de cada composto sem a presença do substrato da enzima, sendo: 15 µL da solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}, pH 4,5), 10 µL da solução do composto, e 25 µL do solvente de solubilização do substrato (DMSO).

Os percentuais de inibição foram calculados de acordo com a equação I.1.

I.2.11.2 Determinação da IC_{50}

O ensaio de IC_{50} foi realizado para os compostos **PDJ26** e **PDJ28**. As soluções para a obtenção da curva de IC_{50} foram preparadas a partir da diluição da solução estoque de 0,250 mmol.L^{-1} em concentrações crescentes no intervalo de 5-100 µmol.L^{-1}. As soluções foram preparadas a partir da adição de: 10 µL de cada solução estoque dos compostos **PDJ26** e **28** (0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,25; 0,4; 0,5 µmol.L^{-1}), 25 µL da solução de JMV2236 (0,1 mmol.L^{-1}) para cada concentração acima e volume completado para 50 µL com 15 µL da solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1}, pH 4,5). As soluções foram preparadas em duplicatas e alíquotas de 5 µL foram injetadas no ICER-BACE1.

O controle positivo consistiu de 15 µL da solução de acetato de amônio (2 mmol.L^{-1} pH 4,5), 25 µL da solução de JMV2236, e 10 µL do solvente de solubilização dos compostos (DMSO).

Os percentuais de inibição foram calculados de acordo com a equação I.1, as curvas de inibição construídas pela % de inibição versus a concentração de inibidor. Os

parâmetros de regressão não linear foram calculados e o valor de IC_{50} extrapolado empregando o programa Sigma Plot 11.0 (SPSS, Inc.).

I.2.11.3 Mecanismo de inibição e K_i

O tipo de mecanismo de ação e o valor da constante K_i foram determinados para os compostos **PDJ26** e **PDJ28** contra o ICER-BACE1. Para este ensaio, foram construídas uma curva controle (ausência do composto candidato) e três curvas na presença de cada composto candidato.

A curva controle foi construída com soluções de substrato JMV2236 em quatro diferentes concentrações: 4,5; 9,0; 17; e 25 µmol.L^{-1} (valores selecionados em função do valor do K_{Map} do ICER-BACE1).

As curvas na presença do inibidor foram constituídas de; soluções de **PDJ26** nas concentrações de 9; 34; e 50 µmol.L^{-1} e **PDJ28** nas concentrações de 3; 10; e 20 µmol.L^{-1} (valores selecionados de acordo com o IC_{50} obtido para cada composto). Preparadas a partir de: 10 µL de cada solução estoque do composto **PDJ26** (45; 175; e 250 µmol.L^{-1}) e **PDJ28** (15; 50; e 100 µmol.L^{-1}), 25 µL da solução de JMV2236 (9; 18; 34; e 50 µmol.L^{-1}), volume completado para 50 µL com 15 µL da solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}, pH 4,5. As soluções foram preparadas em duplicatas e alíquotas de 5 µL foram injetadas no ICER-BACE1.

Gráficos de duplo recíprocos foram plotados, 1/[substrato] vs 1/área do produto para verificar o tipo de mecanismo de ação de cada composto e os valores de K_i obtidos pelo *replot* dos gráficos de duplo recíproco. Os dados foram ajustados segundo a equação I.2 que descreve o mecanismo de inibição do tipo mista [104].

$$\frac{v}{V_{Max}} = \frac{[S]}{Ks\left(1+\frac{[I]}{Ki}\right) + [S]\left(1+\frac{[I]}{\alpha Ki}\right)} \qquad \text{Equação (I.2)}$$

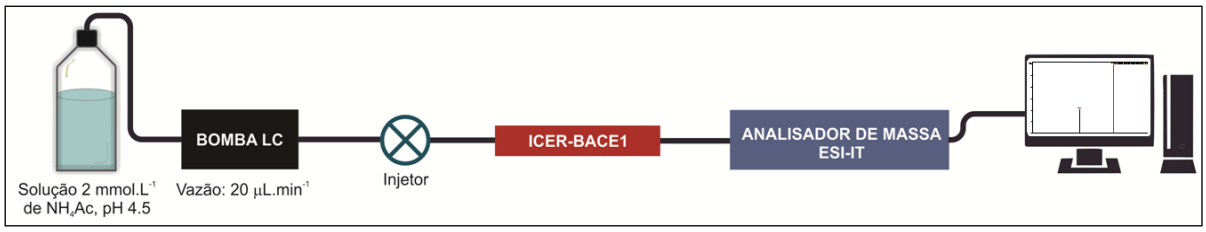
I.3 Resultados e discussão parte I

O sistema CLAE-EM utilizado para o desenvolvimento do método ICER-BACE1 foi configurado como demonstrado no esquema I.1.

A enzima BACE1 catalisa a proteólise de substratos peptídicos clivando a ligação peptídica entre os resíduos de leucina e ácido aspártico promovendo a liberação de dois fragmentos peptídicos e uma molécula de água. Assim sendo, após a clivagem da

BACE1 os fragmentos gerados foram monitorados diretamente por EM através da razão massa/carga (*m/z*).

Esquema I.1. Ilustração do sistema CLAE-EM utilizado para o monitoramento do ICER-BACE1.



I.3.1 Imobilização da BACE1

O método de imobilização por ligação covalente e o suporte capilar de sílica fundida, selecionados neste trabalho, se deu com base no sucesso alcançado em trabalhos anteriores desenvolvidos com as enzimas GAPDH, AChE, e BChE [44, 45, 55, 107] e também na proposta de utilizar métodos de triagem *on-line* acoplados diretamente a sistemas de CLAE-EM [42, 108].

O método por ligação covalente com o auxílio do glutaraldeído envolve a imobilização da enzima no suporte pelos grupamentos amino dos resíduos de aminoácidos presentes em sua estrutura e/ou a extremidade N-terminal da estrutura da enzima. Este método impede o fenômeno da dessorção da enzima devido à natureza forte da ligação possibilitando o aumento da estabilidade térmica e operacional da enzima [22].

O capilar de sílica fundida empregado como suporte possui características químicas e físicas que garantem vantagens como; minimização de interações secundárias, resistência à força mecânica, e menor transferência de massa quando comparado a suportes microparticulados [8].

O procedimento de imobilização adotado neste trabalho envolveu algumas modificações com relação aos protocolos anteriores sendo; o aumento do numero de percolações da enzima no suporte ou reciclos da solução enzimática através do capilar durante a imobilização (realizado 10 vezes) bem como redução no fluxo da bomba seringa de 130 µL.min^{-1} para 5 µL.min^{-1}, a fim de se obter a ligação de uma maior quantidade de enzima ao suporte. Salientando também que, com o estudo do efeito do

pH das soluções utilizadas durante o procedimento experimental foi possível selecionar a melhor condição de imobilização para a BACE1.

I.3.1.1 Procedimento de imobilização

Na primeira etapa o capilar sofreu um pré-tratamento corrosivo com HCl a fim proporcionar a limpeza e ativação da sílica liberando grupos silanóis presentes na superfície interna do capilar. Posteriormente, foi realizado um tratamento químico com o APTES, nesta etapa ocorre a silanização, uma reação de substituição nucleofílica entre os grupos silanóis ativados presentes na parede do capilar de silíca e o APTES, proporcionando ao suporte grupos amino.

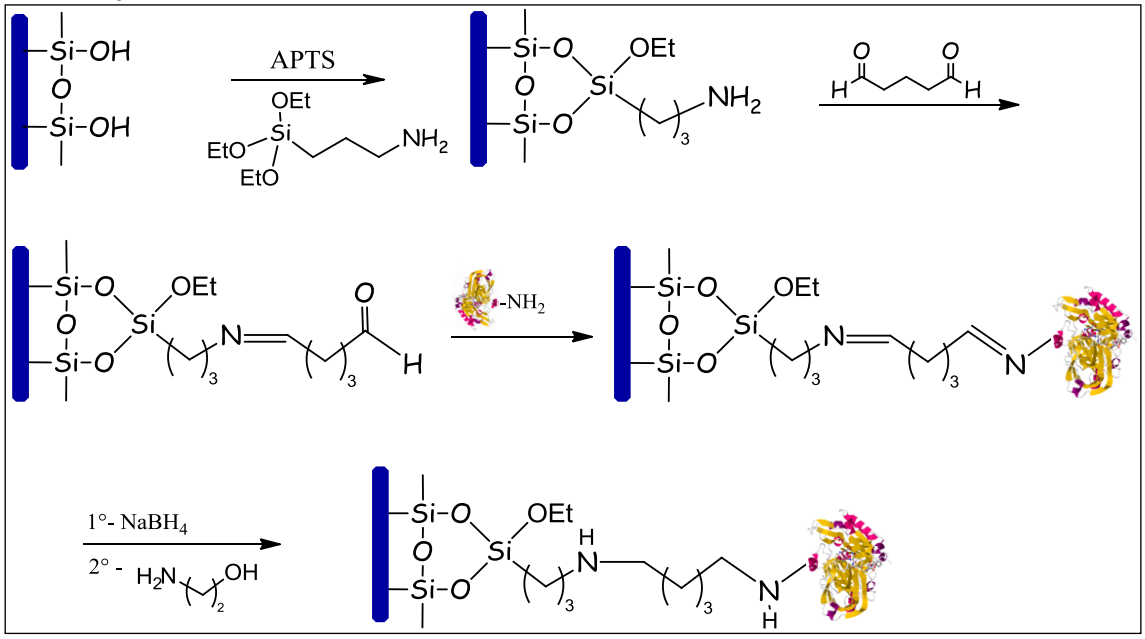
Na segunda etapa ocorre a ligação da enzima nas paredes internas do capilar. Primeiramente ocorre a formação de uma imina entre a extremidade amino-suporte e aldeído (CHO) oriundo do glutaraldeído.

O glutaraldeído é um agente de ligação muito reativo [26] com alta capacidade de polimerização em solução aquosa, então, após a sua percolação eluiu-se imediatamente uma solução de fosfato de potássio (50 $mmol.L^{-1}$) na tentativa de evitar a polimerização do mesmo. Em seguida a enzima foi imobilizada no suporte através do(s) grupo(s) amino presentes nos resíduos de aminoácidos que compõem a estrutura da enzima e a outra extremidade CHO-glutaraldeído formando outra imina. Esquema I.2.

As iminas foram reduzidas a fim de promover uma maior mobilidade conformacional para a enzima dentro do capilar.

O esquema I.2 ilustra as reações do processo de imobilização realizado.

Esquema I.2. Representação ilustrativa das reações químicas envolvidas no processo de imobilização da BACE1 adotado.



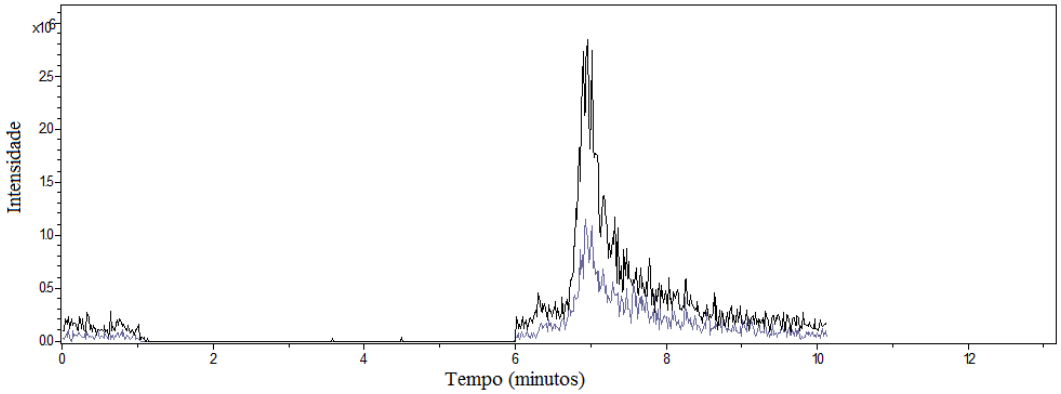
I.3.1.3 Efeito do pH das soluções durante o procedimento de imobilização

O pH é um fator crucial durante a imobilização de enzimas na presença do agente de ligação glutaraldeído [26]. Assim, dependendo do pH da solução, este apresenta distintos mecanismos de reação, por exemplo; sob condições ácidas e/ou neutras, os grupos aldeídos do glutaraldeído reagem com a enzima formando bases de Schiff, e/ou via formas hemiacetais cíclicos monoméricos ou multiméricos. Já sob condições alcalinas, o mecanismo ocorre via condensação aldólica e também por formação de bases de Schiff. Neste caso, a estabilidade é baixa, pois favorece a polimerização [25, 26]. Neste contexto, a natureza química do mecanismo de reação do glutaraldeído não é totalmente clara sendo, portanto, possíveis vários mecanismos para a ligação química dependendo da condição em que a reação é realizada.

Deste ponto de vista e com o finalidade da obtenção de um método com a BACE1 imobilizada que apresente atividade e estabilidade, os estudos da influência do pH das soluções utilizadas durante o processo de imobilização foram realizados.

Os resultados para o estudo envolvendo a alteração do pH das soluções de percolação pelo capilar mostraram que sob condições ácidas (pH 6,0) ocorreu maior atividade da enzima imobilizada quando comparada com sua atividade em pH 7,4, figura I.1. Sendo o pH 6,0 selecionado para o preparo das soluções envolvendo a imobilização da BACE1.

Figura I.1. ICER-BACE1 imobilizada sob duas diferentes condições de pH: ___ pH 6,0 e ___ pH 7,4. Cromatograma de íons extraídos referente a injeção de 5 µL JMV2236 50 µmol.L^{-1} no sistema CLAE-EM com o ICER-BACE1 monitorando o produto de hidrólise enzimática $[M+H]^+$ 464*m/z*. Condições: 0,02 mL.min^{-1}, fase móvel: solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}.



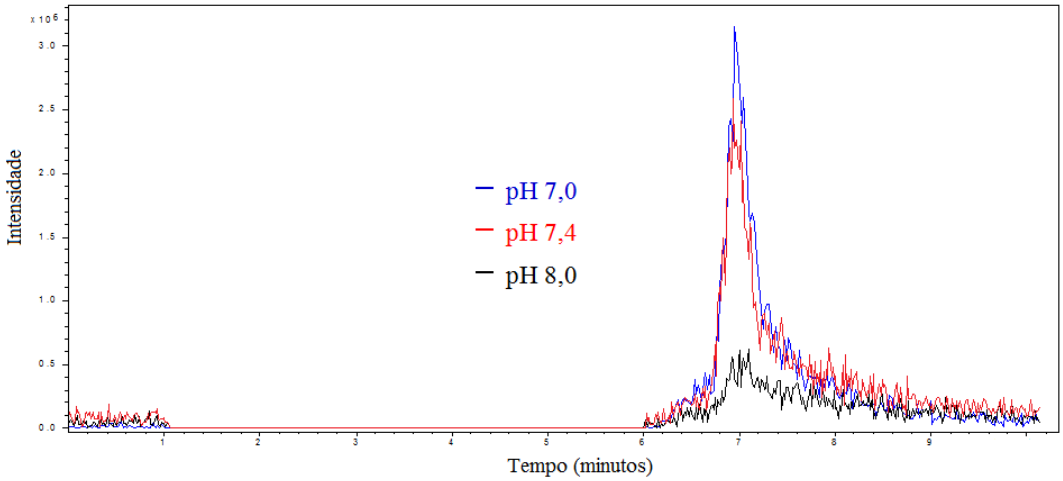
Fonte: adaptado de [46].

Para os estudos realizados com variações no pH da solução de diluição da BACE1 (destacando que as soluções de percolação foram mantidas em pH 6,0), figura I.2, evidenciaram que em pH 7,0 e 7,4 foram os melhores valores para diluição da BACE1 de acordo com a atividade enzimática obtida. E em pH 8,0 demonstrou ser o pior resultado nas condições utilizadas.

Cabe destacar que nesta faixa de pH avaliada o grupo amino da extremidade N-terminal da enzima está disponível para a reação, valor pKa para o grupo amino N-terminal na faixa de 7-9 [109]. Assim podemos concluir que o fator determinante para a imobilização da BACE1 foi a combinação dos efeitos do pH envolvendo as soluções aquosas com glutaraldeído e a reatividade dos grupos amino dos resíduos de aminoácidos da superfície da enzima.

Com estes resultados as condições finais de pH para a imobilização da BACE1 foram: diluição da enzima em solução a pH 7,0 e demais soluções para eluição no capilar em pH 6,0.

Figura I.2. Diluição da BACE1 para imobilização sob diferentes condições de pH. ___ pH 7,0; ___ pH 7,4; e ___ pH 8,0. Cromatogramas de íons extraídos (EIC) referente a injeção de 5µL JMV2236 50 µmol.L^{-1} no sistema CLAE-EM com o ICER-BACE1 monitorando o produto de hidrólise enzimática [M+H]$^{+}$ 464*m/z*. Condições: 0,02 mL min^{-1}, fase móvel: tampão acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}.



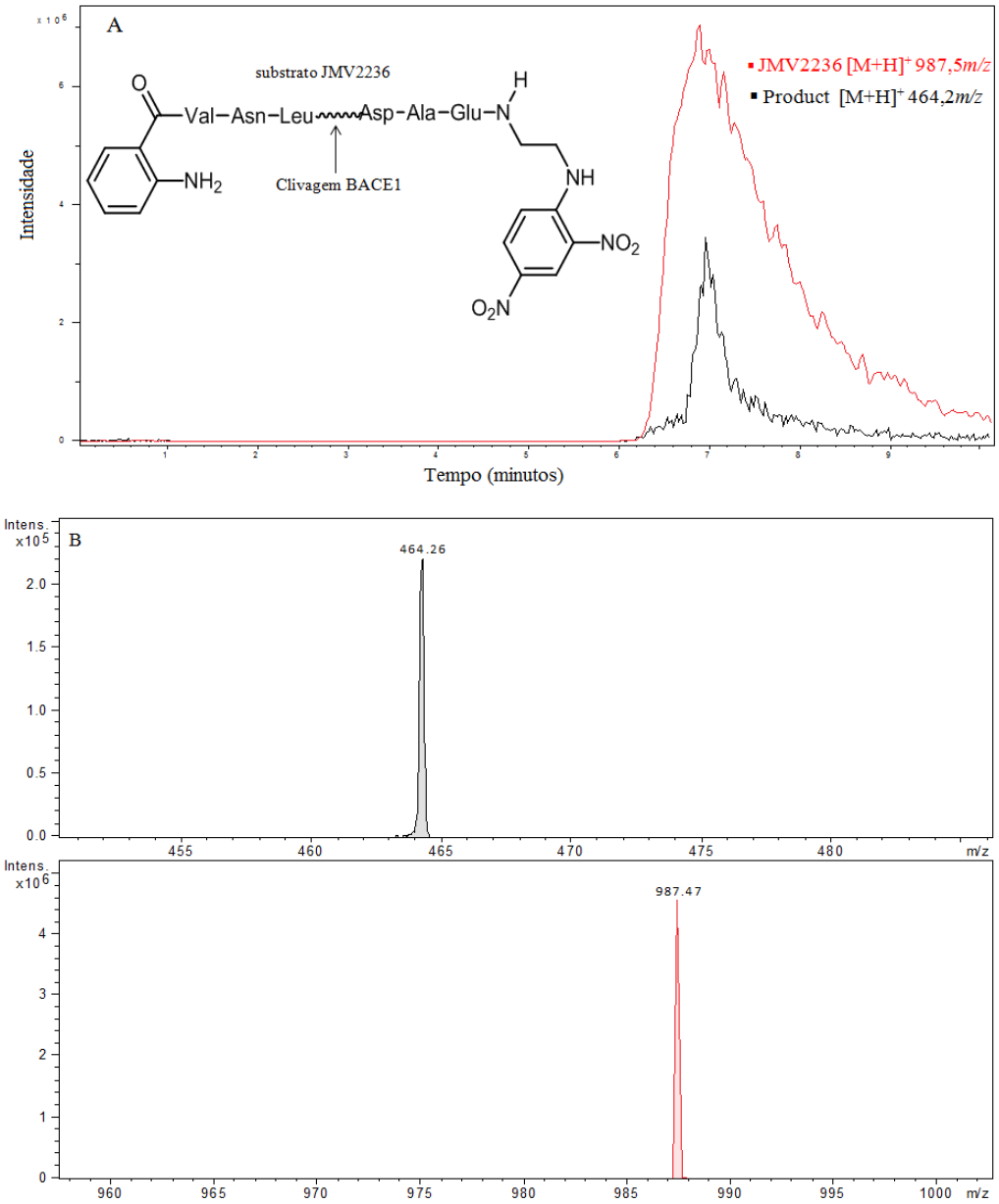
Fonte: Vilela, A. F. L. 2017.

I.3.2 Determinação da atividade do ICER-BACE1

Após a imobilização o ICER-BACE1 [46] obtido foi conectado ao sistema CLAE-EM, como ilustrado no esquema I.1. e, após a injeção de 5 µL do substrato peptídico JMV2236 (50 µmol.L^{-1}), observou-se a formação do produto de hidrólise enzimática, o fragmento peptídico com [M+H]$^{+}$ 464,26 *m/z*.

O fragmento de hidrólise enzimática produzido pelo ICER-BACE1 foi mensurado pela integração da área do pico de massa, a figura I.3 ilustra o cromatograma de íons extraídos (EIC) com o respectivo espectro de massa obtidos

Figura I.3. Cromatograma de íons extraídos (A) e espectro de massas (B) referente a injeção de 5 µL JMV2236 50 µmol.L^{-1} no sistema CLAE-EM com o ICER-BACE1 monitorando o produto de hidrólise enzimática [M+H]$^{+}$ 464 *m/z*. Condições: 0,02 mL.min^{-1}, fase móvel: solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}.



Fonte: adaptado de [46].

I.3.3 Estudo das condições de acoplamento ICER-BACE1-EM

Os estudos das condições ideais para o ICER-BACE1 conectado ao sistema CLAE-EM levaram em consideração a obtenção de uma melhor atividade para enzima imobilizada, abrangendo todos os fatores que afetam a atividade catalítica da mesma, entre os quais; pH, temperatura e tempo de contato do substrato, bem como a influência

destes parâmetros na detecção da massa do produto, uma vez que este envolve um EM com analisador do tipo IT e fonte de ionização ESI.

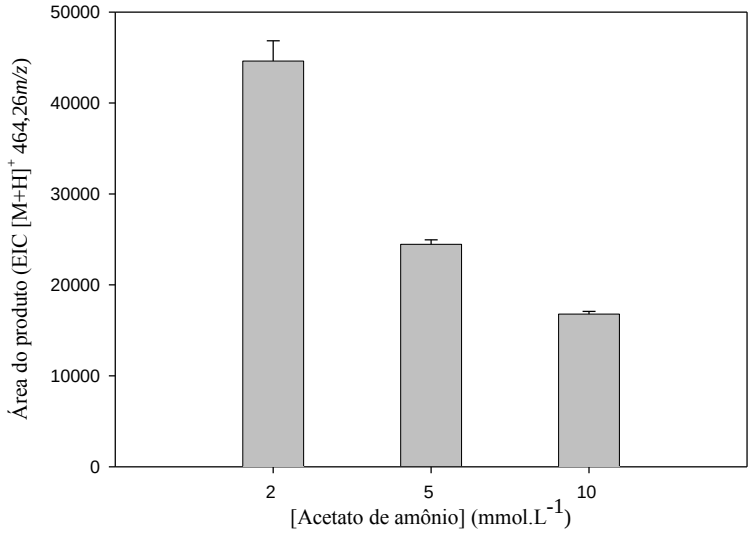
I.3.3.1 Variação da concentração e pH da fase móvel

Em sistemas CLAE-EM com interface ESI é muito importante conhecer as propriedades físico-químicas da fase móvel a ser utilizada, uma vez que esta influencia no processo de ionização. Normalmente a fase móvel é composta por água e modificador orgânico, e, de acordo com a necessidade da separação e/ ou afinidade, se utiliza fase móvel composta por soluções tampão, e neste caso, deve ser utilizado soluções de tampão voláteis. Caso contrário pode ocasionar supressão da ionização e/ou contaminação na fonte de ionização. [110].

Em alguns trabalhos citados para a enzima BACE1 [50, 97] utiliza-se o tampão acetato de sódio pH 4,5. Sendo assim, utilizou-se a solução de acetato de amônio, que é volátil e recomendado para uso em MS, e o pH de melhor atividade enzimática para a BACE1, pH 4,5. O recomendado para EM é a utilização de sais na concentração de no máximo 10 mmol.L^{-1}. Assim, foi realizado o estudo da concentração da solução de acetato de amônio pH 4,5. Os resultados estão ilustrados na Figura I.4.

Como bem observado, a menor concentração propiciou uma melhor ionização do produto da reação enzimática.

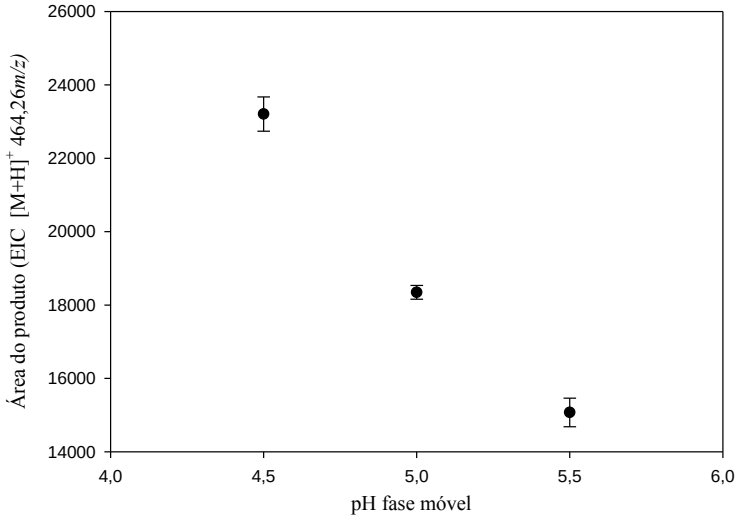
Figura I.4. Atividade do ICER-BACE1 com a variação da concentração da fase móvel. Condições: solução de acetato de amônio, pH 4,5, a 0,02 mL.min^{-1}, injeção de 10 µL de JMV2236 50 µmol.L^{-1}.



Fonte: adaptado de [46].

As enzimas apresentam dependência do pH para exercer a sua função catalítica. Um valor de pH ótimo é aquele em que a enzima está em sua conformação ideal para desempenhar seu papel catalítico. Como a BACE1 possui grupos ácidos em seu sítio catalítico, em pH ácido ela terá maior atividade [64]. Como bem mostrado na figura I.5, dentro da faixa de pH avaliada, o valor de pH 4,5 se mostrou mais eficiente para a atividade catalítica do ICER-BACE1. Com isto, selecionamos o valor de pH 4,5 para a fase móvel das análises com a BACE1.

Figura I.5. Atividade do ICER-BACE1 com a variação do pH da fase móvel. Condições: solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}, a 0,02 mL.min^{-1}, injeção de 10 µL de JMV2236 50 µmol.L^{-1}.

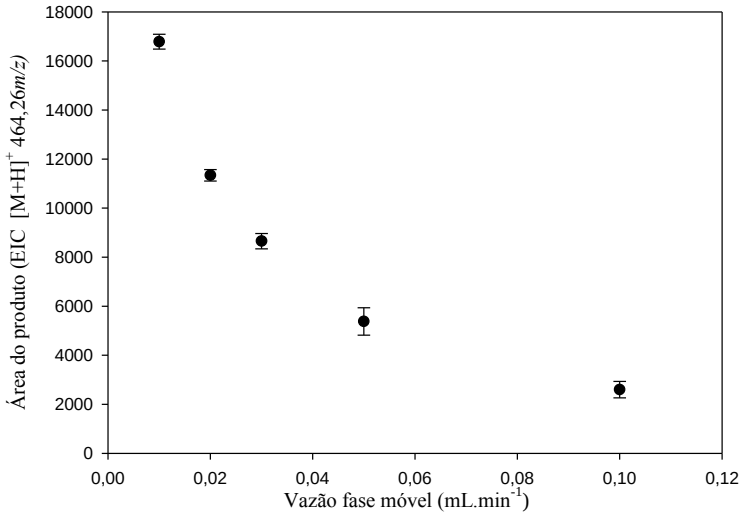


Fonte: adaptado de [46].

I.3.3.2 Influência da vazão e tempo de reação

Uma reação catalisada por enzima depende do tempo de contato entre a enzima e o substrato. Considerando que o método desenvolvido é realizado em fluxo, a vazão é um parâmetro muito importante a ser avaliado. Os resultados mostraram maior atividade em menores valores de vazões, evidenciando que quanto maior o tempo de contato entre substrato e enzima mais produto foi formado. Embora com vazão de 0,01 mL.min^{-1} maior concentração de produto foi obtido, o tempo de análise torna-se também maior. Assim, observa-se que utilizando uma vazão de 0,02 mL.min^{-1} temos a formação de produto em quantidade mensurável e um tempo de análise que foi considerado mais adequado para ensaios de triagem rápida, figura I.6.

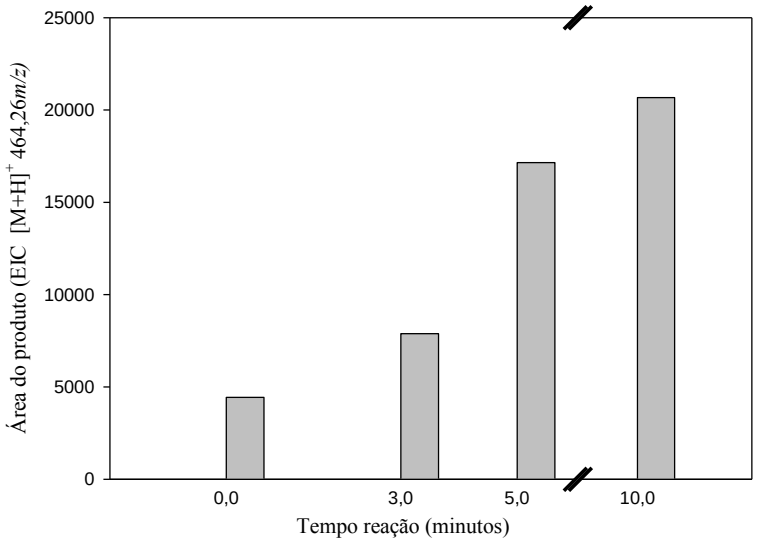
Figura I.6. Atividade do ICER-BACE1 com a variação do fluxo da fase móvel. Condições: solução de acetato de amônio 10 mmol.L^{-1}, pH 4,5, injeção de 10 µL de JMV2236 50 µmol.L^{-1}.



Fonte: adaptado de [46].

Também, o aumento do tempo de contato do substrato com a enzima no sistema proposto foi realizado por meio de paradas do fluxo da fase móvel após a injeção do substrato em três tempos diferentes. Figura I.7.

Figura I.7. Atividade do ICER-BACE1 com a variação do tempo de reação. Condições: solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}, pH 4,5, a 0,02 mL.min^{-1}, injeção de 5 µL de JMV2236 50 µmol.L^{-1}.



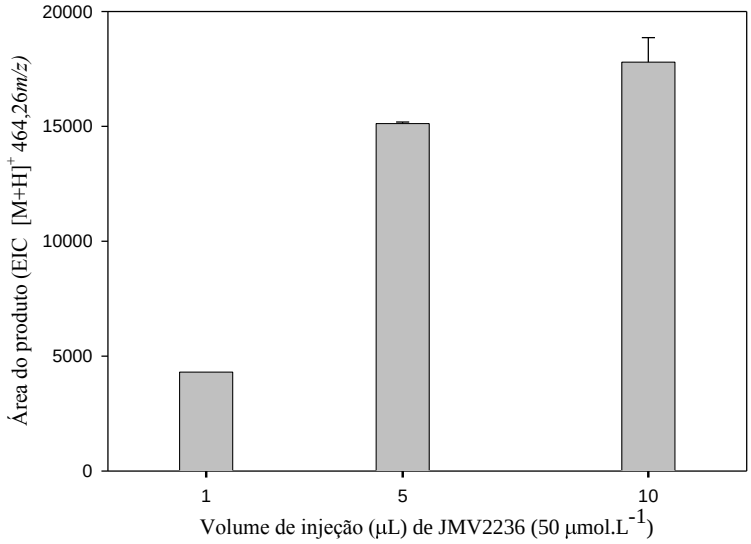
Fonte: adaptado de [46].

Observou-se que com a interrupção do fluxo por 5 minutos houve uma melhora significativa com relação ao tempo zero. Correlacionando-se os tempos de 5 e 10 minutos os resultados foram similares, sendo o tempo de 5 minutos considerado adequado para que a reação enzimática seja monitorada de maneira precisa.

I.3.3.3 Variação volume de injeção de substrato

O volume de injeção também é um dos fatores que pode afetar a ionização na fonte ESI. Um volume menor garante uma melhor ionização dos analitos uma vez que a quantidade de sais presentes na amostra que são inseridos no equipamento é menor. A figura I.8 ilustra o resultado indicando que não há um aumento significativo da atividade entre os volumes de injeção de 5 e 10 µL. Assim, o volume de 5 µL foi selecionado como volume de injeção do substrato no ICER-BACE1.

Figura I.8. Atividade do ICER-BACE1 com a variação do volume de injeção de substrato. Condições: solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}, pH 4,5, a 0,02 mL.min^{-1}.

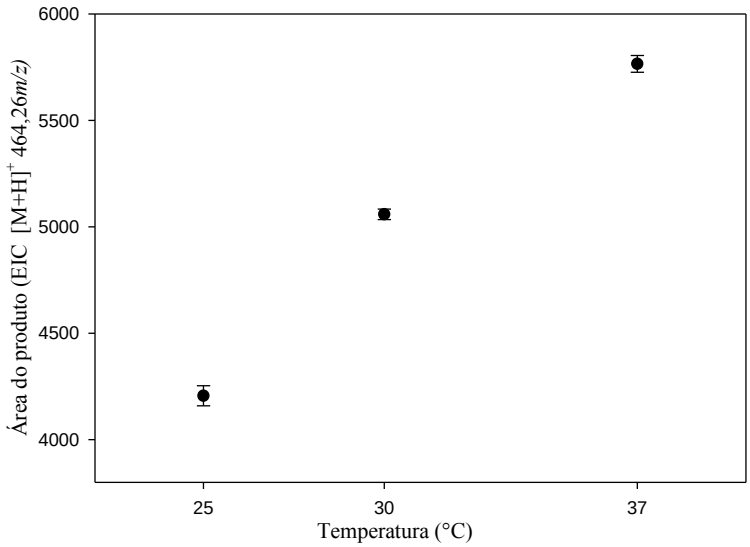


Fonte: adaptado de [46].

I.3.3.4 Temperatura

Por fim, a temperatura ideal para o ensaio com o ICER-BACE1 foi de 37°C. Figura I.9.

Figura I.9. Atividade do ICER-BACE1 com a variação da temperatura. Condições: solução de acetato de amônio 2 mmol.L^{-1}, pH 4,5, a 0,02 mL.min^{-1}, injeção de 5 µL de JMV2236 50 µmol.L^{-1}.



Fonte: adaptado de [46].

Em suma, as melhores condições avaliadas para o ensaio envolvendo o ICER-BACE1-EM estão descritas na tabela I.1.

Tabela I.1. Melhores condições para o ensaio com ICER-BACE1.

Condições CLAE-EM para o ensaio com o ICER-BACE1						
Substrato	**Temperatura**	**Fase móvel**				
JMV2236 50 µmol.L^{-1}	37 °C	***Composição***	***Concentração***	***pH***	***Vazão***	***Tempo de parada da vazão***
		Solução de acetato de amônio	2 mmol.L^{-1}	4,5	0,02 mL.min^{-1}	5 minutos

Fonte: adaptado de [46].

O método de imobilização e o sistema por CLAE-EM desenvolvido nesse trabalho, inédito para a BACE1, se mostraram eficientes, possibilitando o monitoramento do produto da reação sem a presença de resultados falso-positivos.

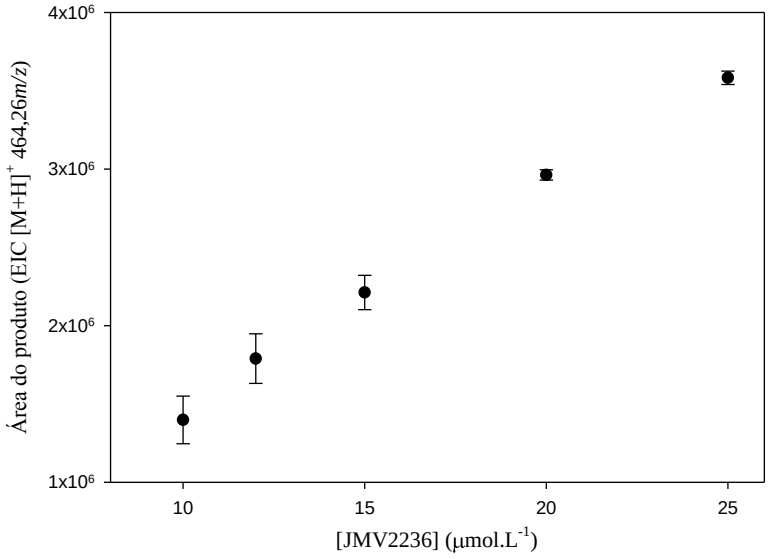
I.3.4 Validação do ICER-BACE1

A validação do ICER-BACE1 foi realizada segundo os parâmetros preconizados pelas normas para métodos bioanalíticos [111, 112].

Para este estudo, o substrato JMV2236 foi injetado no ICER-BACE1 ativo, e o produto de clivagem enzimática $[M+H]^+$ 464,26*m/z* monitorado.

A curva de calibração obtida do produto de $[M+H]^+$ 464,26*m/z* apresentou-se linear na faixa de concentração de JMV2236 injetada (10-25 µmol.L^{-1}), (n = 3) (R^2 = 0,998), figura I.10.

Figura I.10. Curva de calibração para o produto de hidrólise enzimática $[M+H]^+$ 464,26*m/z*.



A precisão intra-dia foi expressa como o coeficiente de variação (CV%) e os valores variaram de 5,4 to 13,6%. Para a exatidão, valores se encontram entre 94,2 e 103%, tabela I.2. O CV para as repetições (n = 5) foi inferior a 15%, e a precisão dentro do desvio foi inferior a 15% da concentração nominal. A seletividade do método foi garantida pelas análises do branco após cada sequência de análise. Estas injeções não evidenciaram qualquer interferência, o que demonstrou que nenhum *carry over* ocorreu entre as análises.

Tabela I.2. Precisão intra - dia (n = 5) e exatidão do método de análise para o produto formado através da injeção de substrato no ICER-BACE1.

[JMV2236] ($\mu mol.L^{-1}$)	*1º dia*		*2º dia*		*3º dia*		*Média dos três dias*	
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)
12	11,19	104,0	14,59	111,2	15,00	90,1	13,6	101,7
17	14,54	82,9	10,12	105,7	4,42	94,1	10,0	94,2
22	4,34	98,4	6,81	110,5	5,07	100,4	5,4	103,1

O limite inferior de quantificação (LIQ) consistiu da avaliação de 10 $\mu mol.L^{-1}$ de JMV2236 (CV = 9,2%, n = 3, exatidão = 100,6%); e o limite de detecção (LD) foi de 5,0 $\mu mol.L^{-1}$ de JMV2236, calculado pela relação sinal/ruído $\geq$ 3.

Devido ao fato de substratos fluorogênicos sofrerem facilmente autólise, o substrato JMV2236 utilizado no desenvolvimento do ICER-BACE1 foi submetido à hidrólise espontânea. Os cromatogramas de íons extraídos para 987,5*m/z* (massa substrato) apresentaram um (CV% = 9,2, n = 11) indicando que a hidrólise espontânea produzida está dentro da faixa de variação esperada (valor de referencia CV $\leq$ a 15% do valor nominal).

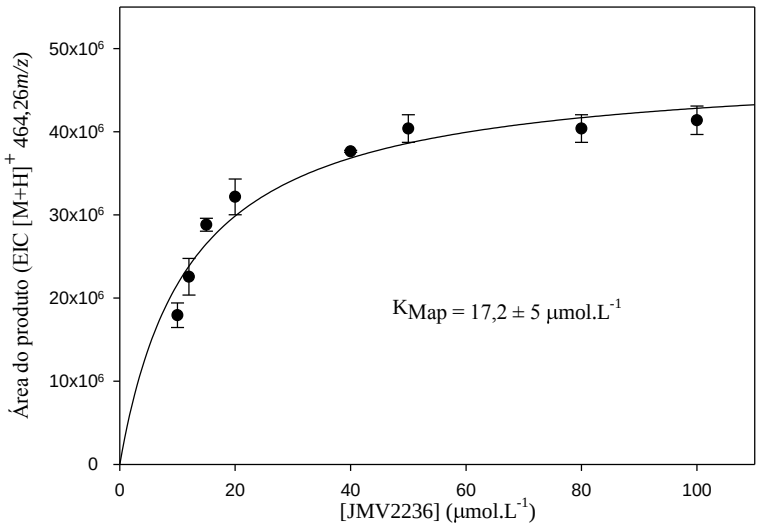
Portanto, os estudos de validação confirmaram que o método ICER-BACE1 é reprodutível e sensível.

I.3.5 Parametro cinético K_{Map}

Nesse trabalho foi importante avaliar o parâmetro cinético K_{Map} devido as possíveis modificações sofridas pela biomolécula após a imobilização, e também para se determinar a concentração de substrato que seria utilizada para os ensaios de inibidores, de modo a garantir a saturação da enzima com o substrato, de acordo com a equação 1 para enzimas Michaelianas.

Pela curva obtida, figura I.11, observa-se que o perfil da hipérbole está de acordo com a equação 1 de velocidade descrita por Michaelis-Menten, corroborando o perfil Michaeliano descrito para a enzima BACE1 [97].

Figura I.11. Hipérbole de Michaelis para o ICER-BACE1. Condições: vide tabela I.1.



Fonte: adaptado de [46].

O valor de K_{Map} foi de 17,2 ± 5 μmol.L^{-1}, em escala micro-molar, demosntrando que a imobilização não afetou significativamente a estrutura e/ou conformação da enzima e/ou a acessibilidade do substrato ao sítio ativo. O resultado obtido está na mesma ordem de escala se comparado com a literatura para o ensaio com a BACE1 em solução reportado em Ermolieff *et al.* [113].

A partir deste estudo, os ensaios com inibidores foram realizados com JMV2236 a 50 μmol.L^{-1} um valor correspondente a 3 vezes o K_{Map}.

I.3.6 Estudos de inibição

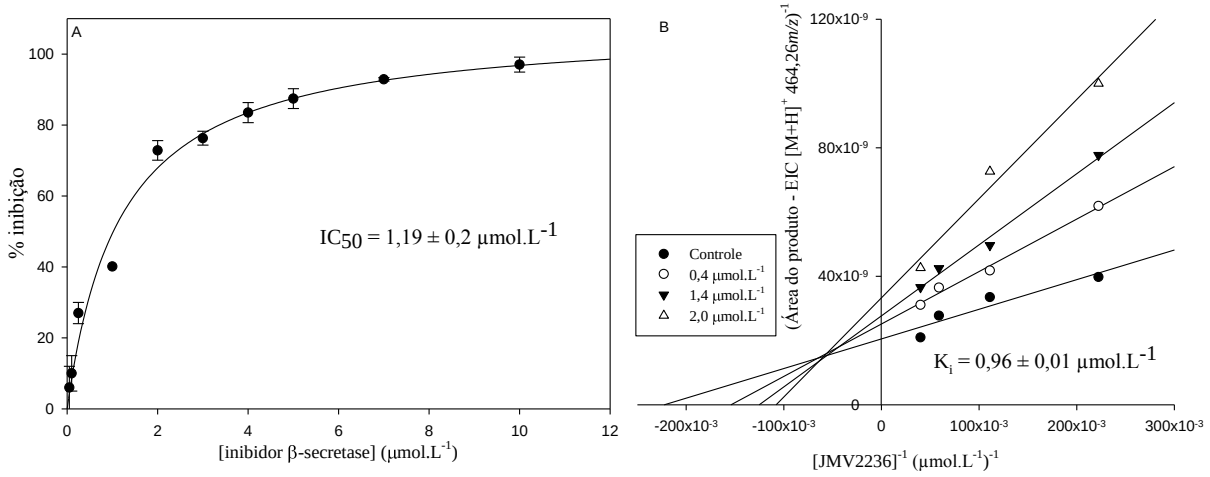
Para validar o método ICER-BACE1 para a triagem de ligantes, foi utilizado o inibidor de β-secretase [106], um inibidor referencia de proteases aspárticas. O inibidor de β-secretase é um substrato substituído análogo à estatina - ([estatina] VAEF KTEEISEVN; Lys-Thr-Glu-Glu-Ile-Ser-Glu-Val-Asn- [estatina] -Val-Ala-Glu-Phe-OH) -. Sua potência inibitória depende de um resíduo de hidroxila não modificado disposto na configuração adequada.

I.3.6.1 Validação com inibidor padrão

O valor de IC_{50} obtido foi de 1,19 ± 0,2 μmol.L^{-1} (Figura I.12A), demonstrando que o método de ICER-BACE1 foi capaz de identificar o inibidor de referência, como previamente relatado para este inibidor [106, 114].

O mecanismo de ação para o inibidor de β-secretase no ICER-BACE1 revelou um mecanismo de tipo misto, sendo o valor da constante de inibição K_i = 0,96 ± 0,01 μmol.L^{-1} (Figura I.12B). No caso da inibição de tipo misto, tanto a velocidade máxima ($V_{Máx}$) quanto os valores de K_{Map} mudam porque o inibidor pode impedir a catálise, mesmo que o substrato esteja ligado à enzima [104].

Figura I.12. A) Curva de potência inibitória. **B)** duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o inibidor de β-secretase.



Fonte: adaptado de [46].

A determinação do mecanismo de inibição para esse inibidor foi um trabalho inédito, uma vez que até o presente momento não havia qualquer relato de estudos de mecanismo de ação para este inibidor padrão.

O ICER-BACE1 desenvolvido provou eficiência na avaliação dos parâmetros quantitativos de inibição, e portanto, foi aplicado na seleção de novos ligantes para a BACE1 [46].

I.3.7 Aplicação do ICER-BACE1

Com um método robusto e prático para triagem de ligantes de BACE, os trabalhos de colaboração com os grupos que estudam e sintetizam novos compostos com atividade inibitória para o mesmo alvo se tornam fundamentais para a aplicação e divulgação das ferramentas analíticas desenvolvidas dentro das linhas de pesquisa do GCBPN (Grupo de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais). A partir dessas colaborações, compostos desenvolvidos para serem inibidores foram triados utilizando-se o ICER-BACE1.

A triagem inicial foi realizada com um teste pontual dos compostos à concentração fixa de 50 μmol.L^{-1}. A partir desse resultado, os compostos que apresentaram inibição igual ou superior a 50% foram submetidos aos estudos de caracterização como, valor de IC_{50} e mecanismo de inibição. Desta coleção de compostos dois foram selecionados para caracterização, o **PDJ26** e **PDJ28.** Os resultados obtidos foram compilados na tabela I.3 a seguir.

Tabela I.3. Porcentagem de atividade inibitória dos compostos a 50 μmol.L^{-1}, valores de IC_{50}, constante de inibição (K_i) e mecanismo de ação para os compostos **PDJ26** e **PDJ28** contra o ICER-BACE1.

Compostos	***ICER-BACE1***			
	% Inibição a 50 μmol.L^{-1}	**IC_{50} ± EPM (μmol.L^{-1})**	**K_i ± EPM (μmol.L^{-1})**	**Tipo de mecanismo**
Inibidor de β-secretase *	100	1,19 ± 0.2	0,96 ± 0.01	Misto
PDJ 15	10,8	ND	ND	ND
PDJ 16	0	ND	ND	ND
PDJ 17	18,1	ND	ND	ND
PDJ 26	51,3	34,9 ± 8	229,8 ± 20	Misto
PDJ 27	3,42	ND	ND	ND
PDJ 28	58,1	9,0 ± 2	27,32 ± 1	Misto
PDJ 29	0	ND	ND	ND
FCT01	23,7	ND	ND	ND

* Inibidor padrão de BACE1, EPM: erro padrão média; IC_{50}: concentração de composto requerida para obtenção de 50 % de inibição; K_i: constante de inibição. ND: não determinado.

As curvas de IC_{50} e gráficos de duplo-recíprocos (figuras I.13 e I.14) estão representados abaixo, e indicaram o mecanismo de inibição para os compostos **PDJ 26** e **28**. Os dois compostos apresentaram mecanismo de ação do tipo misto, o mesmo tipo apresentado para o inibidor padrão.

Figura I.13. A) Curva de potência inibitória. **B)** duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o composto **PDJ26**.

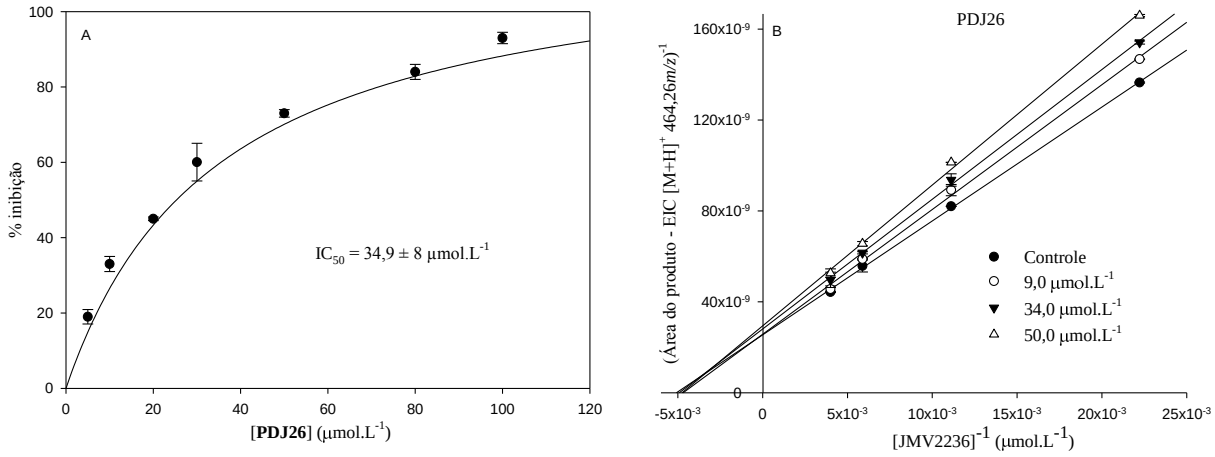
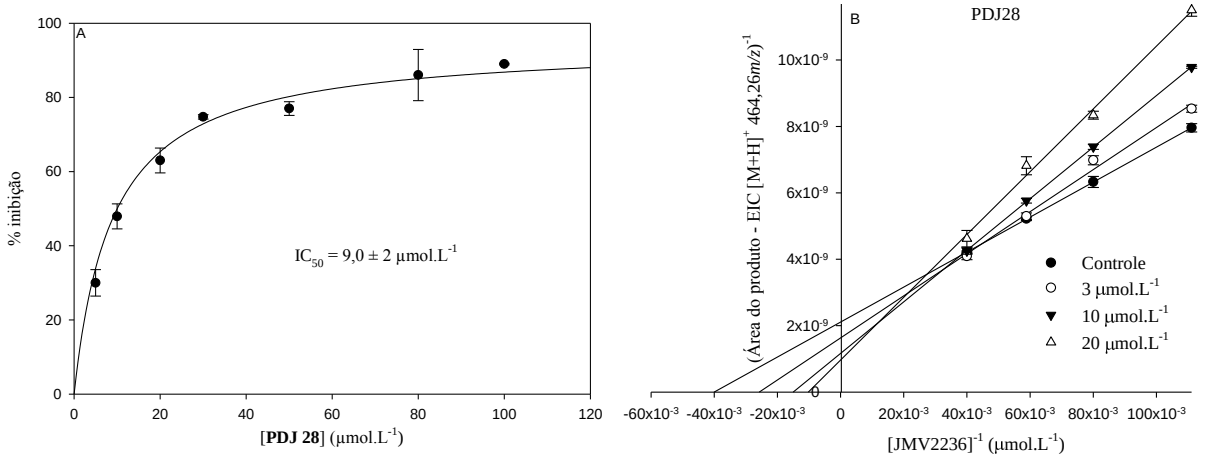


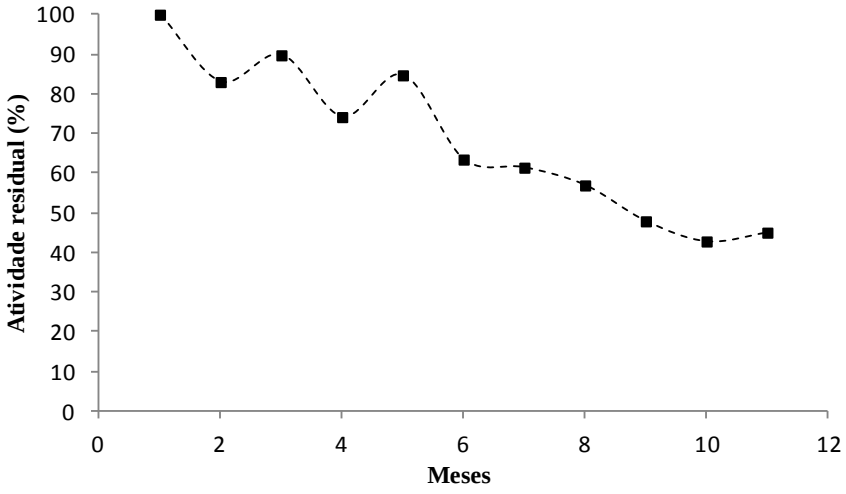
Figura I.14. A) Curva de potência inibitória. **B)** duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o composto **PDJ28**.



I.3.8 Reutilização

O estudo de estabilidade do ICER-BACE1 comprovou a eficácia do método desenvolvido, apresentando atividade por um período de 11 meses com manutenção de 43 % da sua atividade inicial, figura I.15. Enfatizando que nos primeiros 5 meses houve manutenção da atividade em torno de 85 % da inicial. Deste modo, o sistema pode ser reutilizado por um período equivalente a 11 meses.

Figura I.15. Tempo de uso para o ICER-BACE1.



I.4 Conclusão parte I

As conclusões relevantes desse trabalho são; o método de imobilização adotado para a enzima BACE1 por ligação covalente mostrou-se eficiente, possibilitando a reutilização da enzima por um período equivalente a onze meses. O ICER-BACE1 desenvolvido foi aplicado na triagem de ligantes demonstrando ser uma ferramenta valiosa para identificação e caracterização de novos candidatos a inibidores de BACE1.

Mais especificamente, o desenvolvimento do método *on-line* conectado ao sistema CLAE-EM utilizando o ICER-BACE1 como uma coluna de bioafinidade propiciou a medida direta do produto de hidrólise enzimática, sem falso-positivos; o uso do substrato JMV2236, evidenciou alta afinidade para o ICER-BACE1, o que se refletiu no valor de K_{Map} determinado; o ICER-BACE1 permaneceu ativo e com uma atividade enzimática estável ao longo de todo o desenvolvimento do método e aplicação, mostrando que método de imobilização selecionado promoveu aumento na estabilidade da enzima após o processo; e também, foi possível a avaliação do mecanismo de ação do inibidor padrão da BACE1, onde até o presente momento não havia qualquer relato de estudos de mecanismo de ação para este inibidor .

Assim sendo, o ensaio para triagem de ligantes desenvolvido aqui, une as propriedades catalíticas e específicas de uma enzima em um sistema de CLAE-EM, se mostrando específico, seletivo, sensível, reprodutível e automático (uma vez que se utiliza o auto-amostrador do sistema CLAE).

Parte II - Coimobilização das enzimas AChE recombinante humana (AChE*hu*) e BACE1 – método *on-line* para triagem de ligantes

II.1 Introdução

A co-imobilização da AChE*hu* e a BACE1 foi estudada baseada em estudos prévios envolvendo as enzimas imobilizadas individualmente em capilar de sílica fundida. Para a AChE como reportado em Vanzolini *et al*. (2013) [89], e para a BACE1 como descrito na parte I deste trabalho. [46]

A enzima AChE possui uma função importante na neurotransmissão colinérgica central e periférica através da degradação da acetilcolina, portanto, assim como a BACE1, a AChE possui papel crucial na etiologia da DA, e também tem sido explorada como um alvo terapêutico para a doença em estudos de desenvolvimento de fármacos que atuem como inibidores enzimáticos.

O objetivo aqui consistiu no desenvolvimento de um método *on-line* para triagem de ligantes com as duas enzimas co-imobilizadas em um mesmo suporte, criando um ambiente específico para a avaliação da afinidade de um ligante contra dois alvos imobilizados.

II.2 Procedimento experimental parte II

II.2.1 Materiais

A enzima acetilcolinesterase recombinante humana (AChE*hu*), expressa em células HEK 293, liofilizada (0,1 mg), ≥1,000 unidades/mg de proteína (lowry), ≥ 90 % SDS-PAGE, o substrato natural acetilcolina (ACh), e o inibidor padrão tacrina (hidrocloreto de 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

O substrato JMV2236, o inibidor de β-secretase, e os reagentes necessários para a imobilização estão descritos na parte I item I.2.1.

A instrumentação utilizada aqui também descrita na parte I item I.2.2.

II.2.2 Co-imobilização AChE*hu* e BACE1 em capilar de sílica fundida (ICER-AChE*hu*+BACE1)

As enzimas AChE*hu* e BACE1 foram co-imobilizadas em capilares de sílica fundida com dimensões de 100 cm x 0,375 mm x 100 μm d.i. pelo método de

imobilização por ligação covalente via glutaraldeído, como publicado em Vilela *et al.* (2017) [46]. Procedimento realizado em duas etapas.

1ª Pré-tratamento do capilar de sílica fundida

Realizado exatamente como descrito na parte I no item I.2.3.

2ª Co-imobilização AChEhu+BACE1

Após o pré-tratamento do capilar, 1,5 mL de solução glutaraldeído (1% em solução fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1}, pH 6,0) foi percolada pelo capilar a 130 µL.min^{-1}, e em seguida 2,0 mL da solução fosfato 50 mmol.L^{-1}, pH 6,0.

A partir desta etapa, a vazão da bomba seringa foi reduzida a 5 µL min^{-1}. Nesta etapa, um estudo de ordem de eluição das enzimas no capilar foi avaliado, sendo:

1) Primeiro a BACE1 seguida da AChE*hu*

0,5 mL da solução de BACE1 em solução fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1}, pH 7,4 (942,8 U.mL^{-1}) foi percolada pelo capilar, e, em seguida, 0,5 mL de solução de AChE*hu* em solução fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1}, pH 7,4 (16,66 U.mL^{-1}).

2) mistura de AChE*hu* + BACE1

1 mL de solução enzimática foi eluído pelo capilar contendo; 0,5 mL de BACE1 em solução fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1}, pH 7,4 (942,8 U.mL^{-1}) e 0,5 mL de solução de AChE*hu* em solução fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1}, pH 7,4 (16,66 U.mL^{-1}) por 5 vezes - reciclos da primeira eluição pelo capilar.

3) Primeiro a AChE*hu* seguido da BACE1

0,5 mL de solução de AChE*hu* em solução fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1}, pH 7,4 (16,66 U.mL^{-1}) foi eluída pelo capilar seguido de 0,5 mL da solução de BACE1 em solução fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1}, pH 7,4 (942,8 U.mL^{-1}).

Ao final de cada procedimento descrito acima foi percolada novamente uma solução de fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1}, pH 6,0.

II.2.3 Determinação das atividades enzimáticas no ICER-AChE*hu*+BACE1

O ICER-AChE*hu*+ BACE1, foi conectado ao sistema CLAE como uma coluna de bioafinidade e este diretamente ao EM. Instrumentação descrita na parte I.2.2.

A determinação da atividade para ambas as enzimas foi avaliada em série, primeiramente injeção de substrato para uma enzima e depois para a outra, utilizando a mesma fase móvel. Condições cromatográficas e de EM para ambas as enzimas descritas na tabela II.1.

Tabela II.1. Condições para determinação da atividade para o ICER- AChE*hu*+BACE1.

Condições CLAE-EM para o ensaio		
	AChE*hu*	**BACE1**
Substrato	ACh	JMV2236
Fase móvel	Bomba A: Solução de acetato de amônio, 15 mmol.L^{-1} pH 4,5 Bomba B: metanol 100%	
Temperatura	37°C	
Vazão	0.02 mL.min^{-1}	
Volume injeção	10 µL	
Detecção-MS*	$[M+H]^+$ 103,95*m/z*	$[M+H]^+$ 464,26 *m/z* $[M+H]^+$ 541,20 *m/z*
Tempo reação (stop flow)	0 minutos	5 minutos
Tempo de análise	5 minutos	10 minutos

* erro ± 0,5 para as massas detectadas

Os parâmetros para o EM consistiram em: fonte ESI, voltagem no capilar - 4000 V; end plate offset – 500V ; pressão do gás de nebulização (N_2)- 18 psi; vazão do gás de secagem (N_2)- 6,0 L.min^{-1}; temperatura da fonte de ionização- 275 °C. Analisador (IT), modo positivo (*full scan* de 40-500*m/z*) *xtreme scan* para a AChE*hu*, e (*full scan* de 300-1000*m/z*) *enhanced resolution* para a BACE. Modo; SIM (*Single Ion-Monitoring*).

As soluções estoque dos substratos ACh (em MeOH) e JMV2236 (em DMSO), inibidores tacrina (em MeOH) e inibidor de β-secretase (em DMSO) foram de 1 mmol.L^{-1}.

O tempo de condicionamento para o ICER-AChE*hu*+BACE1 preparado foi de 30 minutos com a fase móvel antes de cada análise.

II.2.4 Determinação da K_{Map} para as enzimas no ICER-AChE*hu*+BACE1

Os parâmetros cinéticos K_{Map} para cada enzima foram determinados através da construção de duas curvas cinéticas a partir das injeções de concentrações crescentes de JMV2236 (20 a 250 µmol.L^{-1}) para a BACE1 e ACh (5 a 250 µmol.L^{-1}) para a AChE*hu* no ICER-AChE*hu*+BACE1.

As soluções de JMV2236 utilizadas para a curva foram preparadas a partir da diluição da solução estoque de 1 mmol.L^{-1} a 40, 60, 80, 100, 160, 200, 400 e 1000 µmol.L^{-1} em DMSO. Assim sendo, as soluções finais para injeção consistiram de alíquotas de 25 µL de cada concentração de JMV2236 a um volume final de 50 µL com solução de acetato de amônio (15 mmol.L^{-1}, pH 4,5). Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e, em seguida, 10 µL foram injetadas no ICER-AChE*hu*+ BACE1, em triplicata.

As soluções de ACh foram preparadas a partir da diluição da solução estoque de ACh 1 mmol.L^{-1} a 25, 50, 75, 100, 125, 150, 250 e 1000 µmol.L^{-1} em MeOH.

As soluções finais para injeção consistiram de alíquotas de 20 µL de cada concentração de ACh a um volume final de 80 µL com solução de acetato de amônio (15 mmol.L^{-1}, pH 4,5). Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e, em seguida, 10 µL foram injetadas no ICER-AChE*hu*+BACE1, em triplicata.

Condições das análises tabela II.1.

O parâmetro K_{Map} foi extrapolado usando o programa Sigma Plot 11.0 (SPSS, Inc.) na função de regressão não-linear de melhor ajuste.

II.2.5 Estudos de inibição para as enzimas no ICER-AChE*hu*+BACE1

O ICER-AChE*hu*+BACE1 foi validado com os inibidores de referência denominados; tacrina (para a AChE*hu*) e o inibidor de β-secretase (para a BACE1) [106]. Uma curva de potência inibitória (IC_{50}) para cada enzima foi construída e o valor da IC_{50} determinado.

Para tal estudo foi realizado variação da concentração do inibidor com manutenção de uma concentração de substrato sendo: 70 µmol.L^{-1} de ACh (para a AChE*hu*) e 100 µmol.L^{-1} de JMV2236 (para a BACE1).

As soluções para este ensaio foram obtidas por adição de:

1º) BACE1; 10 µL da solução de JMV2236 (1000 µmol.L^{-1}, em DMSO) e 10 µL de cada solução de inibidor de β-secretase (0,05; 0,5; 0,1; 0,25; 0,5; 2,5 µmol.L^{-1}, em DMSO). Volume final completado para 50 µL com solução de acetato de amônio (pH

4,5), e 10µL de cada uma destas soluções foram injetadas no ICER-AChE*hu*+BACE1, em triplicata.

2º) AChE*hu*; 20 µL da solução de ACh (350 µmol.L^{-1}, em MEOH) e 10 µL de cada solução de tacrina (50; 125; 250; 300; 400; 500 e 1000 µmol.L^{-1}, em MEOH). Volume final completado para 100 µL com solução de acetato de amônio (pH 4,5), e 10µL de cada uma destas soluções foram injetadas no ICER-AChE*hu*+BACE1, em triplicata.

A área do produto obtida na presença (P_i) e na ausência (P_0) do inibidor foi comparada e a porcentagem de inibição (% I) calculada como descrito na equação I.1.

A curva de inibição foi construída plotando-se % de inibição versus a concentração de inibidor. Os parâmetros de regressão não linear foram calculados e o valor de IC_{50} extrapolado utilizando o programa GraphPad Prism 5 Demo.

Controles positivos, que consistiram na avaliação das atividades enzimáticas sem a presença dos inibidores (antes e depois) do ensaio foram realizados. E também, controles negativos, sendo avaliação de um branco de cada composto sem a presença do substrato da enzima, com a adição do mesmo volume do solvente de solubilização de cada substrato foram averiguados.

A área do produto obtida na presença (P_i) e na ausência (P_0) do inibidor foi comparada e a porcentagem de inibição (% I) calculada como descrito na equação I.1.

II.3 Resultados e discussão parte II

Previamente ao desenvolvimento do método *on-line* de co-imobilização foram realizados estudos com a enzima AChE*hu* (imobilização e variação do pH da fase móvel do sistema CLAE-EM), assim como já estudado para a BACE1 na parte I.

A partir dos resultados obtidos, por comparação, pôde-se fazer uma avaliação e a seleção das melhores condições para o desenvolvimento do método de co-imobilização para ambas as enzimas no mesmo suporte.

A enzima AChE*hu* foi então imobilizada em capilares de sílica fundida com (100 cm x 0,375 mm x 100 μm d.i.) baseado em trabalhos anteriores no grupo como em Vanzolini *et al.* (2013) e da Silva *et al.* (2013) [45, 89] apenas com a modificação da concentração da enzima, que neste caso foi de 16,66 $U.mL^{-1}$. Ao final do procedimento o ICER-AChE*hu* foi dividido em 30 cm para realização dos ensaios.

Posteriormente, o ICER-AChE*hu* foi conectado ao sistema CLAE-EM, utilizando as condições relatadas na tabela II.1 e avaliado sua atividade. O substrato natural da enzima, ACh, foi utilizado e o produto da clivagem enzimática colina (Ch) de massa $[M+H]^+$ 104*m/z* foi monitorado.

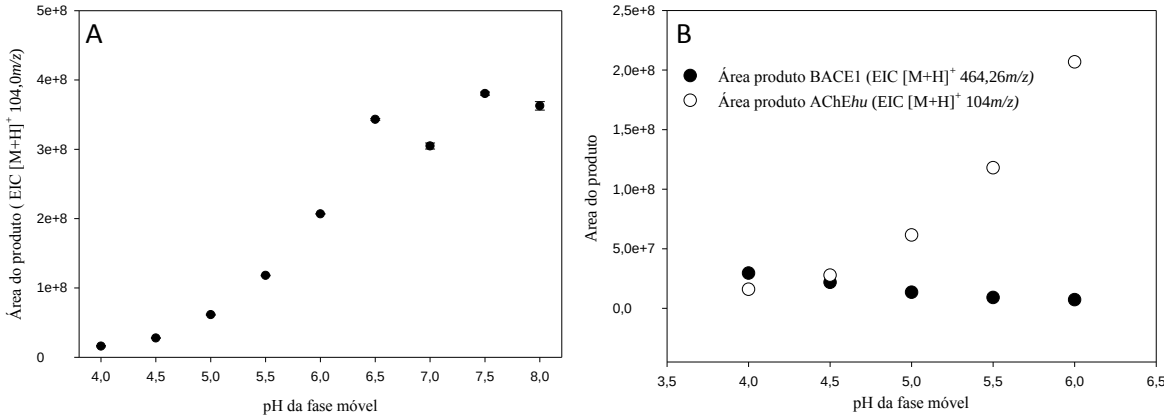
Modificações na atividade da AChE*hu* a partir de variações no pH da fase móvel do sistema, bem como a determinação do K_{Map} foram estudados.

O estudo do pH foi fundamental, uma vez que se trata da co-imobilização de enzimas que exercem suas funções catalíticas ótimas a pH distintos. A BACE1 é uma aspartil protease e portanto, pH ácido, e a AChE sendo uma esterase atua melhor a pH entre 7-8,5.

O objetivo aqui foi definir um pH no qual se pudesse realizar o monitoramento da atividade de ambas as enzimas empregando uma mesma condição de fase móvel.

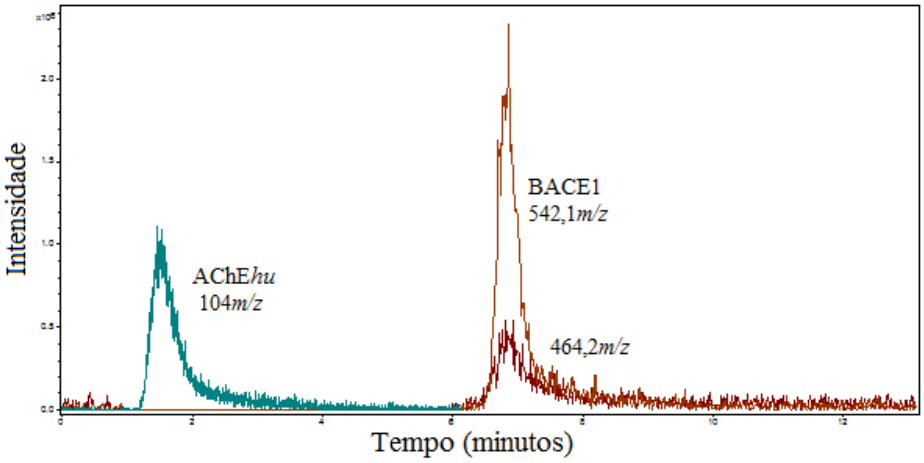
Os estudos realizados com a BACE1 (ICER-BACE1 - parte I) demonstraram que nãofoi possível obter boas condições de catálise enzimática em variações de pH entre 6-8,5. Já para a AChE*hu*, pôde-se avaliar a atividade da enzima em uma ampla faixa de pH, figura II.1.

Figura II.1. A) Influência do pH da fase móvel na atividade enzimática do ICER-AChE$_{hu}$. **B)** Sobreposição dos estudos da influência do pH na atividade do ICER-AChE*hu* e BACE1 Condições de análise Tabela II.1.



Com tais resultados em mãos foi definido opH ótimo da fase móvel para o sistema co-imobilizado em 4,5. A figura II.2 ilustra a sobreposição dos cromatogramas de íons extraídos para os produtos de hidrólise com a fase móvel em pH 4,5.

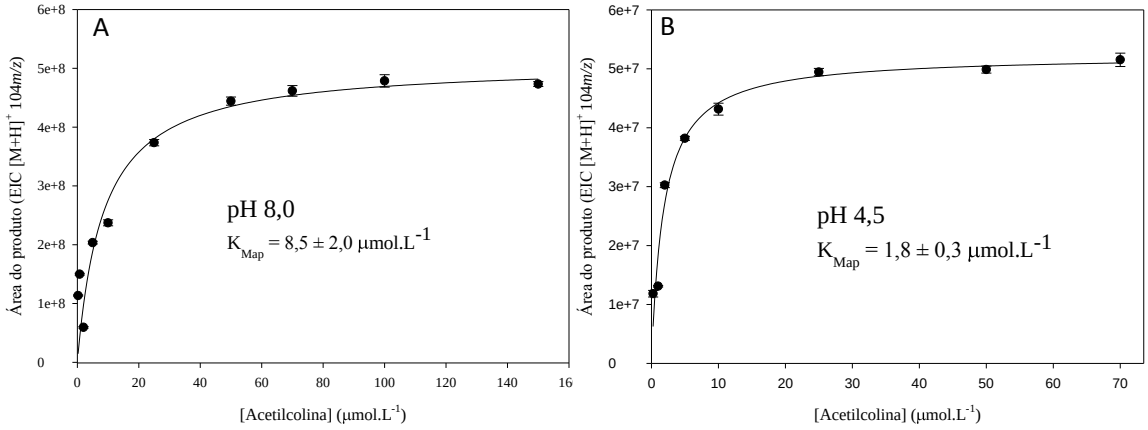
Figura II.2. Sobreposição dos cromatogramas de íons extraídos referente aos produtos de hidrólise para o ICER-AChE*hu* e BACE1 realizados individualmente após a injeção de 10 µL de ACh e JMV2236 a 50 µmol.L^{-1}. Condições: tabela II. 1.



A K_{Map} em pH 7,5 (ótimo para a AChE*hu*) e 4,5 (pH de atividade para a co-imobilização) também foram realizados para verificação das diferenças na hidrólise da enzima devido a variação do pH da fase móvel. Os resultados indicaram perfil hiperbólico Michaeliano tanto em pH 4,5 quanto pH 7,5 com uma diferença de 4,5 vezes menor em pH 4,5. Figuras II.3 A e B, indicando um aumento da afinidade pelo substrato.

Este é um excelente resultado, uma vez que em pH 4,5 a enzima BACE1 tem sua atividade catalítica ótima.

Figura II.3. Hipérbole de Michaelis para o ICER-AChE*hu* em **A)** fase móvel a pH 8,0 e **B)** fase móvel a pH 4,5. Condições tabela II.1.

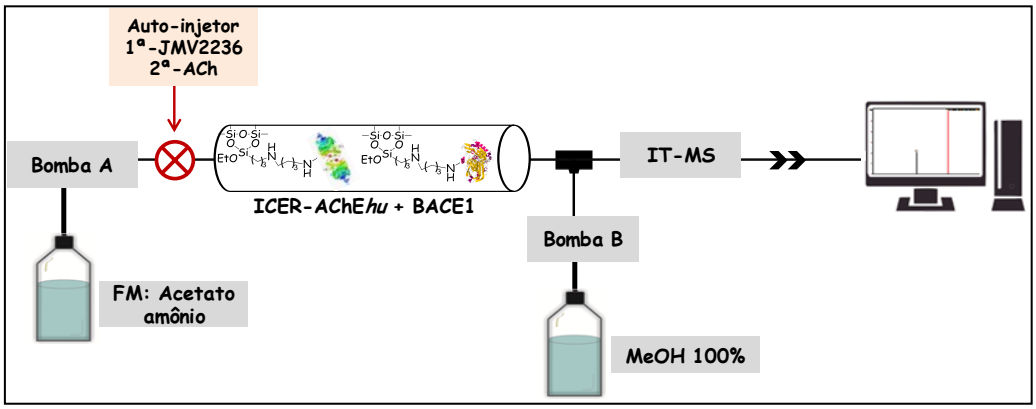


II.3.1 Co-imobilização

A co-imobilização foi realizada utilizando um método de ligação já estabelecido com sucesso para a BACE1 (parte I). O procedimento adotado de co-imobilização foi efetivo mostrando que houve a preservação das atividades de ambas as enzimas pós co-imobilização.

O sistema CLAE-EM e sua configuração, como em Vanzolini *et al.* (2013) [46, 89], utilizado para o monitoramento das atividades permitiu a medida direta dos produtos de hidrólise enzimática por EM, esquema II.1. O metanol presente na bomba B, adicionado após a reação enzimática, consistiu em melhorar a ionização dos analitos.

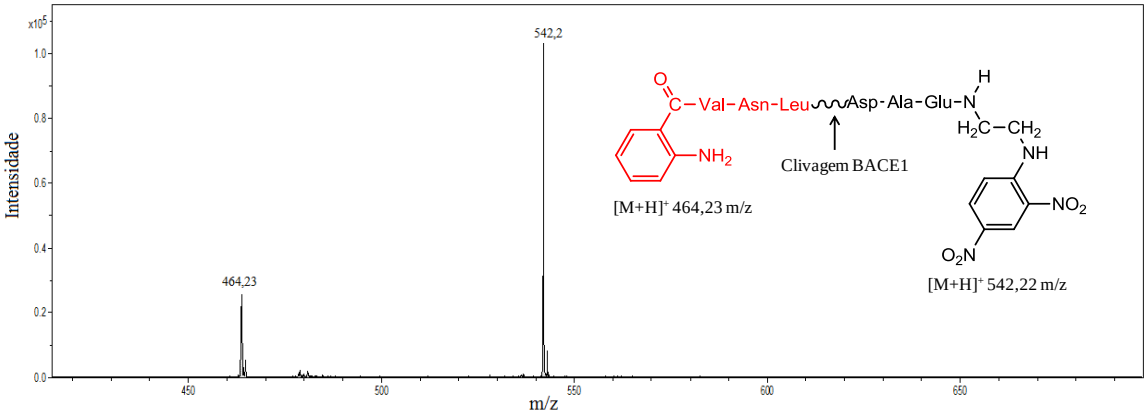
Esquema II.1. Ilustração da configuração instrumental CLAE-EM utilizado para o monitoramento do ICER-AChE*hu*+BACE1.



Após a conexão do ICER-AChE*hu*+BACE1 no sistema CLAE-EM e condicionamento com a fase móvel, foram realizadas as injeções dos substratos, em sequência, primeiramente o substrato de uma enzima, e ao final da análise, o substrato da outra.

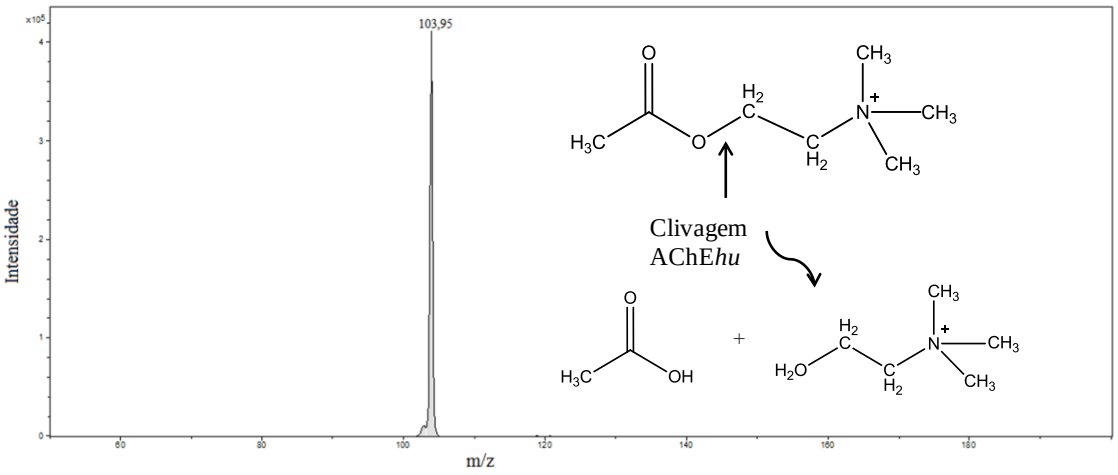
Após a 1ª injeção de 10 µL do substrato da BACE1, JMV2236 (100 µmol.L^{-1}) no sistema observou-se a formação dos fragmentos de hidrólise enzimática de massas $[M+H]^+$ 464,23 *m/z* e $[M+H]^+$ 542,22*m/z*, figura II.4.

Figura II.4. Espectro de massas referente a injeção de 10 µL JMV2236 100 µmol.L^{-1} no sistema CLAE-EM com o ICER-AChE*hu*+BACE1 monitorando os produtos de hidrólise $[M+H]^+$ 464,23*m/z* e $[M+H]^+$ 542,22*m/z*. Condições, tabela II. 1. Dentro da figura, ilustração da clivagem da BACE1 empregando o substrato JMV2236.



Ao término da análise da 1ª injeção, a 2ª injeção correspondente a 10 µL do substrato ACh (70 µmol.L^{-1}) foi realizada e observou-se a formação do produto de hidrólise enzimática com $[M+H]^+$ 103,95 *m/z*, figura II.5.

Figura II.5. Espectro de massas referente a injeção de 10 µL ACh 70 µmol.L^{-1} no sistema CLAE-EM com o ICER-AChE*hu*+BACE1 monitorando o produto de hidrólise $[M+H]^+$ 103,95*m/z*. Condições, tabela II.1. Dentro da figura, ilustração da clivagem da AChE empregando o substrato ACh.



As análises foram realizadas sucessivamente sem necessidade de limpeza entre as auto-injeções. Além disso, a ordem de injeção dos substratos não afetou os resultados podendo ser empregado também a ordem inversa de substratos, todavia para padronização do método, foi realizado empregando primeiro a auto-injeção do substrato da BACE1 e posterioremente da AChE*hu*.

Os estudos da ordem de eluição das enzimas pelo capilar para a co-imobilização mostraram que o melhor resultado foi empregando a eluição da mistura das enzimas de modo randômico. Como mostrado na figura II.6, para a enzima BACE1, claramente observa-se uma melhor atividade da enzima quando a co-imobilização foi realizada eluindo-se a mistura das enzimas previamente preparada. Já para a AChE*hu*, figura II.7, não houve variações significativas para a atividade da enzima no ICER-AChE*hu*+BACE1 após as diferenças de ordem de eluição pelo capilar, sendo portanto selecionado a mistura tendo em vista o melhor resultado para a BACE1.

Figura II.6. Sobreposição dos cromatogramas de íons extraídos $[M+H]^+$ 464,2 *m/z* da atividade da BACE1 no sistema ICER-AChE*hu*+BACE1 empregando JMV2236 a 100 µmol.L^{-1}.

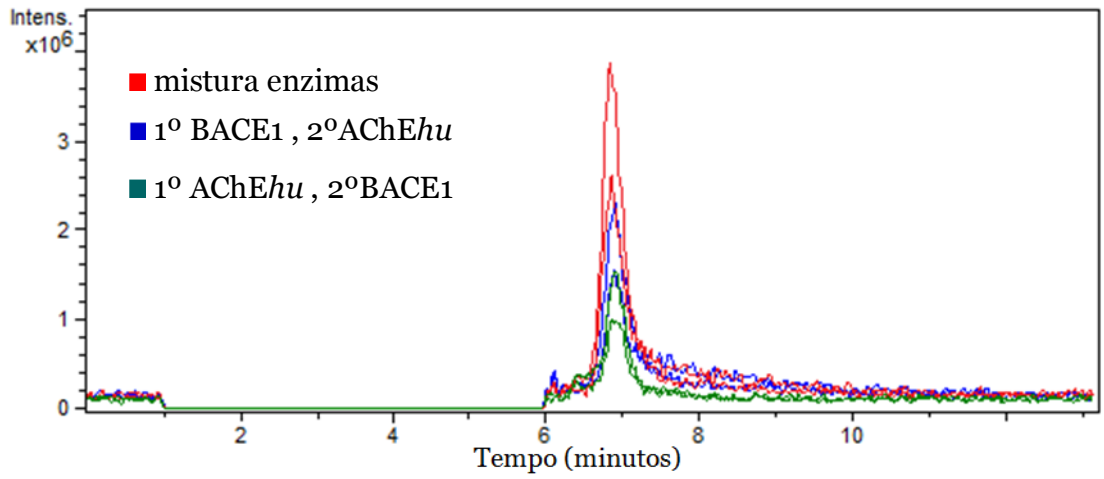
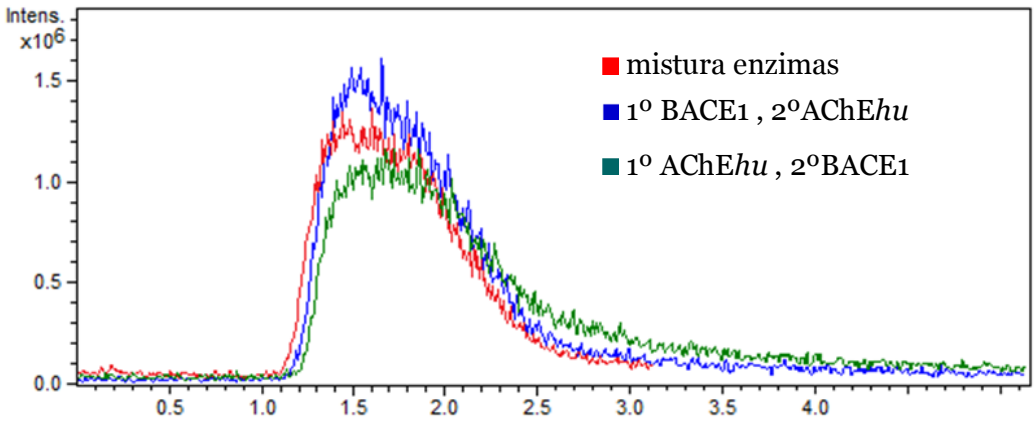


Figura II.7. Sobreposição dos cromatogramas de íons extraídos $[M+H]^+$ 103,95 *m/z* da atividade da AChE*hu* no sistema ICER-AChEhu+BACE1 empregando ACh a 100 µmol.L^{-1}.

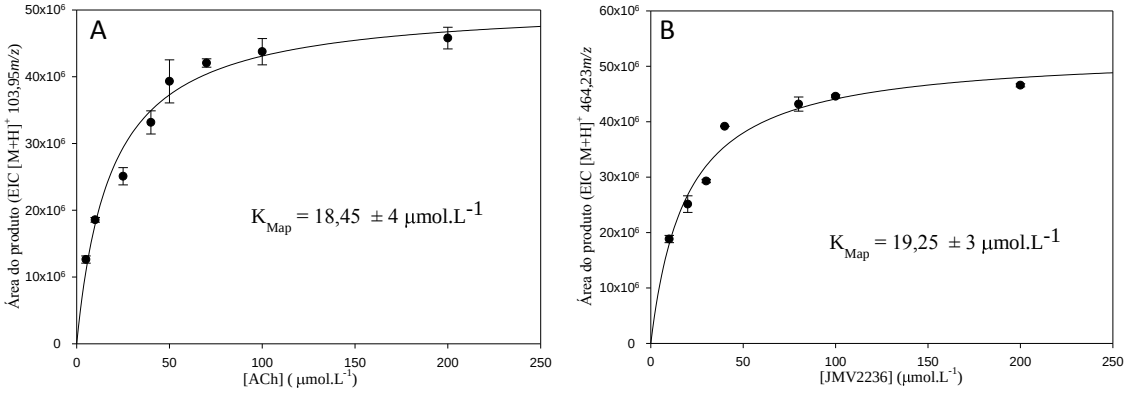


A reprodutibilidade do procedimento de co-imobilização apresentou um CV = 5,6 % (n=3), demonstrando eficiência no procedimento randômico adotado.

II.3.2 Parâmetro cinético K_{Map}

A constante K_{Map} é dependente das condições do meio reacional, deste modo, as alterações nesta propriedade devido ao processo de co-imobilização para cada enzima foram averiguadas. O K_{Map} para a AChE*hu* foi de 18,45 ± 3 µmol.L^{-1} e para a BACE1 de 19,25 ± 3 µmol.L^{-1} exibindo perfil hiperbólico para ambas as enzimas.

Figura II. 8. Hipérbole de Michaelis para o ICER-AChE*hu*+BACE1 em A) AChE*hu* e B) BACE1. Condições tabela II.1.



A tabela II.2, reporta os valores de K_{Map} obtidos para as enzimas imobilizadas individualmente e co-imobilizadas, enfatizando que as mesmas concentrações de enzimas foram preparadas e utilizadas para a imobilização e co-imobilização.

Por comparação, houve um aumento de 10,2 vezes para a AChE*hu*, e nenhuma diferença significativa para a BACE1. A alteração da afinidade pelo substrato para a AChE*hu* era esperada uma vez que as condições experimentais utilizadas favoreciam a BACE1. Cabe salientar aqui que um impedimento estérico pode estar afetando o acesso do substrato ao sítio ativo da AChE*hu*.

Tabela II.2. Comparação dos valores de K_{Map} obtidos para os métodos co-imobilizado e imobilizado individualmente.

Valores de K_{Map} ($\mu mol.L^{-1}$)	**AChE*hu***			**BACE1**		
	ICER-AChE*hu**	ICER-AChE*hu*+BACE1	Razão**	ICER-BACE1*	ICER-AChE*hu*+BACE1	Razão**
	1,8	18,4	10,2	17,2	19,2	1,1

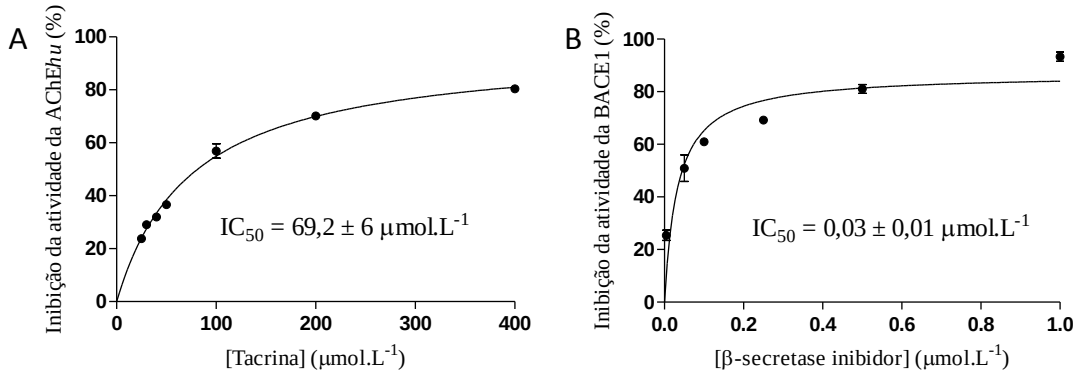
* individual, ** razão entre co-imobilizado e imobilizado

Correlacionando os valores obtidos para as enzimas co-imobilizadas, estes apresentaram semelhança numérica indicando que as enzimas estão catalisando mesmas quantidades de substratos em produtos, assim sendo, o valor da concentração de substrato para cada enzima a ser empregado nos estudos com inibidores pode ser o mesmo, sendo este padronizado em 70 $\mu mol.L^{-1}$, um valor de aproximadamente 3 vezes o K_{Map} obtido para cada enzima, garantindo a saturação da enzima com o substrato.

II.3.3 Potência inibitória (IC_{50})

O método *on-line* ICER-AChE*hu*+BACE1 foi validado para triagem de ligantes empregando os inibidores de referência específico para cada enzima. A figura II.9 ilustra os resultados, em A) para a AChE*hu* e em B) para a BACE1.

Figura II.9. Curva de potência inibitória: A) para a AChE*hu* e B) para a BACE1 no sistema ICER-AChE*hu*+BACE1.



O ICER-AChE*hu*+BACE1 demonstrou capacidade de reconhecimento dos inibidores padrão disponíveis. Cada enzima apresentou seletividade e especificidade com relação ao seu substrato e inibidor sem interferência e/ou problemas durante o período do desenvolvimento do método, 30 dias.

II.4 Conclusão parte II

O método co-imobilizado *on-line* permitiu a construção de um sistema para avaliação das atividades da AChE*hu* e BACE1 em fluxo por CLAE-EM, empregando uma fase móvel com mesma força iônica e pH, de enzimas com propriedades cinéticas diferentes.

Os produtos gerados após as clivagens das enzimas foram mensurados pela integração da área do pico.

Os estudos das K_{Map}, comparado com o sistema de imobilização individual, demonstraram que a co-imobilização não alterou significativamente a afinidade da BACE1 pelo seu substrato ao passo que para a AChE*hu* houve um aumento de 10 vezes. Alteração esta que pode estar relacionada a condição da análise ter favorecido a BACE1 e/ou uma maior quantidade de BACE1 foi ligada ao suporte.

A avaliação dos inibidores padrão, específicos para cada enzima, também foram determinados com êxito. Assim, este modelo de ensaio com as enzimas co-imobilizadas apresentou especificidade, seletividade, medida direta dos produtos enzimáticos em um sistema automatizado.

Diante do exposto, o métodos de co-imobilização *on-line* foi desenvolvido com sucesso preservando a atividade das enzimas após a co-imobilização.

Parte III. Imobilização e co-imobilização das enzimas AChE peixe elétrico (AChE*ee*) e BACE1 em derivados de agarose – Métodos *off-line* para triagem de ligantes

III.1 Introdução

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC), Marie Curie 2 Cantoblanco, Campus Universidad Autónoma de Madrid, em Madri (Espanha), sob supervisão do Dr. César Mateo. Este estágio foi financiado pela agência de fomento FAPESP, BEPE (bolsa de estágio e pesquisa no exterior) nº processo 2016/15037-5, no período de 1-10-16 a 31-07-17.

O objetivo deste estágio foi aprender novas metodologias de imobilização de enzimas para serem aplicadas nas enzimas envolvidas no nosso grupo de pesquisa (GCBPN).

No presente trabalho diferentes abordagens de imobilização foram empregadas utilizando a AChE*ee* como modelo. A imobilização e estabilização da AChE*ee* em esferas de agarose ativados com diferentes grupos reativos heterofuncionais foi apresentado pela primeira vez. Os diferentes tipos de ligação da AChE*ee* em agarose obtidos (denominados métodos *off-line*) foram estudados e a avaliação das diferentes propriedades catalíticas (atividade e estabilidade) da enzima pós-imobilização foram verificadas. O método *off-line* com a AChE*ee* que apresentou maior estabilidade foi validado empregando o inibidor padrão tacrina, para a sua futura aplicação na triagem de ligantes.

Posteriormente, foram empregadas as mesmas metodologias de imobilização para a BACE1 e o melhor método de imobilização foi adotado e empregado na co-imobilização de ambas as enzimas (AChE*ee* e BACE1).

III.2 Procedimento experimental parte III

III.2.1 Materiais

A enzima Acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus*, tipo VI-S, liofilizada, 200-1,000 units/mg de proteína), tacrina (hidrocloreto de 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina), fosfato de sódio monohidratado ($NaH_2PO_4.H_2O$), cloreto de níquel hexahidratado ($NiCl_2.6H_2O$), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), epicloridrina, ácido iminodiacético (IDA), trieltilamina (TEA), borohidreto de sódio ($NaBH_4$), periodato de sódio ($NaIO_4$), 1-dodecanotiol (C_{12}), ácido sulfúrico (H_2SO_4), 2-mercaptoetanol,

hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Glutaraldeído e etilenodiamino (EDA) adquirido pela Alfa Aesar (Thermo Fisher Scientific®). Agarose 4 BCL foi adquirida pela Agarose Bead Technologies (Madrid, Spain).

O substrato propionato de p-nitrofenil (p-NPP) foi sintetizado de acordo com o protocolo descrito em Ghosh *et al.* (2003) [115].

A enzima BACE1 (EC 3.4.23.48) recombinante humana, expressa em células HEK 293 (C-terminal FLAG tagged), domínio extracelular ≥10,000 unidades/mg de proteína, ≥ 90 % SDS-PAGE, e o inibidor de β-secretase foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O substrato fluorogênico, [(NH_2-Arg-Glu (Ácido N-(aminoetil)-5-naftilamina-1-sulfônico)-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Lys (Ácido 4-(4- (dimetilamino) fenil) benzóico)-Arg-COOH) também denominado Substrate IV, foi adquirido pela Calbiochem® (EMD Millipore Corp., Billerica, MA USA).

As soluções estoque, do inibidor da enzima BACE1, inibidor de β-secretase (1 $mmol.L^{-1}$) e o substrato IV (1 $mmol.L^{-1}$) foram preparadas em DMSO e armazenados a -20 °C.

A água utilizada nos experimentos foi deionizada em um sistema Millipore Milli-Q® system (Millipore, Madri, Espanha).

III.2.2 Instrumentação

As análises dos experimentos para a enzima AChE*ee* foram registradas em um espectrofotômetro – Jasco V-730 utilizando uma cubeta de quartzo no programa *Time Course* e *Quatitative Measurement*. A homogeneização das amostras foi efetuada em um agitador PerfectSpin Mini da peqlab. Os experimentos de estabilidade térmica foram conduzidos em um Mixing block (MB-102) BIOER.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica KERN, modelo ABS com precisão 0,0001g. As medidas de pH foram realizadas em pH-metro digital (pH meter pH 2005) TeknoKroma-professionally friendly.

As análises envolvendo a enzima BACE1 foram registradas em um fluorímetro - Luminescence Spectrometer – PERKIN ELMER LS50B. A detecção empregando o substrato IV foi obtida utilizando λ_{em} = 490 nm (λ_{ex} = 355 nm). Todas as análises foram realizadas a ± 25 °C.

III.2.3 Preparo soluções de trabalho

1) *Solução fosfato de sódio*

A solução de fosfato de sódio foi utilizada tanto no procedimento de imobilização quanto para as análises. Uma solução estoque a 200 $mmol.L^{-1}$ foi preparada adicionando-se 12 g em 500 mL de água deionizada com pH ajustado a 7,0 com hidróxido de sódio (1 $mol.L^{-1}$). A partir desta, foram realizados diluições a 25, e 10 $mmol.L^{-1}$.

2) *Solução bicarbonato de sódio*

Esta solução foi utilizada no procedimento de incubação a pH 10,0. Assim, 0,42 g foram dissolvidos em 200 mL de água deionizada com ajuste pH a 10.

3) *Solução acetato de sódio*

Esta solução foi utilizada nos estudos com a enzima BACE1 para as análises de atividade. A solução foi preparada a 20 $mmol.L^{-1}$ sendo 0,328 g dissolvidos em 200 mL de água deionizada com pH ajustado a 4,5 com solução de ácido clorídrico (10%).

III.2.4 Suportes para imobilização das enzimas

III. 2.4.1 Agarose com grupos epóxidos (agarose-epóxido)

O suporte esferas de agarose foi inicialmente ativado com grupos epóxidos através do reagente epicloridrina [23]. Para isto, 50 g de agarose foram dissolvidos em 200 mL de água que continha; hidróxido de sódio (1 $mol.L^{-1}$ – realizado sob refrigeração), 80 mL de acetona, 1 g de borohidreto de sódio ($NaHB_4$). Depois, adicionado 55 mL de epicloridrina, lentamente sob refrigeração, e deixado reagindo por 16 horas sob agitação suave a temperatura ambiente. Ao final, filtrado a vácuo, lavado abundantemente com água, filtrado novamente a vácuo e estocado a 4°C.

III. 2.4.2 Modificação do suporte agarose-epóxido com diferentes grupos

As modificações foram realizadas conforme descrito em Mateo *et al.* (2010) [23]. Em todos os casos, a relação entre a solução modificadora e o suporte foi de 1/10 (m/v). Ao final do preparo, todos foram filtrados sob vácuo, lavados abundantemente com água destilada, novamente filtrados a vácuo, posteriormente oxidados com $NaIO_4$ 100 $mmol.L^{-1}$ (1/10 p/v), seguidos novamente de filtração - lavagem abundante com água destilada - filtração e estocados a 4°C.

1) Suporte – Agarose-aldeído (CHO)

O suporte agarose-epóxido foi bloqueado com 5% de mercaptoetanol a pH 8,7 por 16 horas a 25 °C, sob agitação suave.

2) Suporte – Agarose-TEA-CHO

O suporte agarose-epóxido foi incubado com uma solução de trietilamina (TEA) 1 $mol.L^{-1}$ em água/acetona (50%), pH 12 por 24 horas, sob agitação suave, a temperatura ambiente [23].

3) Suporte com metal – Agarose-IDA-Ni^{2+}-CHO

O suporte agarose-epóxido foi tratado com uma solução de ácido iminodiacético (IDA), 0,5 $mol.L^{-1}$, pH 11 por 24 horas a temperatura ambiente sob agitação suave. Após, o suporte foi submetido a uma reação de quelação através de uma solução de 30 $mg.mL^{-1}$ de $NiCl_2$ por uma hora a temperatura ambiente [23].

4) Suporte com grupos hidrofóbicos – Agarose-C_{12}-CHO

O suporte agarose-epóxido sofreu um tratamento com uma solução de 100 $mmol.L^{-1}$ de 1-dodecanotiol (C_{12}) dissolvido em uma mistura de acetona e $NaHCO_3$ (25 $mmol.L^{-1}$) 50 % (v/v) sob agitação suave por 24 horas. [28].

5) Suporte – Agarose-EDA-epóxido[2]

O suporte agarose-epóxido (10g) foi misturado com 100 mL de solução de EDA (100 $mmol.L^{-1}$, pH 8,5) por 1 hora a 25 °C.

III. 2.4.3 Suporte Agarose-epóxido com glutaraldeído (Glut)

O preparo destes suportes foi baseado em de Melo *et al.* (2017) [24].

1) Suporte – Agarose-EDA- Glut

O suporte agarose-epóxido foi primeiramente hidrolisado com uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 $mol.L^{-1}$ por 2 horas, sob agitação branda, lavado com água - filtrado a vácuo, posteriormente oxidado com $NaIO_4$ 100 $mmol.L^{-1}$, novamente por 2

---

[2] Neste caso não houve oxidação com $NaIO_4$

horas, sob agitação branda. Seguido com a adição de uma solução 2 mol.L^{-1} de EDA, pH 10, por 2 horas, sob agitação branda. Após, adição de $NaHB_4$ (10 mg.mL^{-1}) por 2 horas. Lavado com água destilada e filtrado, com posterior tratamento com solução de glutaraldeído (25%) em solução fosfato de sódio (200 mmol.L^{-1}, pH 7,0), 12 ml de cada , sob agitação branda por 18 horas a temperatura ambiente. Após esta etapa o suporte estava pronto para uso imediato.

2) Suporte – Agarose-IDANi^{2+}- Glut

O suporte Agarose-IDA foi preparado conforme descrito em II.2.3.3 (3) até a etapa anterior a quelação com o metal, e então, lavado com água destilada, seguido de oxidação com $NaIO_4$ 100 mmol.L^{-1} por 2 horas, temperatura ambiente, lavado novamente, e acrescido 100 mL de EDA, pH 10, por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente adicionado $NaHB_4$ (10 mg.mL^{-1}) por 2 horas, agitação branda. Lavado com água destilada, filtrado a vácuo. Ao final deste processo, adicionado uma solução de glutaraldeído (25%) (12 mL) em solução fosfato de sódio (200 mmol.L^{-1}, pH 7,0) (12 mL), sob agitação branda por 18 horas a temperatura ambiente. Após esta etapa, o suporte foi quelado com uma solução de 30 mg.mL^{-1} de $NiCl_2.6H_2O$ por uma hora a temperatura ambiente, lavado com água destilada e filtrado a vácuo e pronto para uso imediato.

III.2.5 Estudos para AChE*ee*

III.2.5.1 Imobilização

A imobilização foi realizada em todos os suportes de agarose modificados. A solução enzimática estoque foi preparada na concentração de 10 mg.mL^{-1} e diluída a 1 mg.mL^{-1} com solução fosfato de sódio 10 mmol.L^{-1}, pH 7,0.

A imobilização envolvendo os suportes agarose-epóxido modificados foi realizado em três etapas, como em Mateo *et al* (2010) [23].

1ª etapa: adsorção da enzima em pH 7,0

Para cada suporte, 0,3 g foram ressuspendidos em 0,5 mL de solução fosfato de sódio, 10 mmol L^{-1}, pH 7,0, adicionado 0,250 mL de enzima (1 mg.mL^{-1}). Deixado sob agitação branda por 30 minutos.

Observação: para o suporte Agarose-CHO foi utilizado solução fosfato,100 mmol.L^{-1}, pH 10,0. Para o suporte Agarose-IDANi^{2+}-CHO foi utilizado solução fosfato de sódio, 100 mmol.L^{-1}, pH 7,0.

Nesta primeira etapa foi medido a atividade enzimática para o sobrenadante e para a suspensão após 30 minutos de incubação, e posteriormente foram comparadas com a medida inicial da atividade da enzima.

2ª etapa: Incubação a pH 10

Cada suporte com a enzima imobilizada (agarose-AChE*ee*) foi lavado com solução fosfato de sódio (mesmo utilizado na imobilização), filtrado e ressuspendido com 1 mL de solução bicarbonato de sódio ($NaHCO_2$) (25 mmol.L^{-1}, pH 10,0) por 1 hora.

3ª etapa: Redução com $NaHB_4$

Cada agarose-AChE*ee* foi reduzido com $NaHB_4$ 1 mg.mL^{-1} por 30 minutos a temperatura ambiente, lavado com água e filtrado.

A imobilização nos suportes com grupos CHO do glutaraldeído, foi realizada em uma única etapa, ligação covalente via glutaraldeído, como reportado em [24].

Aqui, 0,3 g de cada suporte previamente preparado com glutaraldeído foram ressuspendidos em 0,5 mL da solução de fosfato de sódio (200 mmol.L^{-1}, pH 7,0), e foram adicionados 0,25 mL de AChE*ee* (1 mg.mL^{-1}). A suspensão foi mantida suavemente em agitação durante 30 minutos.

Ao final, as amostras dos sobrenadantes e suspensões foram retiradas e a atividade enzimática foi medida. A imobilização foi considerada completa quando não houve atividade significativa da enzima no sobrenadante.

A eficiência da imobilização (EI) foi calculada pela razão entre as atividades no sobrenadante da suspensão contra a atividade no controle da enzima solúvel (atividade inicial), como segue na equação II.1.

$$EI\ (\%) = 100 - 100 \times \left(\frac{atividade\ sobrenadante\ da\ suspensão}{atividade\ inicial}\right) \qquad \text{Equação (III. 1)}$$

A porcentagem de atividade (RA) da enzima após a imobilização foi calculada como a proporção percentual da atividade na suspensão final após o processo de imobilização e a atividade inicial da enzima, como descrito na equação III.2.

$$RA\ (\%) = \frac{100 \times atividade\ imobilizado}{EI/_{100} \times atividade\ inicial} \qquad \text{Equação (III.2)}$$

III.2.5.2 Determinação da atividade

O monitoramento da atividade da AChE*ee*, tanto imobilizada quanto para a enzima em solução foi realizado utilizando o substrato propionato de p-nitrofenil (p-NPP), sintetizado como em Ghosh *et al.* (2003) [115]. A solução estoque do substrato p-NPP foi preparada a 100 mmol.L^{-1} em metanol (100%).

As atividades enzimáticas foram mensuradas em cubeta sob agitação pela mistura de; 2000 µL de solução fosfato de sódio (25 mmol.L^{-1} pH 7.0), 100 µL de substrato (50 mmol.L^{-1}), 100 µL de AChE*ee* (livre em solução ou suspensão com a enzima imobilizada). O aumento da absorbância em 348 nm, que corresponde à formação do produto p-nitrofenol a partir da hidrólise do substrato p-NPP catalisada na presença da AChE.

O ε para o p-nitrofenol a 348 nm, pH 7,0 é igual a 5150 mol.L^{-1}cm^{-1}. A concentração do produto é calculada em mol.L^{-1}, de acordo com a equação III.3.

$$C\ (mol.L^{-1}) = \frac{A\ x\ V_t\ x\ 1000}{\varepsilon\ x\ V_E} \qquad \text{Equação (III.3)}$$

Onde C é a concentração de p-nitrofenol produzido, A é a absorbância obtida, V_t é o volume total da cubeta, ε é o coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol, e V_E é o volume de enzima adicionado.

III. 2.5.2.1 Ensaios com AChEee em solução

A solução estoque da AChE*ee* 10 mg.mL^{-1} foi diluída a 100; 50; 20; e 10 µg.mL^{-1} em solução fosfato 10 mmol.L^{-1} pH 7,0.

O ensaio de atividade da AChE*ee* com o p-NPP consistiu em variações na concentração da enzima a uma concentração fixa de p-NPP. Para a realização deste, foram adicionados à cubeta sob agitação, volumes de; 2400 µL de solução fosfato de sódio (25 mmol.L^{-1}, pH 7,0), 50 µL de substrato p-NPP (75 µmol.L^{-1}), 50 µL de AChE

(100; 50; 20; e 10 μg.mL^{-1}) em duplicata. O aumento da absorbância foi monitorado a 348 nm por 1 minuto.

A cinética utilizando o p-NPP foi avaliada utilizando concentrações de 10, 15, 20. 25, 30, 50, 75 e 100 mmol.L^{-1} deste substrato e mantendo fixo 50 μL de solução de AChE*ee* (0,125 mg.mL^{-1}) em solução fosfato, pH 7,0.

As análise foram realizadas adicionando-se à cubeta sob agitação volumes de; 2400 μL de solução fosfato de sódio (25 mmol.L^{-1}, pH 7,0), 50 μL de substrato p-NPP nas concentrações de; 10, 15, 20. 25, 30, 50, 75 e 100 mmol.L^{-1}, 50 μL de AChE (0,125 mg.mL^{-1}) em duplicata. O aumento da absorbância foi monitorado a 348 nm por 1 minuto e quantificado de acordo com a equação III. 3.

III.2.5.3 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica para a AChE*ee* em solução foi realizada a 40, 45 e 50 °C e para a AChE*ee* imobilizada a 45 e 50 °C.

A suspensão com a enzima imobilizada foi preparada com a adição de 0,3 g de cada agarose-AChE*ee* em 500 μL de solução fosfato de sódio, 25 mmol.L^{-1}, pH 7.0.

Para este estudo, as suspensões de cada suporte com a enzima imobilizada e a enzima em solução foram incubados em solução fosfato (25 mmol.L^{-1}, pH 7,0) nas temperaturas indicadas acima pelo período de tempo necessário à completa perda de atividade da enzima.

As análises foram realizadas em cubeta, sob agitação, com a adição de; 2350 μL de solução fosfato de sódio (25 mmol.L^{-1}, pH 7,0), 50 μL de substrato p-NPP (50 μmol.L^{-1}), 100 μL de AChE*ee* em solução (previamente incubada a 40, 45 e 50 °C) e / AChE*ee* imobilizada (previamente incubada a 45 e 50 °C). Mensurados a 348 nm durante 1 minuto.

Medidas do tempo inicial (antes da incubação) e intervalos de 30 minutos até a completa inativação foram realizados. Estes estudos foram baseados na teoria da desativação proposta por Henley, Sadana (1986) [116], e os tempos de meia vida (t½ vida) foram interpolados segundo modelos descritos em Addorisio, *et al.* (2013) [117].

III.2.5.4 Estudos de inibição

Os estudos de inibição foram realizados para o agarose-AChE*ee* que apresentou maior estabilidade, o AChE*ee*-agarose-TEA-CHO e também para a AChE*ee* livre em solução, para fins de comparação.

O inibidor padrão tacrina foi utilizado para validar o AChE*ee*-agarose-TEA-CHO. A potência inibitória (IC_{50}), a constante de inibição (K_i), e o mecanismo de ação deste inibidor contra a AChE*ee* foram determinados.

A solução estoque do inibidor tacrina foi preparada em água na concentração de 1 $mmol.L^{-1}$.

1) Potência inibitória (IC_{50})

Para determinação do IC_{50}, foram avaliadas concentrações crescentes de tacrina (0,115; 1,15; 11,5; 23; 57,5; 115; e 230 $\mu mol.L^{-1}$), preparadas a partir da diluição da solução estoque, na presença de uma concentração fixa do substrato p-NPP a 50 $mmol.L^{-1}$.

A suspensão de AChE*ee*-agarose-TEA-CHO foi constituída de 0,3 g de cada derivado imobilizado em 500 µL de solução fosfato de sódio, 25 $mmol.L^{-1}$, pH 7,0.

Cada análise foi realizada em cubeta, sob agitação com a adição de; 2000 µL de solução fosfato de sódio (25 $mmol.L^{-1}$, pH 7,0), 100 µL de p-NPP (50 $mmol.L^{-1}$), 100 µL de AChE*ee* em solução e/ou suspensão de AChE*ee*-agarose-TEA-CHO, e 100 µL de tacrina (nas concentrações citadas acima). A cinética foi monitorada por 1 minuto a 348 nm.

O controle positivo, correpondente a atividade da enzima sem a presença do inibidor foi realizado. A absorbância obtida na presença (A_i) e na ausência (A_0) do inibidor foi comparada e a porcentagem de inibição calculada como segue a equação II.4.

$$\% I = 100 - [\left(\frac{A_i}{A_0}\right) x\ 100] \qquad \text{Equação (III. 4)}$$

A curva de inibição foi construída ao traçar a % de inibição versus a concentração do inibidor, e o parâmetro IC_{50} foi calculado por regressão linear utilizando log da concentração do inibidor versus % de inibição.

2) Mecanismo de ação e constante de inibição (K_i)

A constante de inibição (K_i) e mecanismo de ação foram determinados a partir da construção de uma curva controle (ausência de inibidor) e três curvas na presença de tacrina.

Para a curva controle, as concentrações de p-NPP empregadas foram: 10; 15; 30; 50 mmol.L^{-1}. O ensaio foi realizado em cubeta, sob agitação, quantidades de; 2000 μL de solução fosfato de sódio (25 mmol.L^{-1}, pH 7,0), 100 μL de p-NPP (de cada concentração citada), 100 μL de AChE*ee* em solução e/ou suspensão de AChE*ee*-agarose-TEA-CHO, e 100 μL de água. A cinética foi monitorada por 1 minuto a 348 nm.

As curvas na presença do inibidor consistiram de tacrina a 0,02875 (1ª curva); 0,0575 (2ª curva); 0,115 mmol.L^{-1} (3ª curva).

O ensaio foi realizado adicionando em cubeta volumes de; 2000 μL de solução fosfato de sódio (25 mmol.L^{-1}, pH 7,0), 100 μL de p-NPP (de cada concentração 10; 15; 30; 50 mmol.L^{-1}), 100 μL de AChE*ee* em solução e/ou suspensão de AChE*ee*-agarose-TEA-CHO, e 100 μL de inibidor (para cada concentração acima). A cinética foi monitorada por 1 minuto a 348 nm.

As análises foram preparadas e realizadas em duplicata. O gráfico duplo recíproco 1/[absorbância] versus 1/[p-NPP] foi construído para a determinação do mecanismo de ação e K_i determinado foi obtido pelo replot do gráfico duplo recíproco. Os dados obtidos foram plotados, de acordo com a equação I.2 que descreve mecanismo de inibição do tipo misto [104].

III.2.5.5 Determinação da constante de dissociação (K_D) e fração de saturação (Y)

A determinação da K_D e Y para tacrina em AChE*ee*-agarose-TEA-CHO foi realizada.

Primeiramente uma curva de calibração com padrão externo para a tacrina foi realizada.

As soluções de tacrina, a partir da diluição da solução estoque de 1 mmol.L^{-1}, nas concentrações de: 11,5; 23; 57,5; 115; 230; 575; 690 1 μmol.L^{-1} , em água foram preparadas. 100 μL de cada solução preparada foi adicionada em uma cubeta de quartzo diluída a 2300 μL com solução fosfato de sódio (25 mmol.L^{-1}, pH 7,0).

As medidas foram realizadas fazendo uma varredura de 200 a 600 nm com velocidade de 1000 nm.min^{-1}, sendo os valores de $\lambda_{Máx}$ para tacrina de 240 e 325 nm.

Em seguida foi avaliado o efeito de diferentes concentrações e valores de pH da solução fosfato de sódio utilizado na diluição da tacrina. Sendo, pH variando de 5,5 a 10, e concentração da solução na faixa de 0,025 a 0,5 mmol.L^{-1}.

O ensaio para a determinação de K_D foi realizado com a incubação de: 0,3 g de AChE*ee*-agarose-TEA-CHO, 500 µL de solução de fosfato de sódio (25 mmol.L^{-1}, pH 7,0) e 100 µL de tacrina, nas concentrações de 10; 20; 30; 50; e 100 µmol.L^{-1} durante 90 minutos a 25 ° C. Após a incubação, as suspensões foram centrifugadas por 3 minutos e o sobrenadante foi recolhido para medição.

As análises foram mensuradas em cubeta, sob agitação, adicionando; 2000 µL de solução de fosfato de sódio (25 mmol.L^{-1}, pH 7,0) e 200 µL de cada sobrenadante recolhido, sendo: agarose-TEA-CHO (suporte); AChE*ee*-agarose-TEA-CHO (controle positivo - E); agarose-TEA-CHO + tacrina (controle negativo - I); AChE*ee*-agarose-TEA-CHO + tacrine (EI) no tempo 0 (inicial) a 90 minutos (final). As absorções de UV foram registradas de 200 a 600 nm.

O parâmetro K_D e Y foram definidos como segue na equação III.5, onde; E é a enzima, [E] é a concentração de enzima, I é o inibidor, [I] é a concentração de tacrina utilizada, EI é o complexo enzima-inibidor, [EI] é a concentração de EI calculado pela diferença de absorção de intensidade relativa inicial e final obtida.

$$E + I \underset{K_D}{\overset{K_A}{\rightleftharpoons}} EI \;;\; K_D = \frac{[E]\,[I]}{[EI]} \;;\; Y = \frac{[EI]}{[E]_{total}}$$

Equação (III.5)

A curva de saturação foi construída pelo plot de Y versus a concentração de inibidor e o parâmetro K_D foi extrapolado através da regressão não linear utilizando GraphPadPrism 7.

III.2.5.6 Reutilização

A reutilização do AChE*ee*-agarose-TEA-CHO para ser aplicado na determinação de K_D na presença de tacrina foi avaliada. Assim sendo, foi realizado um estudo para a seleção de uma condição de adsorção e dessorção da tacrina no suporte com a enzima imobilizada- AChE*ee*-agarose-TEA-CHO. Para tal, estudos de aumento do volume da solução de fosfato de sódio 25 mmol.L^{-1} pH 7,0 (1 em 1 mL), e também, aumento da força iônica da solução de fosfato de sódio utilizada pH 7,0 (25, 500 e 1000 mmol.L^{-1}) em 0,3g de agarose-AChE*ee* até a completa dessorção da tacrina foram averiguados. As medidas foram realizadas como descritas no item III.2.5.5. acima, e a condição de um ciclo de adsorção-dessorção foi estabelecido.

III.2.6 Estudos para a enzima BACE1

O preparo da solução enzimática consistiu da diluição de uma alíquota de 5 µL da solução da enzima (em tampão Hepes 20 mmol.L^{-1} pH 7,4 contendo 125 mmol.L^{-1} NaCl) em 500 µL de solução fosfato de sódio 20 mmol.L^{-1}, pH 7,4, correspondendo a 0,014 mg.mL^{-1}, com 333,8 U.mL^{-1} ou 667,6 unidades totais de enzima.

III.2.6.1 Imobilização

A imobilização consistiu da incubação de 0,3 g de cada suporte de agarose previamente preparado com 0,5 mL de solução fosfato de sódio (10 mmol.L^{-1}, pH 6.0), e 0,18 mL da solução enzimática (333,8 U.mL^{-1}). Esta suspensão foi mantida sob agitação branda por 30 minutos a 25 ºC. Alíquotas do sobrenadante da suspensão foram retiradas para medida da atividade enzimática e a imobilização foi considerada completa quando após medida não houvesse nenhuma atividade residual.

A imobilização também foi realizada com a variação do pH da solução de fosfato de sódio utilizada para a solubilização dos derivados de agarose, nos valores de 4,0, 6,0 e 7,0.

A EI foi calculada pela razão entre as intensidades dos sinais de fluorescência do sobrenadante final e o inicial antes da imobilização como descrito na equação III.1. A RA foi obtida pela razão entre as intensidades dos sinais de fluorescência da suspensão com a enzima adsorvida e o inicial antes da imobilização, como descrito pela equação III.2.

III.2.6.2 Determinação da atividade

A atividade da BACE1 foi realizada empregando o substrato IV, tanto no ensaio com a enzima imobilizada quanto no ensaio com a enzima livre em solução. O aumento da intensidade do sinal de fluorescência a λ_{em} = 495 nm (λ_{exc} at 355 nm) foi monitorado.

Para a enzima imobilizada, 0,3 g de agarose-AChE*ee* foi ressuspendido em 0,5 mL de solução de acetato de sódio (20 mmol.L^{-1}, pH 4.5).

A reação enzimática foi realizada por incubação de 180 µL da suspensão de agarose-AChE*ee* (enzima imobilizada) ou 180 µL da enzima (livre em solução) com 20 µL da solução de substrato IV (200 µmol.L^{-1}) por 60 minutos a 37 °C. Posteriormente, a mistura foi transferida para uma cubeta de quartzo com a adição de 2000 µL de solução

de acetato de sódio (20 mmol.L^{-1}, pH 4.5), e realizado as medidas de fluorescência a λ_{em} = 495 nm (λ_{exc} at 355 nm).

III.2.6.3 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi realizada para BACE1 imobilizada e livre em solução. Este estudo foi realizado como descrito para a enzima AChE*ee* (Item III.2.5.3). A incubação, neste caso, foi realizada com solução de acetato de sódio 20 mmol.L^{-1}, pH 4,5 a 45°C até o período de tempo correspondente à completa perda de atividade pela enzima.

As análises foram realizadas como descrito no item III.2.5.3.

III.2.7 Co-imobilização AChE*ee* e BACE1 em agarose-EDA-glut (AChE*ee*+BACE1-agarose-EDA-glut)

III.2.7.1 Co-imobilização

O suporte agarose-EDA-glut foi previamente preparado como descrito no item III.2.4.3. O processo de co-imobilização foi realizado em uma etapa consistindo da incubação de; 1 g de suporte agarose-EDA-glut ressuspendido em 3 mL da solução de fosfato de sódio (200 mmol.L^{-1}, pH 6,0), e adicionado 0,18 mL de BACE1 (0,014 mg.mL^{-1}) seguido de 0,20 mL de AChE*ee* (1 mg.mL^{-1}). A suspensão foi mantida sob agitação branda durante 60 minutos. Amostras de sobrenadantes e suspensões foram retiradas e as atividades das enzimas foram mensuradas. A co-imobilização foi considerada completa quando não houve atividade no sobrenadante da suspensão. A eficiência de imobilização e a recuperação da atividade foram calculados como mencionado para imobilização AChE*ee* e BACE1, equação III.1 e 2.

III.2.7.2 Estudos com AChE*ee*+BACE1-agarose-EDA-Glut

O monitoramento da atividade no método co-imobilizado foi realizado separadamente, cada enzima com seu substrato específico. Estudos para a determinação da constante cinética K_{Map} e IC_{50} foram realizados para a BACE1.

III.2.7.2.1 Constante cinética (K_{Map}) para a BACE1 co-imobilizada

A suspensão do co-imobilizado foi preparado a partir de 0,3 g de AChE*ee*+BACE1-agarose-EDA-glut ressuspenso em acetato de sódio (20 mmol.L^{-1}, pH 4,5).

A K_{Map} foi determinada a partir da incubação de 20 µL da solução de substrato IV a várias concentrações (50, 100, 200, 300, 500, 1000 µmol.L^{-1}) com 180 µL da suspensão, durante 60 minutos a 37°C, preparado em triplicata. Após a incubação, 200 µL da suspensão co-imobilizada + substrato incubados foram transferidos a uma cubeta de quartzo diluído a 2000 µL com solução de acetato de sódio 20 mmol.L^{-1} pH 4,5, e realizado a leitura do aumento da intensidade de fluorescência a λ_{em} = 495 nm (λ_{exc} at 355 nm).

III.2.7.2.2 Potencia inibitória (IC_{50}) para a BACE1 co-imobilizada

Para avaliar os possíveis efeitos da co-imobilização na afinidade por inibição do derivado AChE*ee*+BACE1-agarose-EDA-glut, o inibidor de β-secretase [106] foi utilizado, destacando que foi o mesmo utilizado na parte I envolvendo a mesma enzima [46].

A potência inibitória foi determinada com a incubação de, 10 µL de solução de inibidor variando de 2,5 – 200 µmol.L^{-1} com 10 µL de substrato IV (10 µmol.L^{-1}) e 180 µL da suspensão do co-imobilizado, por 60 minutes a 37°C.

Após a incubação, 200 µL da suspensão co-imobilizada + substrato + inibidor incubados foram transferidos a uma cubeta de quartzo diluído a 2000 µL com solução de acetato de sódio 20 mmol.L^{-1} pH 4,5, e realizado a leitura do aumento da intensidade de fluorescência a λ_{em} = 495 nm (λ_{exc} at 355 nm).

A intensidade de fluorescência do produto obtida na presença (F_i) e ausência (F_0) do inibidor foi comparada e a porcentagem de inibição calculada pela expressão:% I = 100 - [(F_i / F_0) x 100]. A curva de inibição foi construída, os parâmetros de regressão não linear foram calculados e a IC_{50} extrapolada.

III.3 Resultados e discussão

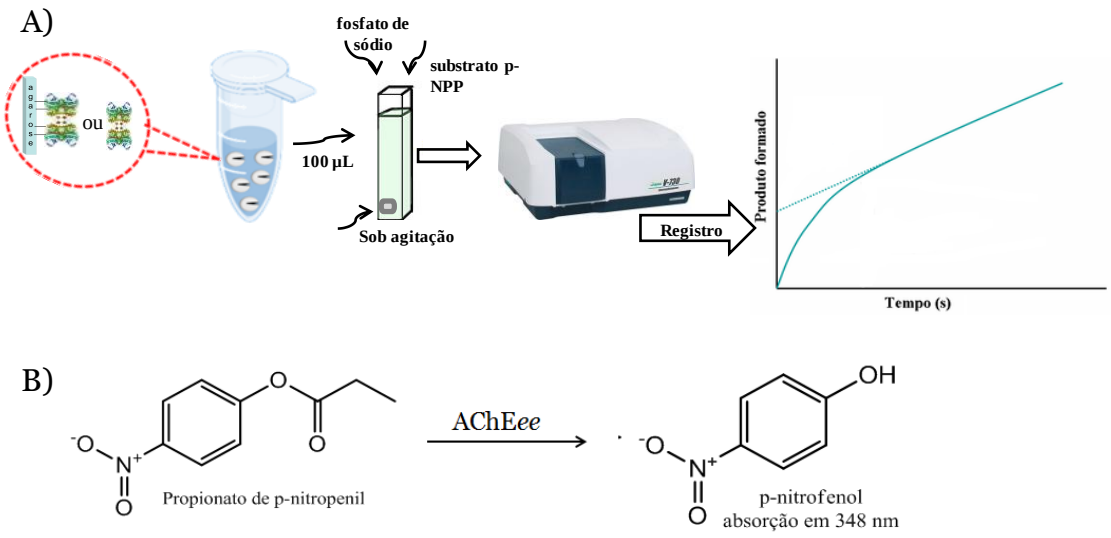
III.3.1 AChEee

III.3.1.1 Determinação da atividade

A determinação da atividade da AChE*ee* neste trabalho foi obtida por colorimetria empregando o substrato p-NPP, síntese reproduzida de [115]. Este substrato é incolor e, após a hidrólise da enzima gera um produto amarelo, o p-nitrofenol, monitorado a 348 nm [86]. Embora com menor afinidade, a AChE também catalisa esta classe de éster, sendo este um substrato alternativo.

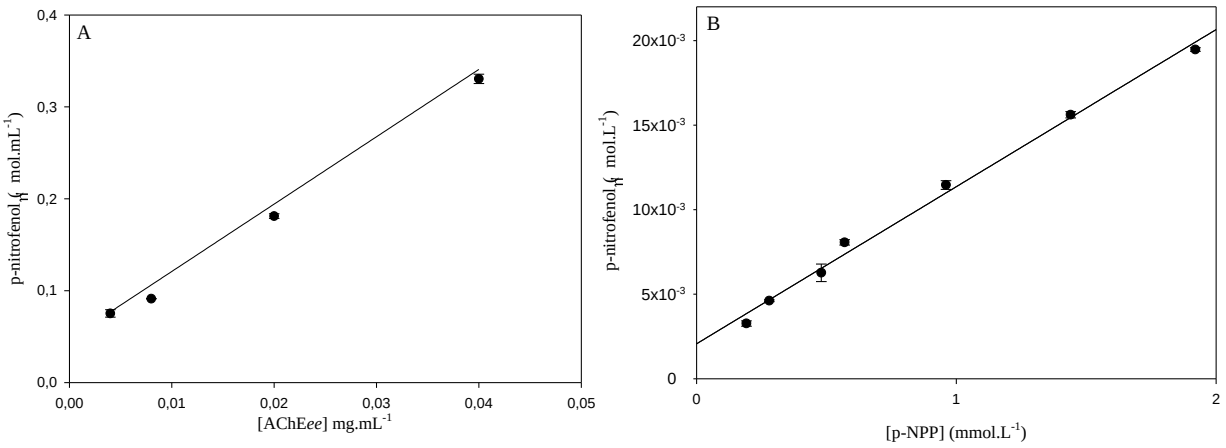
O esquema III.1 ilustra o procedimento realizado para o monitoramento da atividade da AChE*ee* (ensaio com a enzima em solução e imobilizada) empregando o substrato p-NPP.

Esquema III.1. A) Esquema ilustrativo do procedimento realizado para o monitoramento da atividade da AChE*ee* empregando p-NPP como substrato. B) Reação catalisada pela AChE.



Os testes iniciais de atividade revelaram que existe uma linearidade do aumento da concentração de produção do produto p-nitrofenol com o aumento da concentração de AChE*ee* sob fixa concentração de substrato (Figura III.1 A), e também na presença de concentração fixa de enzima e aumento da concentração de substrato (Figura III.1 B).

Figura III.1. Hidrólise enzimática da AChE*ee* com p-NPP em A) variação concentração de enzima e B) variação concentração de substrato.



Com estes resultados, o substrato p-NPP pôde ser utilizado para o monitoramento da atividade da AChE*ee*. No entanto, devido a problemas de solubilidade deste nas condições padronizadas para o ensaio de medida da atividade da enzima, não foi possível a obtenção da K_{Map}. Portanto, concentrações não excedentes a 2 mmol.L^{-1} foram utilizadas, faixa de 0,2 a 2 mmol.L^{-1}, garantindo a solubilidade do p-NPP nos experimentos realizados.

III.3.1.2 Preparo dos suportes

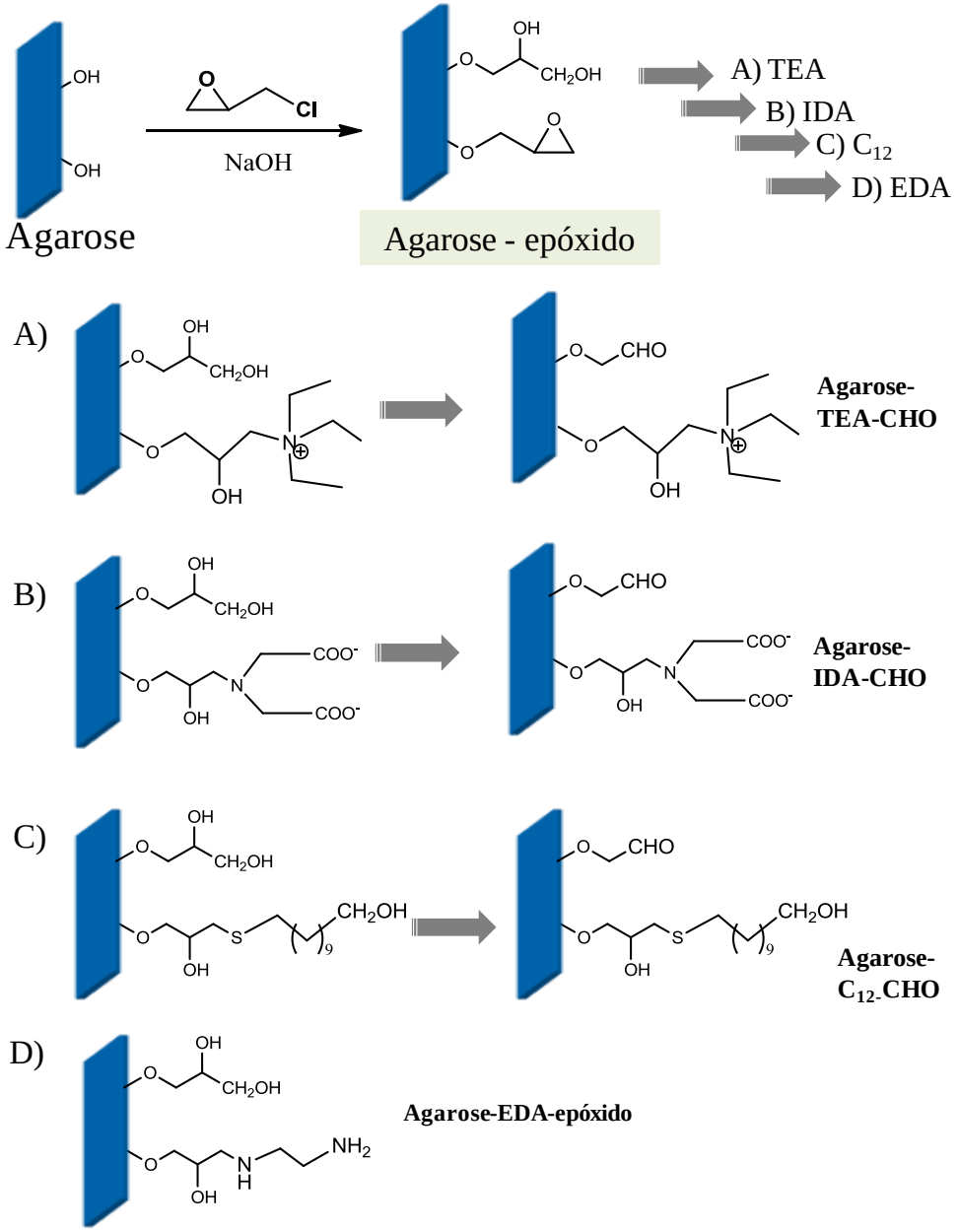
A agarose é um suporte amplamente utilizado como matriz para a imobilização de enzimas devido à presença dos grupos hidroxila, os quais podem ser facilmente modificados e/ou ativados gerando diferentes suportes podendo ser monofuncionais e bi-funcionais [118, 119].

A matriz agarose utilizada neste trabalho foi submetida à modificação de modo a promover grupos heterofuncionais capazes de direcionar a imobilização através de diferentes regiões da superfície enzimática. A figura III.2 esboça as reações envolvidas no preparo da heterofuncionalização dos suportes.

Primeiramente foi realizado um tratamento químico da agarose com epicloridrina, o que permitiu ativar a agarose com grupos epóxidos, que posteriormente foram modificados com diferentes reagentes nucleofílicos. Nestes estudos foram utilizados; TEA (figura III.2A), IDA-Ni^{2+}(figura III.2B), C_{12} (figura III.2C). Ao final, os grupos glicerila foram oxidados com $NaIO_4$ a grupos glioxila ou aldeídos (CHO). Com este

procedimento houve a modificação na matriz agarose fornecendo suportes contendo grupos aldeídos e catiônicos, aldeídos e hidrofóbicos, e, aldeídos e quelato de metal, disponíveis para a imobilização da enzima [23].

Figura III.2. Representação das reações químicas de heterofuncionalização dos suportes de Agarose.



Fonte: Adaptado de Mateo *et al.* (2010) [23].

A modificação do suporte agarose-epóxido com EDA (figura III.2D) sem a realização da oxidação com $NaIO_4$ também foi realizada a fim de verificar a sua eficiência de imobilização com a AChE*ee*. Os grupos epóxidos são capazes de realizar

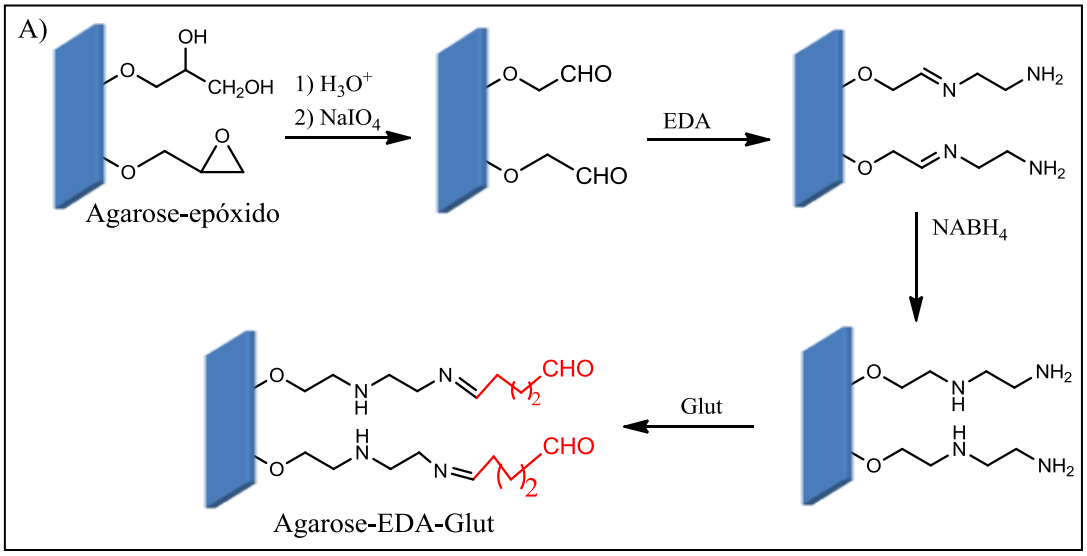
reações com diversos resíduos de aminoácidos presentes nas cadeias laterais das enzimas (amino, sulfidrila, e hidroxila, por exemplo) possibilitando que a imobilização seja multipontual estabilizando a enzima e evitando interações inespecíficas [119].

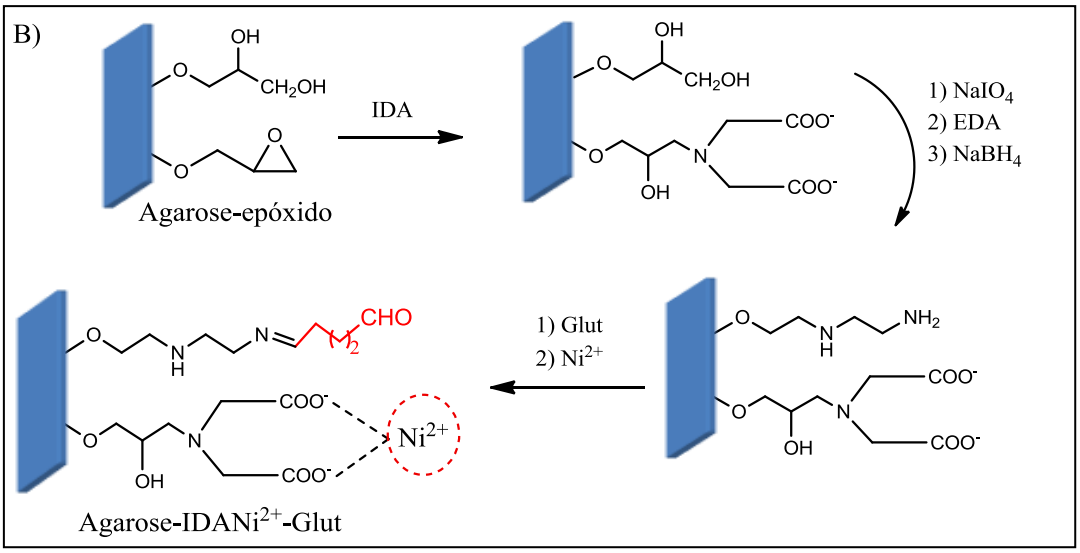
Portanto, estes suporte de agarose heterofuncionais preparados possuem a capacidade de realizar fortes ligações covalentes multipontuais com as enzimas. Além disso, estes apresentam alta estabilidade podendo ser armazenados por longos períodos de tempo a 4 °C, para posterior imobilização do alvo.

De modo a otimizar metodologias de imobilização para a AChE*ee* também foram utilizados suportes tratados com glutaraldeído, um reagente largamente utilizado para imobilização de enzimas devido a sua alta capacidade de reagir com vários grupos funcionais presentes nos resíduos de aminoácidos das enzimas, como os grupos; amino, tiol e fenil [25, 26, 120].

O processo de construção deste tipo de suporte partiu da ativação prévia com grupamentos aminos primários, seguidos então com glutaraldeído. Aqui, a agarose-epóxido previamente preparada, foi primeiramente funcionalizada com diferentes reagentes nucleófilos (EDA, e IDA-EDA) e a seguir os grupos aminos presentes reagiram com glutaraldeído [24]. Figura III.3.

Figura III.3. Representação das reações químicas da ativação dos suportes de agarose com glutaraldeído. A) agarose-EDA-Glut e B) agarose-IDANi^{2+}-EDA-Glut.





Fonte: Adaptada de de Melo *et al.* (2017) [24]

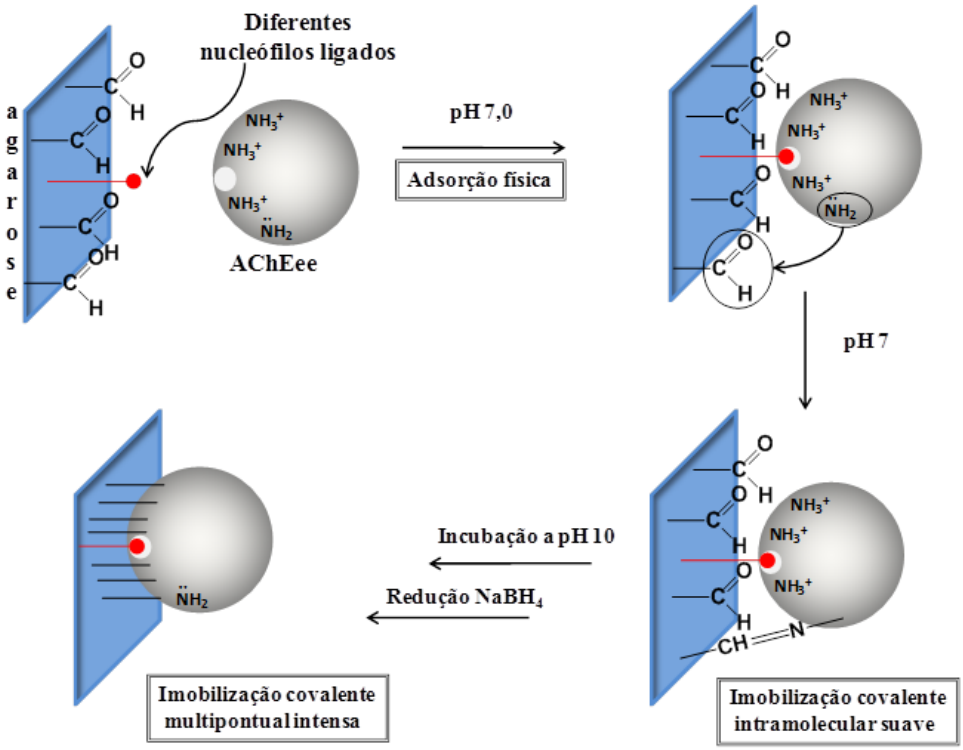
Os derivados com glutaraldeído não podem ser estocados devido à alta reatividade do glutaraldeído [26], e, portanto são preparados e em seguida utilizados.

III.3.1.3 Imobilização

A imobilização da AChE*ee* nos suportes heterofuncionais foi realizada em dois passos; no primeiro a enzima foi adsorvida ao suporte em pH 7,0, através de regiões da superfície da enzima que são complementares aos grupos adsorventes no suporte, e no segundo passo, os suportes com a enzima adsorvida foram incubados sob condições alcalinas propiciando ligação covalente multipontual entre os grupos aldeídos presentes no suporte com os grupos amino na superfície enzimática.

Nesta segunda etapa com o aumento do pH da solução é facilitado a reatividade dos grupos amino dos resíduos de lisina (lys) da enzima possibilitando o aumento da ligação da enzima ao suporte. Ao final, uma etapa de redução com $NaBH_4$, para estabilizar as ligações de amino-glioxil, foi realizada. Ilustração do processo na figura III.4.

Figura III.4. Ilustração das reações envolvidas no procedimento de imobilização sob suporte agarose-CHO.



Fonte: Adaptada de Mateo *et al.* (2010) [23].

A imobilização no suporte agarose-CHO foi realizada diretamente em pH alcalino seguido da redução, neste caso a imobilização é direcionada através da região mais rica em lys da enzima.

A imobilização de enzimas por ligação covalente multipontual, através dos grupos heterofuncionais utilizados aqui (espaçadores curtos), é uma abordagem útil para imobilizar enzimas devido à sua alta capacidade para estabilização da mesma. Sabe-se que a estabilidade de uma enzima imobilizada é determinada por muitos fatores, como; o número de ligações formadas entre a enzima e o suporte, a natureza das ligações, o microambiente, as condições da imobilização, etc. Neste caso, os grupos envolvidos na ligação covalente da enzima com o suporte mantêm suas posições quando agentes de distorção causam mudanças conformacionais no ambiente. Assim as alterações causadas por estes agentes são atenuadas uma vez que a enzima está ligada ao suporte através de muitas ligações covalentes com espaçadores curtos [121-123].

A imobilização envolvendo os suportes previamente ativados com glutaraldeído proporciona interação covalente e irreversível direta da enzima no suporte [24, 25]. Assim a AChE*ee* foi imobilizada em um etapa seguido de redução com $NaBH_4$ para estabilização das ligações amino e/ou redução de aldeídos residuais.

A tabela III.1 mostra os resultados da imobilização da AChE*ee* nos diferentes suportes de agarose. Os diferentes grupos heterofuncionais foram capazes de dirigir a imobilização por diferentes regiões da superfície da enzima, como zona mais rica em aminoácidos negativos, positivos, hidrofóbicos. E também, os grupos capazes de imobilizar a enzima covalentemente como o agarose-CHO, epóxido e glutaraldeído.

A imobilização nos diferentes suportes resultou em atividades enzimáticas diferentes após o processo, confirmando que se deve ao fato de que foi promovida por distintas regiões da superfície da enzima.

Tabela III.1. Quantificação do procedimento de imobilização da AChE*ee* realizado para cada suporte preparado.

Suportes	[a]*Eficiência imobilização (EI) %*	[b] *Atividade pós-imobilização (RA) %*
Agarose-CHO	96	30,3
Agarose-TEA-CHO	100	65
Agarose-EDA-epóxido	96	83,5
Agarose-IDA-Ni^{2+}-CHO	97	35,3
Agarose-IDANi^{2+}- Glut	96	80,6
Agarose-EDA-Glu	91,06	67,9
Agarose-C_{12}-CHO	80	30

[a] Calculado como a equação III.1, diferença entre a atividade final e inicial do sobrenadante após 1 hora de imobilização. [b] Calculado como equação III.2, medida da razão entre a atividade da suspensão do imobilizado e a atividade inicial da enzima em solução.

Conclui-se que os melhores resultados foram para os suportes catiônicos, Agarose-TEA-CHO, Agarose-EDA-epóxido, e os suportes com glutaraldeído. Os suportes aniônicos, Agarose-IDANi^{2+}-CHO e Agarose-C_{12}-CHO, proporcionaram baixa recuperação da atividade enzimática após a imobilização. Para o suporte agarose-CHO a recuperação também não foi obtida com êxito, tal observação pode ser decorrente do fato de ter sido utilizado pH 10, uma condição desnaturante para a enzima AChE*ee*.

A utilização de vários tipos de ativadores no suporte de agarose permitiu a seleção de um protocolo que mantenha ativa a enzima AChE*ee*, no entanto,para a seleção do(s) melhor(s) suporte(s) para a imobilização da AChE*ee* foi necessário avaliar a estabilidade de cadaum, deste modo, os estudos de estabilidade térmica foram conduzidos.

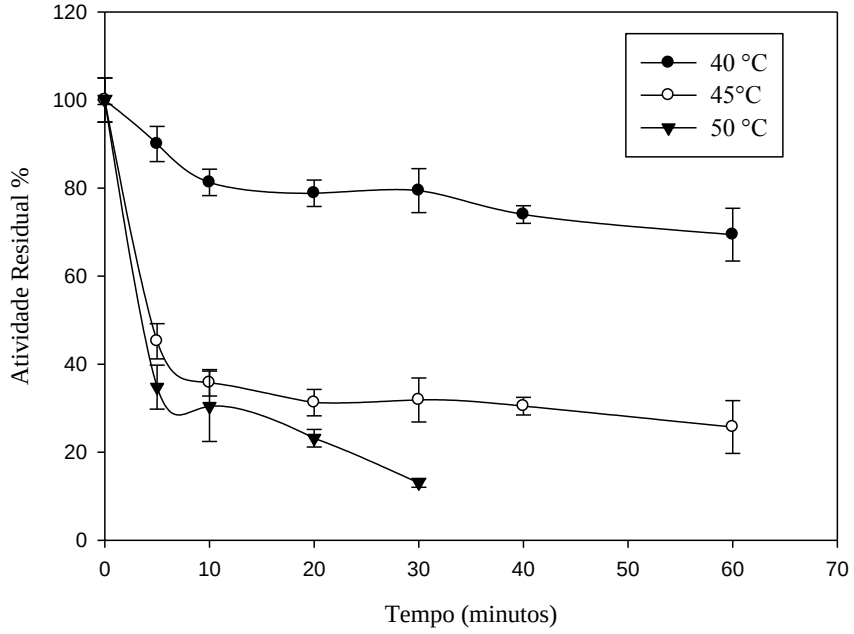
III.3.1.4 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi verificada para selecionar o agarose-AChE*ee* com maior estabilidade. Com este estudo foram obtidos informações sobre a estabilidade da enzima através dos valores do tempo de meia-vida (t½ vida) a uma dada temperatura. O t½ vida é correspondente ao tempo em que a atividade enzimática residual é metade do seu valor inicial.

A princípio um teste foi realizado para saber qual a temperatura ideal a ser utilizada para este estudo. Assim, três temperaturas (40, 45 e 50 °C) foram examinadas envolvendo a enzima livre em solução. Figura III.5.

Os t½ vida foram calculados sendo 141; 4; e 0,6 minutos para a AChE*ee* a 40°C, 45°C e 50°C respectivamente. Portanto, a temperatura selecionada equivalente a uma inativação da enzima de maneira satisfatória foi de 45 °C.

Figura III.5. Inativação térmica para a AChE*ee* livre em solução.



Todos os suportes com a AChE*ee* imobilizada (figura III.6 A, tabela III.2) resultaram em uma estabilidade maior do que para a enzima solúvel. O AChE*ee*-agarose-TEA-CHO resultou no mais estável, apresentando conservação da atividade após 240 minutos de incubação a 45ºC. Por esta razão este derivado foi submetido a novo ensaio de estabilidade a 50ºC e apresentou t½ vida de 120 minutos, figura III.6 B. Comparado com a enzima em solução (t½ vida 0,6 minutos), este imobilizado possui uma estabilidade cerca de 250 vezes maior.

Figura III.6. Inativação térmica para os derivados imobilizados e AChE em solução. A) a 45 °C e B) a 50°C.

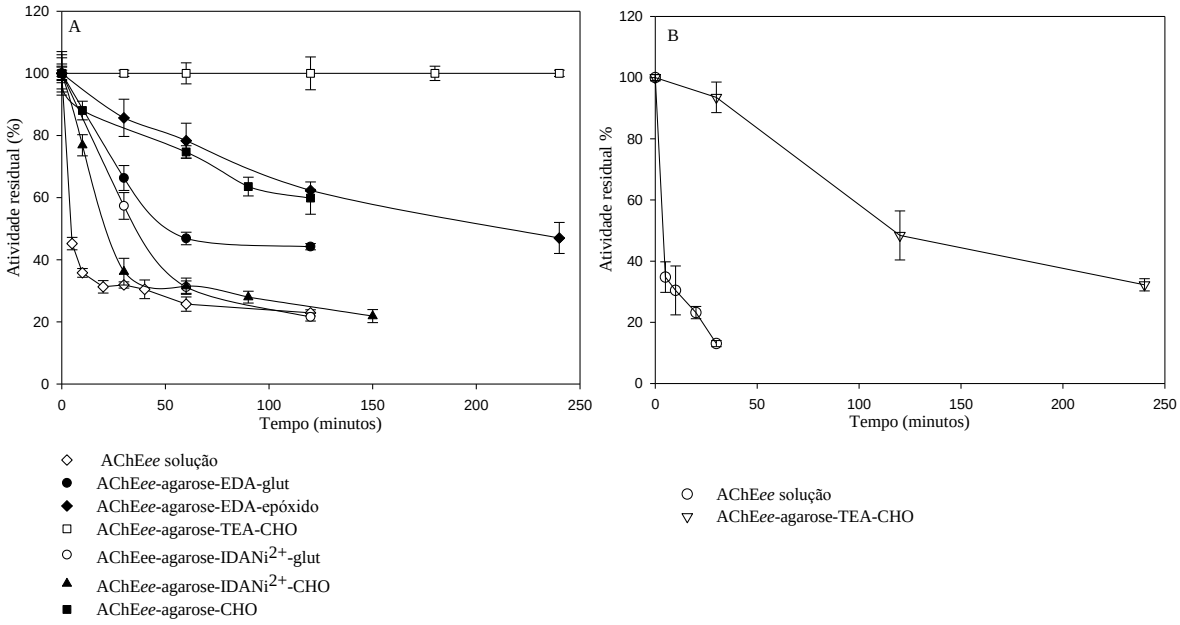


Tabela III.2. t½ vida para a AChE*ee* imobilizada e em solução.

Suportes de agarose com AChEee imobilizada	t½ *vida* [a] *a 45°C*	*Fator de estabilidade* [b]
AChE*ee* em solução	4	-
AChE*ee*-agarose-CHO	150	37,5
AChE*ee*-agarose-TEA-CHO	ND	50
AChE*ee*-agarose-EDA-epóxido	193	48
AChE*ee*-agarose-EDA-Glu	52	13
AChE*ee*-agarose-IDA-Ni^{2+}-CHO	22	5,5
AChE*ee*-agarose-IDANi^{2+}- Glut	35	8,75

[a], $t_{1/2}$ vida em minutos; [b], razão entre o derivado imobilizado e a enzima livre em solução. ND- não determinado.

III.3.1.5 Estudos de inibição

O suporte catiônico com a AChE*ee*, AChE*ee*-agarose-TEA-CHO, apresentou-se altamente estável e com preservação da atividade da enzima, e portanto foi selecionado para os estudos de validação do método para triagem com inibidores. Sendo assim, os diferentes parâmetros-chave nos processos de inibição como, IC_{50}, K_i e a avaliação do mecanismo de ação para a inibição utilizando tacrina como um inibidor padrão [124] foram determinados.

Cabe enfatizar que a AChE*ee* foi imobilizada por um processo de ligação covalente multipontual, o que pode promover distorção da estrutura tridimensional dos sítios ativos e alostéricos da enzima, podendo assim, causar a perda da afinidade por inibidores, como já descrito em alguns casos para inibições competitivas ou inibições alostéricas [125, 126]. Assim sendo, os estudos de inibição com a enzima imobilizada comparados com os resultados para a enzima em solução também nos indicará se houve mudanças após a imobilização.

As figuras III.7 e 8 representam os resultados, e estes mostraram que a afinidade por inibição da enzima não só foi mantida, mas ligeiramente melhorada após o processo de imobilização. Assim, o valor IC_{50} diminui de 0,035 (ensaio com a enzima em solução) para 0,0204 $\mu mol.L^{-1}$ (ensaio com a enzima imobilizada), bem como o valor da constante de inibição (K_i) que diminuiu de 0,083 para 0,064 $\mu mol.L^{-1}$ durante o processo de imobilização. Esta melhoria nos valores de inibição pode ser devido à distorção promovida durante a imobilização e estabilização da estrutura 3D da enzima que neste caso produziu um efeito positivo. Este resultado torna este suporte agarose-TEA-CHO ideal para estudos posteriores na aplicação de ensaio com ligantes.

Figura III.7. Curva dose-resposta de inibição. A) log da concentração de tacrina contra AChE*ee* em solução e (B) log da concentração de tacrina contra AChE*ee*-agarose-TEA-CHO.

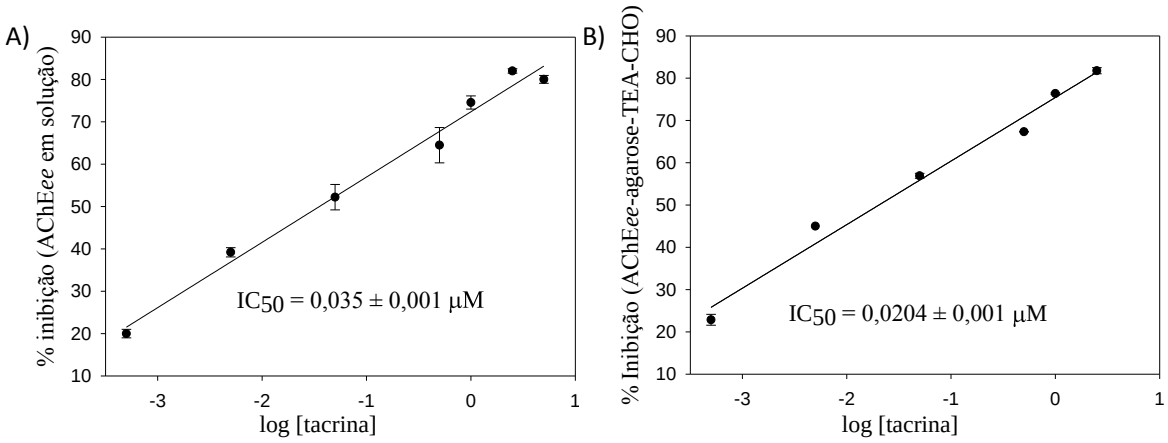
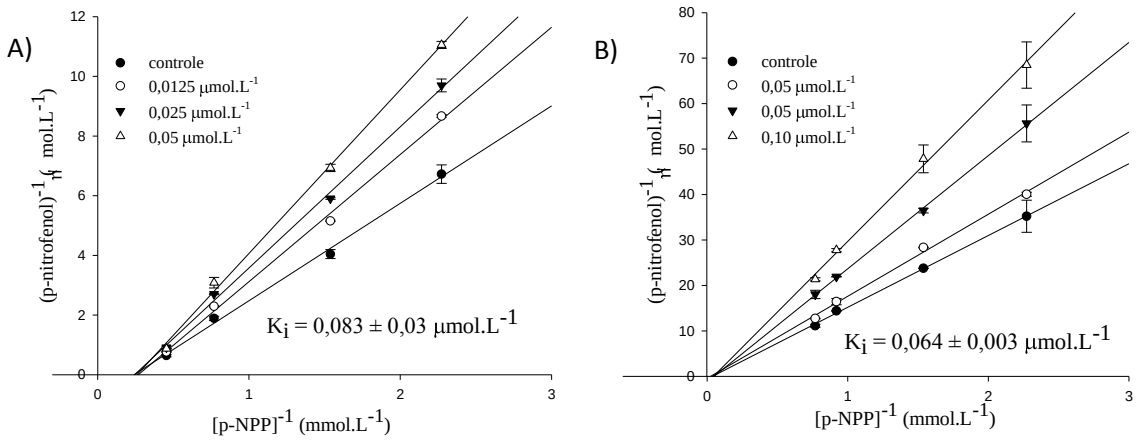


Figura III.8. Duplo recíproco Lineweaver–Burk. A) tacrina contra AChE*ee* solúvel e B) tacrina contra AChE*ee*-agarose-TEA-CHO.



Os gráficos duplos recíprocos para a enzima livre em solução e imobilizada, preparado AChE*ee*-agarose-TEA-CHO, demonstraram que, em ambos os casos, as linhas se cruzam em um mesmo ponto, no quadrante acima do eixo x e a direita do eixo y, e a $V_{Máx}$ diminui à medida que a concentração de tacrina aumenta. Este comportamento é típico de um mecanismo do tipo misto, resultados estes que corroboram com outros trabalhos envolvendo este inibidor e a enzima livre em solução [80, 127].

Assim, conclui-se que AChE*ee*-agarose-TEA-CHO, além de apresentar alta estabilidade frente a enzima solúvel, permitiu a caracterização do inibidor padrão, permitindo a aplicação na triagem de potenciais inibidores de Colinesterases (ChE).

III.3.1.6 Determinação da constante de dissociação (K_D) e fração de saturação (Y)

O AChE*ee*-agarose-TEA-CHO também foi aplicado nos estudos de outros parâmetros com interesse na caracterização do processo de ligação da enzima-inibidor (EI), como K_D e Y.

A constante K_D é a dissociação do complexo EI e pode ser determinada através de ensaios de afinidade para a avaliação da especificidade da interação EI. Assim sendo, esta constante está relacionada com a força da formação do complexo enzimático EI.

A fração de saturação Y indica o limite de saturação da interação EI, sugerindo a proporção de inibidor que se liga as moléculas da enzima. Valores de Y igual a 0 indicam o limite mínimo de moléculas de enzima ligada ao inibidor, e Y igual a 1 indica que todas as moléculas de enzima estão ligadas ao inibidor.

Este parâmetro também dá ideia sobre possíveis efeitos da dependência dos sítios ativos para enzimas com mais de um sítio para a ligação com inibidor, como efeito

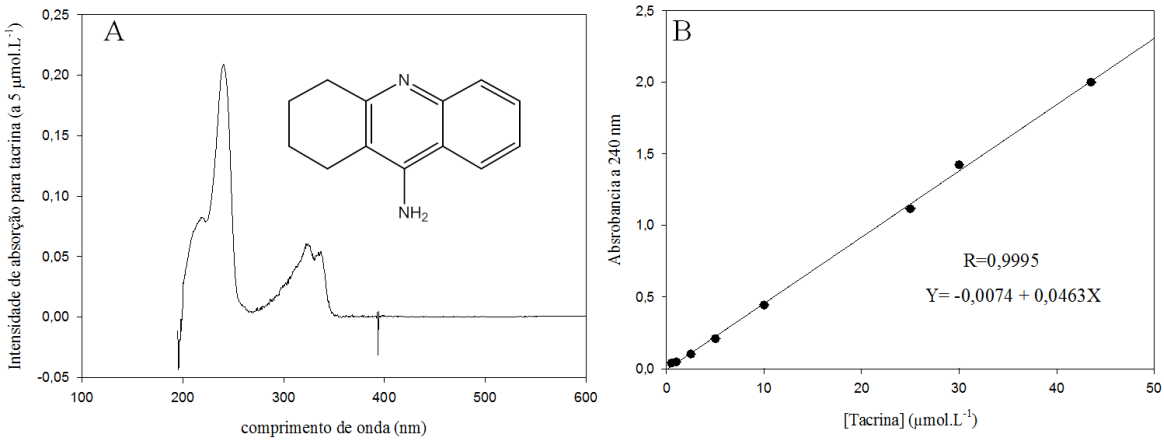
cooperativo (negativo ou positivo), onde neste caso a curva de saturação da enzima pelo inibidor se apresenta em forma de uma sigmóide, ou se não há cooperatividade, curva na forma de uma hipérbola retangular.

A AChE*ee* utilizada possui quatro sítios ativos para a interação com um ligante, devido a isto, a proporção de moléculas de proteína que se liga ao inibidor e também a dependência destes sítios entre si foram investigados.

Este ensaio envolveu equilíbrio termodinâmico do processo da interação EI, assim sendo, tacrina foi utilizada por ser um inibidor reversível. Ciclos para a adsorção-dessorção da tacrina em AChE*ee*-agarose-TEA-CHO foram estudados.

Os experimentos para a absorção da tacrina mostraram absorção máxima no comprimento de onda de 240 nm, como pode ser observado no espectro de absorção na figura III.9A. Uma curva de calibração foi então realizada em 240 nm para a quantificação da tacrina no ensaio realizado (figura III.9B).

Figura III.9. A) espectro de absorção no UV para tacrina a 5 μmol.L^{-1}, e **B)** curva de calibração a 240 nm para tacrina.

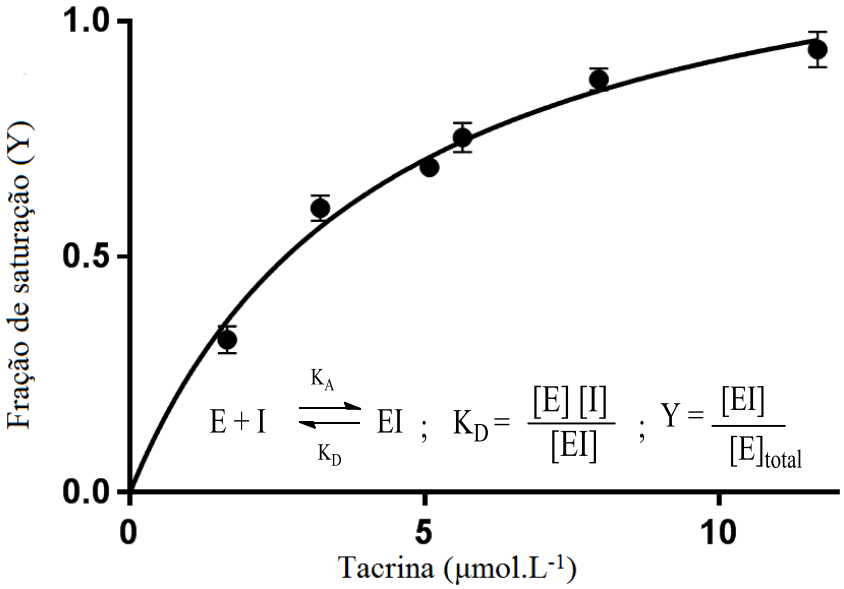


A formação do complexo EI é dependente de vários fatores como; o número de sítios ativos da enzima, a concentração de inibidor, e estes são dependentes das condições experimentais aplicadas. Assim, a fim de verificar o efeito das condições experimentais na absorção de tacrina, foi realizado alterações no pH e na força iônica da solução fosfato de sódio utilizada no ensaio. Os resultados não mostraram nenhuma mudança significativa, e as condições determinadas para as medidas foram; solução fosfato de sódio a 25 mmol.L^{-1}, pH 7,0, a λ = 240 nm.

A condição padronizada para o ensaio, sendo 0,3 g de AChE*ee*-agarose-TEA-CHO ressuspendido em 1 mL de solução fosfato de sódio (25 mmol.L^{-1}) com a adição de 100 µL de tacrina, apresentou 20 % de adsorção da tacrina. O equilíbrio da adsorção-dessorção foi mantido com dessorção da tacrina em 10 mL de água, permanecendo 2% de tacrina no sistema, o qual foi lavado com solução de fosfato de sódio (1 mmol.L^{-1}) completando o primeiro ciclo.

A adsorção-dessorção para tacrina (várias concentrações) no derivado foram realizados e a K_D determinada. A Figura III.10 mostra a curva de saturação obtida em diferentes concentrações de tacrina frente ao AChE*ee*-agarose-TEA-CHO. Esta curva é claramente uma hipérbole retangular sem efeitos cooperativos e, portanto o valor de K_D para a dissociação é o mesmo para todos os sítios ativos da enzima. O valor de K_D calculado por extrapolação da curva foi de 3,3 µmol.L^{-1}.

Figura III.10. Curva de saturação para o equilíbrio entre tacrina e AChE*ee*-agarose-TEA-CHO.

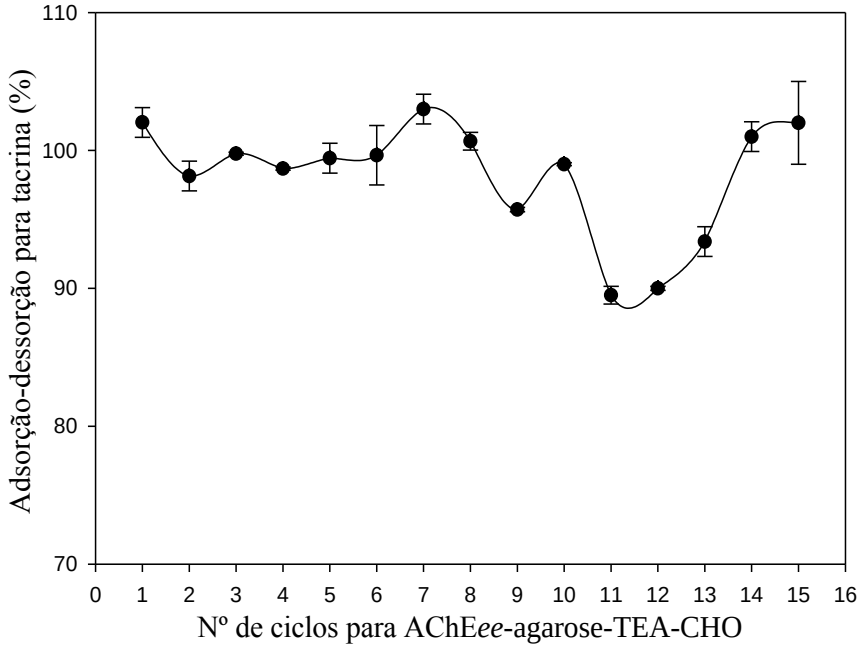


III.3.1.7 Reutilização

Para a reutilização do AChE*ee*-agarose-TEA-CHO uma etapa de lavagem necessitou ser realizada. O derivado foi lavado 3 vezes com solução fosfato de sódio 25 mmol.L^{-1}, pH 7,0) posteriormente resuspendido com 10 mL e filtrado. Após este procedimento o derivado pôde ser reutilizado novamente para a adsorção-dessorção com inibidor.

O AChE-agarose-TEA-CHO foi reutilizado por 15 vezes com uma perda insignificante de afinidade (Figura III.11).

Figura III.11. Reciclos para a adsorção-dessorçao da tacrina no derivado AChE*ee*-agarose-TEA-CHO.



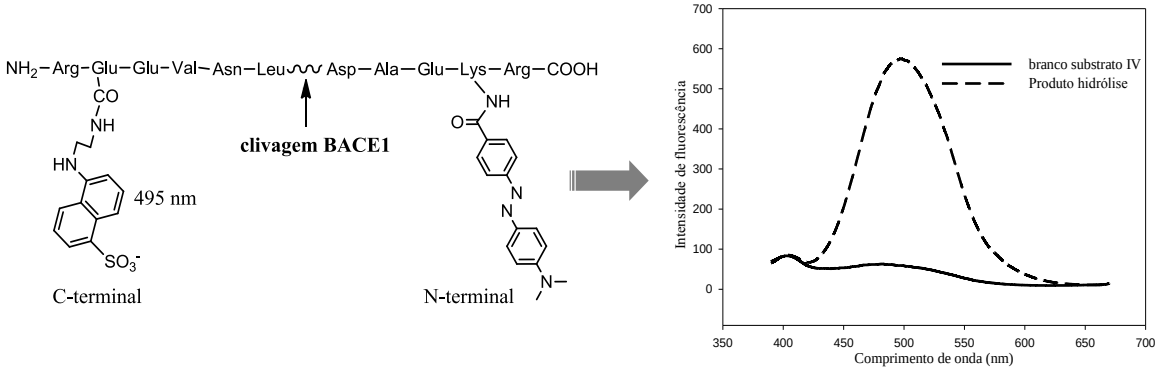
O estudo de adsorção-dessorção mostrou que o método *off-line*, AChE-agarose-TEA-CHO é uma ferramenta robusta para o uso contínuo com uma vida operacional relativamente alta.

III.3.2 BACE1

III.3.2.1 Determinação da atividade

A atividade foi monitorada por detecção em fluorescência através do uso do Substrato IV, um peptídeo com grupos fluoróforos a λ_{em} = 495 nm (λ_{exc} at 355 nm). A figura III.12, ilustra a clivagem do substrato IV em presença da BACE1 e o espectro de fluorescência obtido para a enzima livre em solução.

Figura III.12. Espectro de fluorescência obtido pela hidrólise enzimática com a BACE1 em solução e substrato IV a 20 μmol.L^{-1}. Condições: solução de acetato de sódio, 20 mmol.L^{-1}, pH 4.5, λ_{em} = 495 nm (λ_{exc} at 355 nm).



III.3.2.2 Imobilização e estabilidade térmica

A imobilização para a BACE1 foi realizada empregando os mesmos suportes e etapas da AChE*ee*, envolvendo os mesmos princípios. Na tabela III.3 foram compilados os resultados.

A eficiência de imobilização foi satisfatória em todos os diferentes suportes utilizados, porém, a atividade da enzima após a imobilização somente foi resgatada quando imobilizada via glutaraldeído. estes resultados corroboram com outros estudos com a BACE1 imobilizada, uma vezque esta é uma técnica comumente utilizada. [46, 97].

Tabela III.3. Quantificação da imobilização da BACE1 em cada suporte preparado.

Suportes	pH da imobilização	[a]Eficiência da imobilização (%)	[b] Atividade pós-imobilização (%)
Agarose-TEA-CHO	7,0	100	não
	6,0	77,7	21,1
Agarose-CHO	10,0	82	não
Agarose-EDA-glut	7,0	91	3,1
	6,0	100	66,6
Agaraose-IDA-Co^{2+}-CHO	7,0	100	não
Agarose-IDA-Ni^{2+}-CHO	4,5	100	não

[a] Calculado como a equação III.1, diferença entre a atividade final e inicial do sobrenadante após 1 hora de imobilização. [b] Calculado como equação III.2, medida da razão entre a intensidade do sinal de fluorescência da suspensão do imobilizado e a a intensidade do sinal de fluorescência inicial da enzima em solução.

A variação do pH das soluções de imobilização foi realizada na tentativa de melhorar a reatividade dos grupos funcionais presentes na superfície da enzima. Entretanto, não houve melhora significativa na atividade da enzima após o processo de imobilização quando utilizado os suportes; agarose-TEA-CHO, agarose-CHO, agarose-IDA-Co^{2+}-CHO e agarose-IDA-Ni^{2+}-CHO. Assim, a condição selecionada para a imobilização da BACE1 foi agarose-EDA-glut em pH 6,0. O imobilizado BACE1-agarose-EDA-glut foi submetido ao estudo de estabilidade e os resultados comparados com os resultados obtidos para a enzima livre em solução, vide tabela III.4.

Tabela III.4. $t_{1/2}$ vida para a BACE1 imobilizada e solução.

suportes	(t½)*vida a 45°C (minutos)*	*Fator de estabilidade* [b]
BACE1 solução	4,5	ND
BACE1-agarose-EDA-glut	185	41

[a], $t_{1/2}$ vida em minutos; [b], razão entre o imobilizado e a enzima solúvel. ND, não determinado

O imobilizado BACE1-agarose-EDA-glut apresentou uma estabilidade 41 vezes maior que para a enzima em solução, demonstrando assim a eficiência do processo em estabilizar a enzima frente a fatores desnaturantes como a temperatura.

Diante de todo o exposto, o suporte agarose-EDA-Glut foi selecionado para a co-imobilização das enzimas, AChE*ee* e BACE1.

III.3.3 Co-imobilização AChE*ee*+BACE1

As condições ótimas para a enzima BACE1 foram as determinantes para a seleção do método para a co-imobilização.

O método co-imobilizado *off-line*, AChE*ee*+BACE1-agarose-EDA-glut (figura III.3A) apresentou resultados similares aos estudos realizados para cada enzima individualmente.

O monitoramento consistiu da realização das análises nas condições ótimas para a AChE*ee* no espectrofotômetro empregando o p-NPP e para a BACE1 no fluorímetro utilizando seu substrato específico, o denominado substrato IV.

As eficiências da co-imobilização foram 94,3% e 93% para AChE*ee* e BACE1, respectivamente, e a atividades após o processo foram de 66,6% e 71% para AChE*ee* e

BACE1, respectivamente. Deste modo, o processo utilizado foi eficiente para ambas às enzimas.

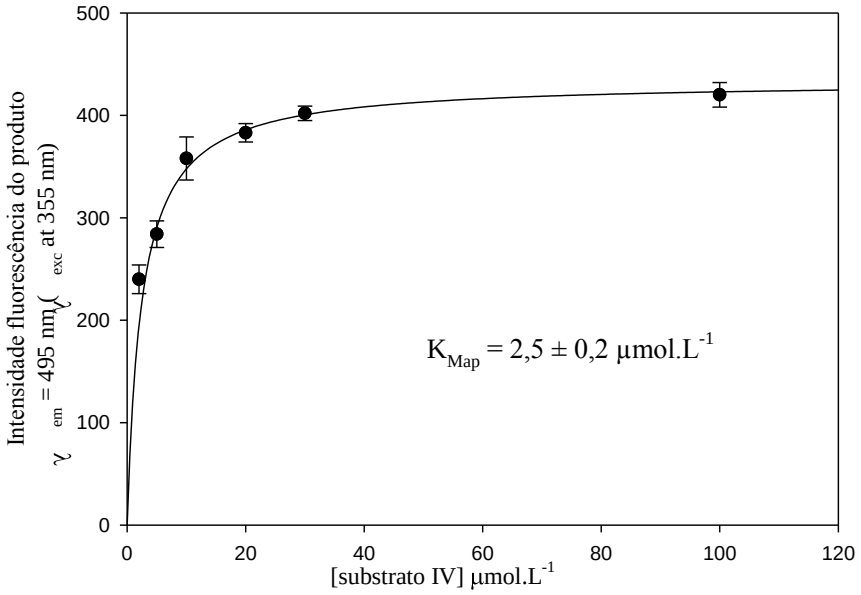
Os estudos a seguir foram realizados somente para a BACE1.

III.3.3.1 Ensaio com AChEee+BACE1-agarose-EDA-Glut

1- Constante cinética aparente para a BACE1 (K_{Map})

Aumentos da intensidade de fluorescência causada pela hidrólise da BACE1 empregando concentrações crescentes de substrato IV no derivado AChE*ee*+BACE1-agarose-EDA-glut foram monitorados e o valor obtido de K_{Map} foi 2,5 ± 0,2 μmol.L^{-1}. Figura III.13.

Figura III.13. Hipérbole de Michaelis para a BACE1 co-imobilizada empregando o substrato IV a λ_{em} = 495 nm (λ_{exc} at 355 nm).



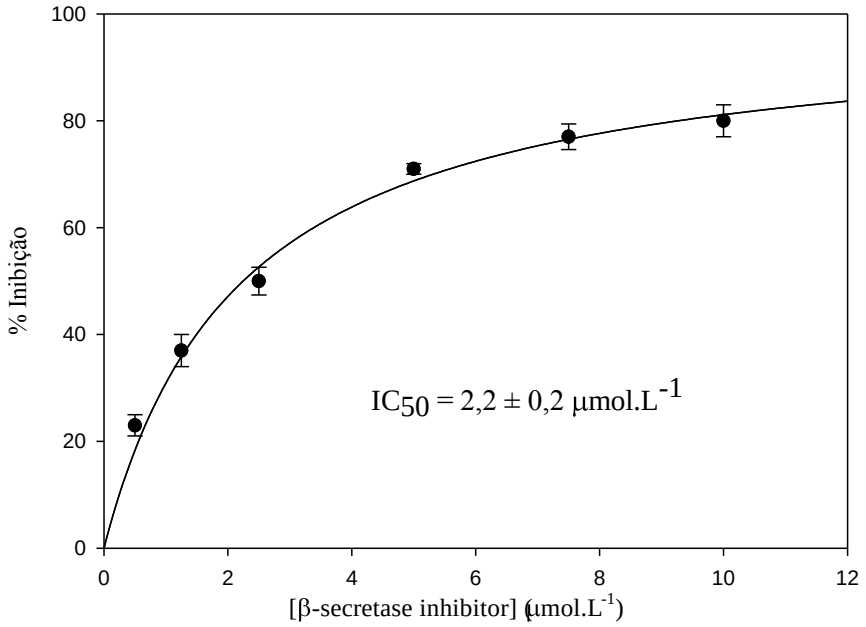
Curva com perfil hiperbólico de acordo com estudos já realizados para a BACE1 imobilizada [46, 50]. A co-imobilização manteve a propriedade cinética da enzima com relação ao reconhecimento do substrato sem alteração de perfil Michaeliano.

2- Potência Inibitória (IC_{50})

O inibidor de β-secretase, avaliado aqui para a BACE1 mostrou que a co-imobilização também não alterou as propriedades de inibição da BACE1.

O IC_{50} obtido 2,2 ± 0,2 µmol.L^{-1} (Figura III.14), demonstrou que a enzima teve a capacidade de identificar seu inibidor referência.

Figura III.14. Curva dose-resposta de inibição da atividade da BACE1 co-imobilizada utilizando o substrato IV (10 µmol.L^{-1}) na presença de diferentes concentrações de inibidor de β-secretase a λ_{em} = 495 nm (λ_{exc} at 355 nm).



III.4 Conclusão parte III

Como conclusão mais relevante desta etapa do trabalho tem-se que, os diferentes suportes de esferas de agarose para a imobilização desenvolvidos permitiu o uso de diferentes métodos para a imobilização da AChE*ee*, ressaltando que pela primeira vez para esta enzima.

O suporte selecionado (Agarose-TEA-CHO), um derivado catiônico-aldeído, revelou-se o melhor método para a imobilização da AChE*ee*, e, devido a sua alta estabilidade permitiu o uso e a caracterização do inibidor padrão tacrina, demonstrando que o método desenvolvido possui a capacidade de triar potenciais inibidores de colinesterase, em um curto período de tempo (1 minuto).

O uso do substrato p-NPP foi avaliado com êxito permitindo o monitoramento da atividade enzimática em 1 minuto, sendo uma alternativa ao uso do ensaio colorimétrico por Ellman (1961), que apresenta inúmeros casos de falso positivo em ensaios de triagem.

Os estudos dos parâmetros de caracterização de inibidores, resultaram no conhecimento da dissociação da interação entre a AChE*ee* e o inibidor tacrina. Os

parâmetros (IC_{50} e K_i) indicaram a medida da dissociação da interação a partir de variações na concentração de inibidor, determinando os efeitos causados nos parâmetros cinéticos da enzima. E os valores obtidos de K_D e Y para a tacrina forneceram informações importantes sobre o sítio ativo da enzima indicando que não há cooperatividade entre as constantes de equilíbrio para cada sítio ativo. Portanto, foi possível caracterizar toda a interação existente entre EI tanto em aspectos cinéticos (IC_{50} e K_i), quanto termodinâmicos (K_D e Y).

Deste modo, o derivado preparado (AChE*ee*-agarose-TEA-CHO) revelou-se uma ferramenta valiosa para a caracterização de novos ligantes de colinesterase.

Quanto à enzima BACE1, a otimização dos métodos de imobilização para BACE1 foi realizada com sucesso, e o melhor método de ligação para BACE1 foi através do glutaraldeído, em acordo com outros métodos relatados na literatura. O método agarose-EDA-glut demonstrou estabilidade em torno de 41 vezes em comparação com a enzima solúvel, sendo selecionado para co-imobilização.

O método co-imobilizado *off-line* provou ser eficiente evidenciado nas atividades das enzimas após o processo. Aqui, o formato do ensaio favoreceu a utilização do monitoramento das enzimas em suas condições ótimas de pH.

Os estudos cinéticos realizados para a BACE1 no sistema AChE*ee*+BACE1-agarose-EDA-glut, K_{Map} e IC_{50}, foram obtidos com êxito, porém com necessidade de um tempo de incubação de 60 minutos antes das análises. O preparado co-imobilizado, 1g, foi reutilizado nestes estudos por 10 vezes com manutenção da atividade das enzimas.

3.Conclusão final

Diante de todo o trabalho realizado, conclui-se que os objetivos principais do trabalho, o desenvolvimento de metodologias com monitoramento *on-line* para a BACE1 imobilizada e AChE-BACE1 co-imobilizada, foram alcançados com êxito. Enfatizando que metodologias *off-line* também foram desenvolvidas com sucesso.

As metodologias aqui desenvolvidas são inéditas tanto para a AChE quanto para a BACE1.

O desenvolvimento do método de co-imobilização foi desafiador, uma vez que se tratava de enzimas com propriedades cinéticas distintas. Devido a isto, a otimização do processo foi realizada previamente para cada enzima individualmente, gerando os modelos de triagem descritos neste trabalho, ampliando a possibilidade de modelos para a triagem de ligantes.

Os estudos das condições ideais de imobilização para a enzima BACE1 em capilar de sílica fundida, bem como a otimização das condições de análise por EM foram realizadas com sucesso, facilitando o uso das mesmas no método da co-imobilização.

Os métodos de imobilização para a AChE e BACE1 em agarose desenvolvidos também foram de grande valia, uma vez que os sistemas preparados forneceram estabilidade e atividade para as enzimas após a imobilização. Apesar dos estudos para a BACE1 não apresentarem possibilidade de variações no método de ligação da enzima no suporte, foi possível direcionar a co-imobilização pela BACE1.

Deste modo, uma vez avaliadas as condições de imobilização e análise individualmente de cada enzima, pôde ser realizado a co-imobilização *on-line*. Esta mostrou-se eficaz na determinação da K_{Map} e para o teste pontual com os inibidores padrão, demonstrando ser uma ferramenta analítica valiosa para a aplicação na triagem de novos ligantes. Os resultados foram reprodutíveis, seletivos e automatizados.

A co-imobilização aqui realizada juntamente com o sistema CLAE-EM é uma metodologia inovadora nos ensaios de alta eficiência, criando um sistema com capacidade de mimetização de um sistema composto por duas enzimas *in vitro* contribuindo para a avaliação das interações específicas de um ligante contra dois alvos biológicos.

O método covalente via amino-glutaraldeído provou ser eficiente promovendo a co-imobilização da AChE e BACE1 em duas matrizes distintas fornecendo modelos de ensaios com formatos diferentes que podem ser aplicados de acordo com as ferramentas

analíticas disponíveis, desde as mais simples como espectrofotometria no UV-Vis, fluorescência, aos mais sofisticados e automatizados como CLAE-EM.

Referências bibliográficas[3]

1. Copeland, R.A., *Why Enzymes as Drug Targets?*, in *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*2013, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-23.
2. Bisswanger, H., *Enzyme assays.* Perspectives in Science, 2014. **1**(1–6): p. 41-55.
3. Cao, L., *Introduction: Immobilized Enzymes: Past, Present and Prospects*, in *Carrier-bound Immobilized Enzymes*2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1-52.
4. Brena, B.M. and F.B. Viera, *A Literature Survey*, in *Immobilization of Enzymes and Cells*, J.M. Guisan, Editor 2013: Springer Science+Business Media, New York.
5. Homaei, A.A., et al., *Enzyme immobilization: an update.* Journal of Chemical Biology, 2013. **6**(4): p. 185-205.
6. Sirisha, V.L., A. Jain, and A. Jain, *Chapter Nine - Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes*, in *Advances in Food and Nutrition Research*, S.-K. Kim and F. Toldrá, Editors. 2016, Academic Press. p. 179-211.
7. Silber, B.M., *Driving Drug Discovery: The Fundamental Role of Academic Labs.* Science Translational Medicine, 2010. **2**(30): p. 16.
8. Cardoso, C.L., M.C. de Moraes, and Q.B. Cass, *Immobilization of the Enzymes on Chromatographic Supports: A Tool to Research of Inhibitor Compounds.* Química Nova, 2009. **32**(1): p. 175-187.
9. de Moraes, M.C., et al., *New trends in LC protein ligand screening.* Journal of Pharmeutical and Biomedical Analysis, 2014. **87**: p. 155-166.
10. de Moraes, M.C., et al., *Targeting Anti-Cancer Active Compounds: Affinity-Based Chromatographic Assays.* Current Pharmaceutical Design, 2016. **22**(39): p. 5976-5987.
11. Cheetham, P.S.J., *Immobilized enzymes: An introduction and applications in biotechnology: By MD Trevan. pp 138. John Wiley & Sons. Chichester, UK. 1980. £8.75.* Biochemical Education, 1981. **9**(3): p. 119-119.
12. Datta, S., L.R. Christena, and Y.R. Rajaram, *Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials.* 3 Biotech, 2013. **3**(1): p. 1-9.
13. Sheldon, R.A. and S. van Pelt, *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how.* Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6223-35.
14. Jesionowski, T., J. Zdarta, and B. Krajewska, *Enzyme immobilization by adsorption: a review.* Adsorption, 2014. **20**(5-6): p. 801-821.
15. Cao, L., *Covalent Enzyme Immobilization*, in *Carrier-bound Immobilized Enzymes*2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 169-316.
16. Secundo, F., *Conformational changes of enzymes upon immobilisation.* Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6250-61.
17. Cao, L., *Enzyme Entrapment*, in *Carrier-bound Immobilized Enzymes*2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 317-395.
18. Cao, L., *Enzyme Encapsulation*, in *Carrier-bound Immobilized Enzymes*2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 397-448.
19. Velasco-Lozano, S., et al., *Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review.* Biocatalysis, 2016. **1**(1).

[3] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

20. Mateo, C., et al., *A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates.* Biotechnology Bioengineering, 2004. **86**(3): p. 273-6.
21. Cao, L., L.v. Langen, and R.A. Sheldon, *Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?* Current Opinion in Biotechnology, 2003. **14**(4): p. 387-394.
22. Mateo, C., et al., *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.* Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**(6): p. 1451-1463.
23. Mateo, C., et al., *Improvement of Enzyme Properties with a Two-Step Immobilizaton Process on Novel Heterofunctional Supports.* Biomacromolecules, 2010. **11**(11): p. 3112-3117.
24. de Melo, R.R., et al., *New Heterofunctional Supports Based on Glutaraldehyde-Activation: A Tool for Enzyme Immobilization at Neutral pH.* Molecules, 2017. **22**(7): p. 1088.
25. Barbosa, O., et al., *Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization.* Rsc Advances, 2014. **4**(4): p. 1583-1600.
26. Migneault, I., et al., *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking.* Biotechniques, 2004. **37**(5): p. 790-6, 798-802.
27. Romero, O., et al., *Novel enzyme-polymer conjugates for biotechnological applications.* PeerJ, 2013. **1**: p. e27.
28. Alnoch, R., et al., *New Tailor-Made Alkyl-Aldehyde Bifunctional Supports for Lipase Immobilization.* Catalysts, 2016. **6**(12): p. 191.
29. Cao, L., *Unconventional Enzyme Immobilization*, in *Carrier-bound Immobilized Enzymes*2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 449-549.
30. Rodrigues, R.C., et al., *Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization.* Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6290-307.
31. Betancor, L. and H.R. Luckarift, *Co-immobilized coupled enzyme systems in biotechnology.* Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 2010. **27**(1): p. 95-114.
32. O'Reilly, A.M. and J.A. Scott, *Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures.* Enzyme and Microbial Technology, 1995. **17**(7): p. 636-646.
33. Kang, W., et al., *Cascade Biocatalysis by Multienzyme–Nanoparticle Assemblies.* Bioconjugate Chemistry, 2014. **25**(8): p. 1387-1394.
34. Du, K., et al., *Specific Ligation of Two Multimeric Enzymes with Native Peptides and Immobilization with Controlled Molar Ratio.* Bioconjugate Chemistry, 2017. **28**(4): p. 1166-1175.
35. Zhang, H., R. Liu, and J. Zheng, *Selective determination of cholesterol based on cholesterol oxidase-alkaline phosphatase bienzyme electrode.* Analyst, 2012. **137**(22): p. 5363-5367.
36. Schoffelen, S. and J.C.M. van Hest, *Chemical approaches for the construction of multi-enzyme reaction systems.* Current Opinion in Structural Biology, 2013. **23**(4): p. 613-621.
37. Fornera, S., et al., *Sequential Immobilization of Enzymes in Microfluidic Channels for Cascade Reactions.* ChemPlusChem, 2012. **77**(2): p. 98-101.
38. Babich, L., et al., *Synthesis of Carbohydrates in a Continuous Flow Reactor by Immobilized Phosphatase and Aldolase.* ChemSusChem, 2012. **5**(12): p. 2348-2353.

39. Niemeyer, C.M., *Semisynthetic DNA–Protein Conjugates for Biosensing and Nanofabrication.* Angewandte Chemie International Edition, 2010. **49**(7): p. 1200-1216.
40. Taboada-Puig, R., et al., *Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors.* Bioresource Technology, 2011. **102**(11): p. 6593-6599.
41. de Moraes, M.C., K.L. Vanzolini, and C.L. Cardoso, *Cromatografia de bioafinidade na identificação e caracterização de ligantes*, in *Cromatografia Líquida: Novas tendências e aplicações*, Elsevier, Editor 2015: Brazil. p. 299-339.
42. Hage, D.S., *Analysis of Biological Interactions by Affinity Chromatography: Clinical and Pharmaceutical Applications.* Clinical Chemistry, 2017. **63**(6): p. 1083-1093.
43. Hage, D.S., et al., *Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments.* J Pharm Biomed Anal, 2012. **69**: p. 93-105.
44. 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.* Journal of Chromatography A, 2006. **1120**(151-157).
45. da Silva, J.I., et al., *Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013. **73**: p. 44-52.
46. Vilela, A.F.L. and C.L. Cardoso, *An on-flow assay for screening of Beta-secretase ligands by immobilised capillary reactor-mass spectrometry.* Analytical Methods, 2017. **9**(14): p. 2189-2196.
47. Calleri, E., et al., *Evaluation of a monolithic epoxy silica support for penicillin G acylase immobilization.* Journal of Chromatography A, 2004. **1031**(1): p. 93-100.
48. Calleri, E., et al., *Immobilized trypsin on epoxy organic monoliths with modulated hydrophilicity: Novel bioreactors useful for protein analysis by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(49): p. 8937-8945.
49. Bartolini, M., V. Cavrini, and V. Andrisano, *Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies.* Journal of Chromatography A, 2004. **1031**: p. 27-34.
50. de Simone, A., et al., *Liquid chromatographic enzymatic studies with on-line Beta-secretase immobilized enzyme reactor and 4-(4-dimethylaminophenylazo) benzoic acid/5-[(2-aminoethyl)amino] naphthalene-1-sulfonic acid peptide as fluorogenic substrate.* Journal of Chromatography B, 2014. **968**: p. 94-100.
51. Wang, C., et al., *Screening of antinociceptive components in Corydalis yanhusuo W.T. Wang by comprehensive two-dimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry.* Anal Bioanal Chem, 2010. **396**(5): p. 1731-1740.
52. Kim, H.S. and I.W. Wainer, *Rapid analysis of the interactions between drugs and human serum albumin (HSA) using high-performance affinity chromatography (HPAC).* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **870**(1): p. 22-26.

53. Deng, G. and G. Sanyal, *Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery.* J Pharm Biomed Anal, 2006. **40**(3): p. 528-538.
54. Hodgson, R.J., et al., *Inhibitor Screening using immobilized Enzyme reactor chromatography/Mass spectrometry.* Analytical Chemistry, 2005. **77**: p. 7512-7519.
55. Vilela, A.F.L., et al., *Immobilized cholinesterases capillary reactors on-flow screening of selective inhibitors.* Journal of Chromatography B, 2014. **968**: p. 83-93.
56. Calleri, E., C. Temporini, and G. Massolini, *Frontal affinity chromatography in characterizing immobilized receptors.* J Pharm Biomed Anal, 2011. **54**(5): p. 911-925.
57. Fotiou, D., et al., *Evaluation of the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease with neuropsychological methods.* Aging Clinical and Experimental Research, 2015. **27**(5): p. 727-733.
58. Zhou, Y., S. Wang, and Y. Zhang, *Catalytic Reaction Mechanism of Acetylcholinesterase Determined by Born-Oppenheimer ab initio QM/MM Molecular Dynamics Simulations.* The journal of physical chemistry B, 2010. **114**(26): p. 8817-8825.
59. Kuca, K., et al., *Current Approaches Against Alzheimer's Disease in Clinical Trials.* Journal of the Brazilian Chemical Society, 2016. **27**(4): p. 641-649.
60. Weinstock, M., *Selectivity of Cholinesterase Inhibition: Clinical Implications for the Treatment of Alzheimer's Disease.* CNS Drugs, 1999. **12**(4): p. 307-323.
61. Hong, L., et al., *Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor.* Science, 2000. **290**(5489): p. 150-3.
62. Willem, M., et al., *Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1.* Science, 2006. **314**(5799): p. 664-666.
63. Shimizu, H., et al., *Crystal Structure of an Active Form of BACE1, an Enzyme Responsible for Amyloid β Protein Production.* Molecular and Cellular Biology, 2008. **28**(11): p. 3663-3671.
64. Mancini, F., A. de Simone, and V. Andrisano, *Beta-secretase as a target for Alzheimer's disease drug discovery: an overview of in vitro methods for characterization of inhibitors.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **400**(7): p. 1979-1996.
65. Anand, R., K.D. Gill, and A.A. Mahdi, *Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future.* Neuropharmacology, 2014. **76**(Part A): p. 27-50.
66. Reitz, C., *Toward precision medicine in Alzheimer's disease.* Annals of Translational Medicine, 2016. **4**(6): p. 107.
67. *2017 Alzheimer's disease facts and figures*, in *Alzheimer's & Dementia*ALZ.ORG. 2017. p. 325-373.
68. Smith, M.A.C., *Doença de Alzheimer.* Revista Brasileira de Psiquiatria, 1999. **21**: p. 03-07.
69. Greenblatt, H.M., et al., *Acetylcholinesterase a multifaceted target for structure based drug -desing of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheime's disease.* Journal of Molecular Neuroscience., 2003. **20**(3): p. 369-383.
70. Rauk, A., *The chemistry of Alzheimer's disease.* Chemical Society Reviews, 2009. **38**(9): p. 2698-2715.
71. Kim, J., H.J. Lee, and K.W. Lee, *Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease.* Journal of Neurochemistry, 2010. **112**(6): p. 1415-1430.

72. O'Brien, R.J. and P.C. Wong, *Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease.* Annual Review Neuroscience, 2011. **34**: p. 185–204.
73. Vassar, R., et al., *The β-Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential.* Journal of Neurochemistry, 2009. **29 (41)**: p. 12787–12794.
74. Vassar, R., et al., *Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects.* Journal of Neurochemistry, 2014. **130**(1): p. 4-28.
75. García-Ayllón, M.S., et al., *Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease: Cross-Talk with P-tau and β-Amyloid.* Frontiers in Molecular Neuroscience, 2011. **4**: p. 22.
76. Chakraborty, S. and S. Basu, *Dual inhibition of BACE1 and Aβ aggregation by β-ecdysone: Application of a phytoecdysteroid scaffold in Alzheimer's disease therapeutics.* International Journal of Biological Macromolecules, 2017. **95**(Supplement C): p. 281-287.
77. Hilpert, H., et al., *β-Secretase (BACE1) Inhibitors with High in Vivo Efficacy Suitable for Clinical Evaluation in Alzheimer's Disease.* Journal of Medicinal Chemistry, 2013. **56**(10): p. 3980-3995.
78. Menting, K.W. and J.A.H.R. Claassen, *β-secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease.* Frontiers in Aging Neuroscience, 2014. **6**(165).
79. Piazzi, L., et al., *Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008. **18**: p. 423-426.
80. Mantoani, S., et al., *Novel Triazole-Quinoline Derivatives as Selective Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors.* Molecules, 2016. **21**(2): p. 193.
81. Seema, B., et al., *Pharmacophore Modeling, Virtual and In Vitro Screening for Acetylcholinesterase Inhibitors and their Effects on Amyloid-β Self-Assembly.* Current Computer-Aided Drug Design, 2013. **9**(1): p. 2-14.
82. Chlebek, J., et al., *Application of BACE1 immobilized enzyme reactor for the characterization of multifunctional alkaloids from Corydalis cava (Fumariaceae) as Alzheimer's disease targets.* Fitoterapia, 2016. **109**(Supplement C): p. 241-247.
83. Miao, Y., N. He, and J.J. Zhu, *History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition.* Chemical Reviews, 2010. **110**(9): p. 5216-5234.
84. Ellman, G.L., et al., *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.* Biochemical Pharmacology, 1961. **7**: p. 88-95.
85. Marston, A., K. J., and K. Hostettmann, *A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants.* Phytochemical analysis 2002. **13**: p. 51-54.
86. Huggins, C. and J. Lapides, *Chromogenic substrates: IV acyl esters of p-nitrophenol as substrates for the colorimetric determination of esterase.* Journal of Biological Chemistry, 1947. **170**(2): p. 467-482.
87. Guilbault, G.G. and D.N. Kramer, *Resorufin Butyrate and Indoxyl Acetate as Fluorogenic Substrates for Cholinesterase.* Analytical Chemistry, 1965. **37**(1): p. 120-123.
88. Rhee, I.K., R.M. van Rijn, and R. Verpoorte, *Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography.* Phytochemical Analysis, 2003. **14**(3): p. 127-131.

89. Vanzolini, K.L., et al., *Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors-tandem mass spectrometry: an on-flow tool for ligand screening.* Journal of Medicinal Chemistry, 2013. **56**(5): p. 2038-2044.
90. Forsberg, E.M., J.R.A. Green, and J.D. Brennan, *Continuous Flow Immobilized Enzyme Reactor–Tandem Mass Spectrometry for Screening of AChE Inhibitors in Complex Mixtures.* Analytical Chemistry, 2011. **83**(13): p. 5230-5236.
91. Bartolini, M., V. Cavrini, and V. Andrisano, *Characterization of reversible and pseudo-irreversible acetylcholinesterase inhibitors by means of an immobilized enzyme reator.* Journal of Chromatography A, 2007. **1144**: p. 102-110
92. Andrisano, V., et al., *Determination of inhibitors' potency (IC50) by a direct high-performance liquid chromatographic method on an immobilised acetylcholinesterase column* Journal of Chromatography B, 2001. **753**: p. 375-383.
93. Bartolini, M., V. Cavrini, and V. Andrisano, *Choosing the right chromatographic support in making a new acetylcholinesterase-micro-immobilised enzyme reactor for drug discovery.* Journal of Chromatography A, 2005. **1065**: p. 135-144.
94. Vanzolini, K.L., et al., *Acetylcholinesterase immobilized on modified magnetic beads as a tool for screening a compound library.* Microchimica Acta, 2015. **182**(13): p. 2209-2213.
95. Khaldi, K., et al., *Comparative investigation of two methods for Acetylcholinesterase enzyme immobilization on modified porous silicon.* Applied Surface Science, 2017. **421**: p. 148-154.
96. Saleem, M., et al., *Acetylcholinesterase immobilization, characterization and comparison of porous silicon immobilized enzyme activity with the free counter part.* Bioscience Reports, 2016.
97. Mancini, F., et al., *Development and characterization of beta-secretase monolithic micro-immobilized enzyme reactor for on-line high-performance liquid chromatography studies.* Journal of Chromatography A, 2007. **1175**(2): p. 217-226.
98. Mancini, F. and V. Andrisano, *Development of a liquid chromatographic system with fluorescent detection for beta-secretase immobilized enzyme reactor on-line enzymatic studies.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. **52**(3): p. 355-61.
99. de Simone, A., et al., *Human recombinant beta-secretase immobilized enzyme reactor for fast hits' selection and characterization from a virtual screening library.* Journal of Pharmeutical and Biomedical Analysis, 2013. **73**: p. 131-134.
100. Nelson, D.L. and M.L. Cox, *Principles of Biochemistry*2004, New York.
101. Copeland, R.A., *Reversible Modes of Inhibitor Interactions with Enzymes*, in *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*2013, John Wiley & Sons, Inc. p. 57-121.
102. Copeland, R.A., *Irreversible Enzyme Inactivators*, in *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*2013, John Wiley & Sons, Inc. p. 345-382.
103. Segel, I.H., *Simple Inhibition Systems*, in *Enzyme Kinetics*1975: California. p. 100-159.
104. Segel, I.H., *Rapid equilibrium partial and mixed-type inhibition*, in *Enzyme Kinetics*1975. p. 161-220.
105. McGovern, S.L., et al., *A Specific Mechanism of Nonspecific Inhibition.* Journal of Medicinal Chemistry, 2003. **46**(20): p. 4265-4272.

106. Sinha, S., et al., *Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain.* Nature, 1999. **402**(6761): p. 537-40.
107. Cardoso, C.L., et al., *The development of an immobilized enzyme reactor containing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi: the effect of species' specific differences on the immobilization.* Analyst, 2008. **133**: p. 93-99.
108. Yang, X.-X., et al., *Screening for the bioactive constituents of traditional Chinese medicines-progress and challenges.* RSC Advances, 2017. **7**(6): p. 3089-3100.
109. Chaplin, M.F. and C. Bucke, *Fundamentals of enzyme kinetics*, in *Enzyme technology*1990, Press Sindicate of the University of Cambridge: New York. p. 1-38.
110. Cardoso, J.O. and R.V. Oliveira, *LC-MS/MS: Fundamentos, vantagens e problemas do acoplamento*, in *Cromatografia Líquida: Novas tendências e aplicações*, Q.B. Cass and N.M. Cassiano, Editors. 2015, Elsevier: Brazil. p. 57-88.
111. Cassiano, N.M., et al., *Chromatographic Methods Validation for Analysis of Small Molecules in Biological Matrices.* Quimica Nova, 2009. **32**(4): p. 1021-1030.
112. ANVISA, *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2017.
113. Ermolieff, J., et al., *Proteolytic activation of recombinant pro-memapsin 2 (pro-beta-secretase) studied with new fluorogenic substrates.* Biochemistry, 2000. **39**(40): p. 12450-6.
114. Andrau, D., et al., *BACE1- and BACE2-expressing Human Cells-Characterization of β-amyloid precursor protein-derived catabolites, design of a novel fluorimetric assay, and identification of new in vitro inhibitors.* Journal of Biologycal Chemistry 2003. **278**(July 11): p. 25859–25866.
115. Ghosh, U., et al., *Estrogenic diazenes: heterocyclic non-steroidal estrogens of unusual structure with selectivity for estrogen receptor subtypes.* Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2003. **11**(4): p. 629-657.
116. Henley, J.P. and A. Sadana, *Deactivation theory.* Biotechnology and Bioengineering, 1986. **28**(8): p. 1277-1285.
117. Addorisio, V., et al., *Oxidation of phenyl compounds using strongly stable immobilized-stabilized laccase from Trametes versicolor.* Process Biochemistry, 2013. **48**(8): p. 1174-1180.
118. Mateo, C., et al., *Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins.* Enzyme and Microbial Technology, 2006. **39**(2): p. 274-280.
119. Mateo, C., et al., *Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage.* Biomacromolecules, 2000. **1**(4): p. 739-745.
120. López-Gallego, F., et al., *Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports.* Journal of Biotechnology, 2005. **119**(1): p. 70-75.
121. Mateo, C., et al., *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.* Enzyme Microb. Tecnol., 2007. **40**: p. 1451-1463.
122. Cao, L., *Immobilised enzymes: science or art?* Current Opinion in Chemical Biology, 2005. **9**(2): p. 217-226.

123. López-Gallego, F., et al., *Stabilization of Enzymes by Multipoint Covalent Immobilization on Supports Activated with Glyoxyl Groups*, in *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition*, J.M. Guisan, Editor 2013, Humana Press: Totowa, NJ. p. 59-71.
124. Harel, M., et al., *Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(19): p. 9031-9035.
125. Mateo, C., et al., *Immobilization of Lactase from Kluyveromyces lactis Greatly Reduces the Inhibition Promoted by Glucose. Full Hydrolysis of Lactose in Milk.* Biotechnology Progress, 2004. **20**(4): p. 1259-1262.
126. Pessela, B.C.C., et al., *The immobilization of a thermophilic β-galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition: Complete hydrolysis of lactose in dairy products.* Enzyme and Microbial Technology, 2003. **33**(2): p. 199-205.
127. Alhomida, A.S., et al., *Kinetic analysis of the toxicological effect of tacrine (Cognex®) on human retinal acetylcholinesterase activity.* Toxicology, 2000. **147**(1): p. 33-39.