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 resumida

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.

Versão resumida.

48 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.

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	Aprovado
Ivone Carvalho	Suplente	FCFRP - USP	Aprovado

Resultado Final: aprovado

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 Cláudia 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 Petroleoquímica 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 a florando 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 nº 2016/15037-5, pelas bolsas de estudo concedidas. Aos processos nº 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 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 determinados 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 $\lambda_{em} = 495$ nm ($\lambda_{ex} = 395$ 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 <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (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

Lista de equação

$$V_0 = \frac{V_{M\acute{a}x} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Equação (1).23

Lista de abreviaturas, símbolos e fórmulas

λ	Comprimento de onda	EDA	Etilenodiamino
λ_{em}	Comprimento de onda emissão	[E]	Concentração de enzima
λ_{ex}	Comprimento de onda excitação	EI	Complexo enzima-inibidor
Aβ	Peptídeo amiloide	EI	Eficiência de imobilização
AChE	Enzima acetilcolinesterase	ES	Complexo enzima-substrato
AChE_{ee}	Enzima acetilcolinesterase de <i>Electrophorus electricus</i>	ESI	Ionização por eletronspray (<i>Electronspray ionization</i>)
AChE_{hu}	Enzima acetilcholinesterase <i>Human recombinant</i>	EtOH	Etanol
ACh	Acetilcolina	FFCLRP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
ACN	Acetonitrila	FRET	Transferência de energia de ressonância por fluorescência
ACTH	Iodeto de Acetilcolina	Glut	glutaraldeído
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária	HCl	Ácido Clorídrico
APTES	Aminopropiltriethoxissilano	HTS	Ensaio Biológicos automatizados em larga escala (<i>High Throughput Screening</i>)
BACE1	Enzima β -secretase 1	IDA	Ácido iminodiacético
BSA	Albumina Sérica Bovina	IT	Analizador por aprisionamento de íons (<i>Ion trap</i>)
C₁₂	1-dodecanotiol	[I]	Concentração de inibidor
CHO	Adeído	IC₅₀	Potência Inibitória
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência	ICER	Reator capilar com enzima imobilizada (<i>Immobilized Capillary Enzyme Reactor</i>)
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massa	IMER	Reator com enzima imobilizada (<i>Immobilized Enzyme Reactor</i>)
CV	Coeficiente de Variação	JMV2236	Substrato orto-aminobenzoil (Abz)-(Asn ⁶⁷⁰ , Leu ⁶⁷¹)-proteína precursora β amiloide A4
CO₂H	Grupo carboxila		
DA	Doença de Alzheimer		
Da	Dalton		
d.i.	Diâmetro Interno		
DMSO	Dimetilsulfóxido		
DQ	Departamento de Química		
E	Enzima livre		
EC	<i>Enzyme Commission</i>		

(669-674)- etilenodiamino 2,4- dinitrofenol		p-NPP	substrato propionato de p-nitrofenil
(EDDnp) trifluoroacetato		P	Produto da reação enzimática
K_D	Constante de dissociação	pH	Potencial Hidrogeniônico
KH₂PO₄	Hidrogenofosfato de Potássio	RA	Recuperação da atividade
K_i	Constante de inibição	SIM	<i>Single Ion monitoring</i>
K_M	Constante de Michaelis	[S]	Concentração de substrato
K_{Map}	Constante de Michaelis aparente	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)
H₂SO₄	Ácido sulfúrico	TEA	triethylamina
LD	Limite de Detecção	t_{1/2} vida	Tempo de meia vida
LIQ	Limite inferior de Quantificação	USP	Universidade de São Paulo
MS	Espectrômetro de massa (<i>Mass spectrometer</i>)	UV-Vis	Ultravioleta visível
MeOH	Metanol	V_E	Volume de enzima
μL	Microlitro	V₀	Velocidade de reação enzimática inicial
μmol.L⁻¹	Micromolar	V_{Máx}	Velocidade de reação enzimática máxima
NaHCO₂	Bicarbonato de sódio	V_t	volume total
NaHB₄	Borohidreto de sódio		
NaIO₄	Periodato de sódio		
nm	Nanômetro		
Ni²⁺	Níquel ²⁺		
NiCl₂.6H₂O	Cloreto de níquel hexahidratado		
[P]	Concentração de produto		

Sumário

Resumo	VIII
Abstract.....	IX
Lista de figuras	X
Lista de equação	XI
Lista de abreviaturas, símbolos e fórmulas	XII
1. Fundamentos teóricos	1
1.1 Métodos para imobilização de enzimas	2
1.1.1 <i>Desenvolvimento de uma metodologia com enzima imobilizada</i>	5
1.1.2 <i>Co-imobilização de enzimas</i>	8
1.1.3 <i>Cromatografia de bioafinidade aplicada na triagem de ligantes</i>	10
1.2 As enzimas.....	12
1.2.1 <i>A enzima acetilcolinesterase</i>	12
1.2.2 <i>A enzima β-secretase1 (BACE1)</i>	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 <i>Métodos com AChE imobilizada</i>	18
1.4.2 <i>Métodos com BACE imobilizada</i>	21
1.5 Caracterização de inibidor	23
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivos específicos.....	26
3. Conclusão final	27
Referências bibliográficas	29

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.

Métodos para imobilização de enzimas				
Interior suporte		Superfície suporte		Livre de suporte
Aprisionadas	Encapsuladas	Não-covalente	Covalente

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 ($\text{-CH}_2\text{-NH-}$), arilação ($\text{-CH}_2\text{-}$

S-), formação de base de Schiff ($-\text{CH}=\text{N}-$), amidinação ($-\text{CNH}-\text{NH}-$), e troca de tiol ($-\text{S}-\text{S}-$) [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 intercrossamento, como o glutaraldeído ou dextran-poliáldeído, 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 crystals*), ou os CLEAs (*Crosslinked enzyme aggregates*). Nos CLECs é necessário a prévia purificação e cristalização da enzima e posteriormente a formação da ligação cruzada via agente intercrossante. 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 eurúico 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 sulfidril.

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 intercrossamento 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 estacionária 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 possuem baixa pressão de volta.

Várias outras matrizes podem ser utilizadas como suporte; os materiais de sílica comum como; octilsílica (C₈) [51], octadecilsílica (C₁₈) [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* (AChEee) e *human recombinant* (AChEhu), 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 luminal da membrana celular, formando o fragmento C-terminal que posteriormente é clivado pela γ -secretase na extremidade N-terminal gerando o peptídeo amilóide (A β 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 A β 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 DA¹ 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 serotonina, 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 neurofibrilares, 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 neurofibrilares 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 A β 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 acetilcolina 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 de eluição 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-hidroxissuccinimida/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 BACE1 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 medida. 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.

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

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 $V_{M\acute{a}x}$ 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 $V_{M\acute{a}x}$ 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 $V_{M\acute{a}x}$ 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 $V_{M\acute{a}x}$ 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 $V_{M\acute{a}x}$ 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.

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 bibliográficas²

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*. Quimica Nova, 2009. **32**(1): p. 175-187.
9. de Moraes, M.C., et al., *New trends in LC protein ligand screening*. Journal of Pharmaceutical 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).

² 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 Immobilization 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 Alzheimer'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 A β 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. Piazzzi, 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 reactor*. 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 Pharmaceutical 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.