

Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto -Departamento de Química

# "Imobilização da enzima butirilcolinesterase e o desenvolvimento de métodos de triagem para inibidores seletivos"

Programa de Pós - Graduação em Química

#### Adriana Ferreira Lopes Vilela

Dissertação 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 Mestre em Ciências, Área: **Química** 

RIBEIRÃO PRETO - SP

## Adriana Ferreira Lopes Vilela

"Imobilização da enzima butirilcolinesterase e o desenvolvimento de métodos de triagem para inibidores seletivos"

Dissertação 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 Mestre em Ciências, Área: **Química** 

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso

RIBEIRÃO PRETO - SP

### FICHA CATALOGRÁFICA

Vilela, Adriana Ferreira Lopes

Imobilização da enzima butirilcolinesterase e o desenvolvimento de métodos de triagem para inibidores seletivos.

104 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química

Orientadora: Cardoso, Carmen Lúcia.

1. Butirilcolinesterase 2. Imobilização de enzimas 3. Ensaios de inibição enzimática 4. Inibidores seletivos

Nome: Adriana Ferreira Lopes Vilela	
Título: Imobilização da enzima butirilo	olinesterase e o desenvolvimento de métodos
de triagem para inibidores seletivos.	
Aprovado em:	
Banca examinadora	
Prof. Dr	_ Instituição:
Julgamento:	_ Assinatura:
Prof. Dr	_ Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr	_ Instituição:
Julgamento:	Assinatura:

Ao meu esposo
Clério, riqueza da
minha vida.
Obrigada pela sua
compreensão, por
seu carinho, amor,
por sua força nas
minhas horas de
angústias e
tristezas. Agradeço
a Deus todo
momento por você
na minha vida. Te
amo...

### **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, por Ele ter me dado esta oportunidade e pelo cumprimento das Suas promessas em minha vida. Deus, mais uma vez tenho que te agradecer pelo sustento e esperança que Tu me destes quando tudo parecia perdido e acabado, e mais uma vez obrigada por mais esta obra em minha vida.

A Professora Dr<sup>a</sup>.Carmen Lúcia Cardoso, pela sua atenção, dedicação, paciência, e as muitas contribuições neste trabalho. Muito obrigada!

Aos professores, Dra. Arlene Gonçalves Côrrea, Dr. João Batista Fernandes, Dr. Antonio Luis dos Santos Lima e Dr. Ricardo José Alves, que juntamente com seus alunos, cederam amostras para a execução dos estudos apresentados neste trabalho.

A profa. Dra. Quezia Bezerra Cass pela contribuição no trabalho.

A profa. Dra. Rosa Melo Furriel pela contribuição dada ao trabalho no exame de qualificação.

Aos meus professores da pós- graduação, Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, Dra. Gláucia Maria da Silva, Dr. Pietro Ciancaglini, Dra. Carmen Lúcia Cardoso, Dra. Laura Tiemi Okano, Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, pelos grandes ensinamentos das disciplinas que me auxiliou na construção deste trabalho.

Ao corpo técnico e administrativo do Departamento de Química da FFCLRP-USP.

A Joyce Izidoro da Silva que me instruiu nos primeiros passos na pesquisa.

A Marcela Cristina de Moraes, obrigada pela ajuda nas horas de dúvidas.

A Olímpia Paschoal, técnica do laboratório, que se tornou uma grande amiga. Obrigada pela sua boa vontade de ajudar.

A todos do laboratório, Luciana, Bárbara, Juliana, Luana, Felipe, Luiz Cezar, Matheus, Vinícius, André, Eduardo, Oraci, Paula, pelos bons momentos que passamos juntos e colaboração no trabalho.

A Bárbara Mammana Frugeri, minha filha, obrigada por sua ajuda, pela sua companhia e amizade.

A querida irmã Lurdinha, que sempre está do meu lado, e com certeza, muito ora a Deus por mim.

Ao meu pai, minha irmã, meu irmão, minha tia Bete, que embora estejam em outra cidade, também torceram por mim para que mais esta etapa conclusiva em minha vida se realizasse.

Ao meu esposo, Clério, pela paciência, incentivo e auxílio em mais uma etapa da minha vida.

A todos os meus amigos e colegas.

Nenhum se susterá diante de ti, todos os dias da tua vida: como fui com Moisés, assim serei contigo: não te deixarei nem te desampararei. Esforça-te, e tem bom ânimo:...

(Josué 1: 5-6)

#### Resumo

VILELA, A. F. L. Imobilização da enzima butirilcolinesterase e o desenvolvimento de métodos de triagem para inibidores seletivos. 2013. 104f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2013.

A descoberta de inibidores seletivos é extremamente importante para o desenvolvimento de novos fármacos que possam ser usados no tratamento de pacientes diagnosticados com a doença de Alzheimer (DA). Neste contexto, o desenvolvimento de métodos de triagem para a identificação de novos compostos biologicamente ativos se torna interessante. Butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) é uma serina hidroxilase que está classicamente associada à hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) formando colina e ácido acético. Este trabalho descreve a imobilização covalente da BChE de soro humano nas paredes internas de capilares de sílica fundida utilizando o agente espacador glutaraldeído, e sua aplicação na triagem de inibidores seletivos. O ICER-BChE resultante foi conectado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com monitoramento on line da atividade catalítica, envolvendo detecção UV. Após os estudos das melhores condições cromatográficas, variações de pH e vazão e a influência de solventes orgânicos na atividade enzimática o método foi validado com o uso de inibidores padrões. O maior valor obtido com o ICER-BChE no parâmetro cinético, constante de Michaelis  $K_M = 33.6 \pm 6.9$  mM, comparado com a enzima em solução,  $K_M = 0.12 \pm 0.00$ 0,02 mM, evidencia o efeito da imobilização sobre a afinidade pelo substrato. No entanto, houve retenção da atividade catalítica e seletividade frente a inibidores padrão. O método foi aplicado na triagem de novos ligantes utilizando cinco coleções de diferentes classes de compostos, entre derivados cumarínicos, complexos metálicos com cobre (Cu), complexos metálicos com cobalto (Co) e zinco (Zn), glicosídeos, e derivados de fenilpropanóides e ácido barbitúrico. Desta triagem foram selecionados sete compostos promissores com os quais foram realizados os estudos sobre a potência mínima inibitória (IC<sub>50</sub>) e destes quatro foram escolhidos para estudos de mecanismos de ação utilizando o ICER-BChE. Dos complexos metálicos os melhores compostos foram o **HPTBCu** (IC<sub>50</sub> = 8,74  $\pm$  1,5  $\mu$ M, K<sub>i</sub> = 9,6  $\pm$  0,5  $\mu$ M), o **NarBCu**  $(IC_{50} = 8.0 \pm 1.4 \mu M, K_i = 2.0 \pm 0.1 \mu M)$  ambos com mecanismo competitivo o **HesFCu** (IC<sub>50</sub> = 13,6  $\pm$  2,9  $\mu$ M), o **NNINABCu** (IC<sub>50</sub> = 94,8  $\pm$  16) e o **NarFCu** (IC<sub>50</sub> = 81,7  $\pm$  13). Dos derivados cumarínicos os compostos 17 (IC<sub>50</sub> =109  $\pm$  21  $\mu$ M, K<sub>i</sub> =  $108 \pm 10 \,\mu\text{M}$ ) e **19** (IC<sub>50</sub>=128 ± 28  $\mu\text{M}$ , K<sub>i</sub> =36,0 ± 5,0  $\mu\text{M}$ ) apresentaram mecanismo incompetitivo. Os resultados demonstraram que a abordagem proposta é útil na triagem on line de inibidores seletivos, pois fornece resultados rápidos, precisos e reprodutíveis.

**Palavras chave**: butirilcolinesterase, imobilização de enzimas, ensaios de inibição enzimática, inibidores seletivos.

#### **Abstract**

VILELA, A. F. L. Screening of selective inhibitors by immobilized capillary reactors based on butyrylcholinesterase enzymes: Development and application 2013. 104f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2013.

The discovery of selective inhibitors is extremely important for the development of drugs that can be used in the treatment of patients diagnosed with the Alzheimer disease (AD). In this context, the development of screening methods for the identification of new, biologically active compounds is a challenging task. Butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) is a serine hydroxylase that is classically associated with the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), which yields choline and acetic acid. This paper describes the development of capillary enzyme reactors (ICERs) containing BChE from the human serum, covalently immobilized onto silica fused capillaries, using glutaraldehyde as spacer, and its application in the screening of selective inhibitors. The resulting BChE-ICER was connected to a liquid chromatography system high efficiency where monitoring of activity was online involving UV detection. After studying the best chromatographic conditions, pH variations, flow-rate and the influence of organic solvents on enzyme activity method was validated using standard inhibitors. The higher value obtained with the BChE-ICER in kinetic parameter, constant Michaelis  $K_M = 33.6 \pm 6.9$  mM, compared with the enzyme in solution,  $K_M = 0.12 \pm 0.02$  mM, shows the effect of immobilized on the affinity substrate. However, there was retention of catalytic activity and selectivity towards standard inhibitors. The method was applied in the screening of new ligands using collections of five different compounds, among coumarin derivatives, metal complexes with copper (Cu) metal complexes with cobalt (Co) and zinc (Zn), glycosides, phenylpropanoids and derivatives, and barbituric acid. These screenings were selected seven promising compounds with which the studies were made on the minimum inhibitory potency (IC<sub>50</sub>) and these four were chosen for studies of mechanisms of action using the ICER-BChE. Of the compounds metal complexes best were **HPTBCu** (IC<sub>50</sub> =  $8.74 \pm 1.5 \mu M$ ,  $K_i = 9.6 \pm 0.5 \mu M$ ), **NarBCu**  $(IC_{50} = 8.0 \pm 1.4 \mu M, K_i = 2.0 \pm 0.1 \mu M)$  both competitive mechanism, the **HesFCu**  $(IC_{50} = 13.6 \pm 2.9 \mu M)$ , NNINABCu  $(IC_{50} = 94.8 \pm 16 \mu M)$  and NarFCu  $(IC_{50} = 81.7 \pm 1.0 \mu M)$  $\pm$  13  $\mu$ M). Of coumarin derivatives, 17 (IC<sub>50</sub> =109  $\pm$  21  $\mu$ M, K<sub>i</sub> = 108  $\pm$  10  $\mu$ M) and 19 (IC<sub>50</sub> = 128  $\pm$  28  $\mu$ M, K<sub>i</sub> = 36.0  $\pm$  5.0  $\mu$ M) showed mechanism uncompetitive. The results demonstrated that the proposed approach is useful in screening for selective inhibitors online because it provides quick results, accurate and reproducible.

**Keywords:** immobilized enzymes, butyrylcholinesterase, enzymatic inhibition assays, selective inhibitor.

# Lista de figuras

Figura 1.1: Métodos de imobilização de enzimas (CARDOSO; MORAES; CASS 2009, p.180).
Figura 1.2: Estrutura cristalográfica da BChE (Fonte: http://en.academic.ru/dic.nsf/enwiki/470750).
Figura 1.3: Sítio ativo da BChE humana (Fonte: Figure 4.6, GIACOBINI, 2003, p. 47).
Figura 1.4: Efeito da [S] na V <sub>0</sub> . Fonte: figura 8.11 (NELSON; COX, 2004)15
Figura 1.5: Representação de Lineweaver-Burk. Fonte: figura 8.12 (NELSON; COX 2004).
Figura 1.6: Representação de V <sub>0</sub> vs [S] e Lineweaver-Burk para inibição competitiv (Fonte: figura 3.3 A e C de COPELAND, 2005, p. 52)
Figura 1.7: Representação de Michaelis & Menten e Lineweaver-Burk para inibição não-competitiva. (Fonte: figura 3.6 A e C de COPELAND, 2005, p. 60)21
Figura 1.8: Representação de Michaelis & Menten e Lineweaver-Burk para inibição incompetitiva. (Fonte: figura 3.12 A e C de COPELAND, 2005, p. 69)
Figura 4.1: Cromatograma correspondente ao ânion amarelo formado pelo ICER BChE. Fase móvel: tampão de trabalho e vazão de 0,05 mL.min <sup>-1</sup> 42
Figura 4.2: Cromatograma correspondente ao ânion amarelo formado pelo ICER BChE com e sem redução das bases de Schiff. Fase móvel: tampão de trabalho vazão de 0,05 mL.min <sup>-1</sup> .
Figura 4.3: Avaliação do pH ótimo para o ICER-BChE
Figura 4.4: Estabilidade do ICER-BChE em diferentes valores de pH4.
Figura 4.5: Influência da vazão na atividade enzimática
Figura 4.6: Curva de calibração.
Figura 4.7: Hipérbole de Michaelis-Menten para o ICER-BChE
Figura 4.8: Hipérbole de Michaelis-Menten para BChE em solução4
Figura 4.9: Influência do uso de solventes orgânicos (em 50%) sobre a atividad enzimática
Figura 4.10: Cromatograma ilustrando a atividade enzimática do ICER-BChE n presenca de EtOH na fase móvel

Figura 4.11: Cromatograma ilustrando o decrescimento da atividade enzimática do ICER-BChE na presença de inibidor
Figura 4.12: Curva de IC <sub>50</sub> para o inibidor eserine no ICER-BChE53
Figura 4.13: Curva de IC <sub>50</sub> para o inibidor galantamina no ICER-BChE54
Figura 4.14: Cromatograma ilustrando a atividade enzimática do ICER-BChE e o branco da cumarina 5
Figura 4.15: Cromatograma ilustrando a atividade enzimática do ICER-BChE e o branco da cumarina 15
Figura 4.16: Porcentagem de inibição dos compostos híbridos com o ICER-BChE a 200 µM
Figura 4.17: Curva de IC <sub>50</sub> para o cumarina 17 no ICER-BChE
Figura 4.18: Curva de IC <sub>50</sub> para o cumarina 19 no ICER-BChE69
Figura 4.19: Curva de IC <sub>50</sub> para o complexo metálico HPTBCu no ICER-BChE69
Figura 4.20: Curva de IC <sub>50</sub> para o complexo metálico HesFCu no ICER-BChE70
Figura 4.21: Curva de IC <sub>50</sub> para o complexo metálico NarBCu no ICER-BChE70
Figura 4.22: Curva de IC <sub>50</sub> para o complexo metálico NNINABCu no ICER-BChE.71
Figura 4.23: Curva de IC <sub>50</sub> para o complexo metálico NarFCu no ICER-BChE71
Figura 4.24: Gráfico de duplo recíproco para eserina no ICER-BChE73
Figura 4.25.: Determinação de K <sub>i</sub> para inibidor eserina
Figura 4.26: Gráfico de duplo recíproco para cumarina 17 no ICER-BChE74
Figura 4.27: Gráfico de duplo recíproco para cumarina 19 no ICER-BChE74
Figura 4.28.: Determinação de K <sub>i</sub> para cumarina 17 e 19
Figura 4.29: Gráfico de duplo recíproco HPTBCu no ICER-BChE76
Figura 4.30: Gráfico de duplo recíproco NarBCu no ICER-BChE76
Figura 4.31.: Determinação de K <sub>i</sub> para HPTBCu e NarBCu
Figura 4.32: Estabilidade do ICER-BChE

### Lista de tabelas

Tabela 1.1: Estruturas químicas de inibidores padrão de colinesterases25
Tabela 4.1. Precisão intra - dia (n = 5) e Exatidão do método de análise para quantificação de tiocolina formada pelo ICER-BChE
Tabela 4.2: Valores de IC50 de inibidores padrões no ICER- BChE e BChE em solução
Tabela 4.3: Resultados do teste pontual obtidos para derivados cumarínicos utilizando o ICER- BChE e BChE em solução
Tabela 4.4: Resultados do teste pontual obtidos para os complexos utilizando o ICER-BChE

# Lista de esquemas

Esquema 1.1: Representação esquemática do uso de IMERs em sistemas on-line, A)
pós-coluna, B) pré-coluna e C) coluna. Referencia
Esquema 1.2: Hidrólise da ACh catalisada pela BChE9
Esquema 1.3: Hidrólise da BCh catalisada pela BChE10
Esquema 1.4: Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman
Esquema 1.5: Representação de equilíbrio enzimático com um inibidor competitivo. (Fonte: figura 3.2 A de COPELAND, 2005 p. 50)
Esquema 1.6: Representação de equilíbrio enzimático com um inibidor não-competitivo. (Fonte: figura 3.2 A de COPELAND, 2005 p. 50)
Esquema 1.7: Representação de equilíbrio enzimático com um inibidor incompetitivo. (Fonte: figura 3.2 A de COPELAND, 2005 p. 50)
Esquema 4.1: Método de imobilização da BChE em capilares de sílica fundida41
Esquema 4.2: Reações envolvidas no método empregado para monitorar a atividade da BChE42

#### Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AChE Enzima acetilcolinesterase

ACh Acetilcolina ACN Acetonitrila

ACThI Iodeto de Acetiltiocolina

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APTES Aminopropiltrietoxisilano

BCh Butirilcolina

BCThI Iodeto de Butiriltiocolina
BSA Albumina Sérica Bovina

BChE Enzima butirilcolinesterase

°C Graus Celsius

CCD Cromatografia em Camada Delgada

CHCL<sub>3</sub> Clorofórmio

CL Cromatografia Líquida

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV Coeficiente de Variação

CO<sub>2</sub>H Grupo carboxila

DA Doença de Alzheimer

Da Dalton

d.i. Diâmetro Interno

DMSO Dimetilsulfóxido

DQ Departamento de Química

E Enzima livre

[E] Concentração de enzima

EI Complexo enzima-inibidor

ES Complexo enzima-substrato

ESI Complexo enzima- substrato-inibidor

EtOH Etanol

FFCLRP Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto

g Grama

HCl Ácido Clorídrico

HTS Ensaios Biológicos automatizados em larga escala (High Throughput

*Screening*)

[I] Concentração de inibidor

IC<sub>50</sub> Potência Biológica

ICER Reator capilar com enzima imobilizada (Immobilized Capillary

Enzyme Reactor)

IME Instituto Militar de Engenharia do Rio de Janeiro

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

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Monohidrogenofosfato de Potássio

K<sub>i</sub> Constante de inibição

K<sub>M</sub> Constante de Michaelis

K<sub>Map</sub> Constante de Michaelis aparente

LC-MS Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de Massas

LD Limite de Detecção

LQ Limite de Quantificação

MeOH Metanol

μL Microlitro

μM Micromolar

nm Nanômetro

 $NH_2$ 

-

OH Grupo hidroxila

[P] Concentração de produto

Grupo amino

P Produto da reação enzimática

P Produto da reação enzimática

pH Potencial Hidrogeniônico

SH Grupo tiol

[S] Concentração de substrato

TRIS Tris-(hidroximetil)aminometano

UFSCar Universidade Federal de São Carlos

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

USP Universidade de São Paulo

V<sub>0</sub> Velocidade de reação enzimática inicial

V<sub>Máx</sub> Velocidade de reação enzimática máxima

λ Comprimento de onda

## Sumário

Resumo	VII
Abstract	VIII
Lista de figuras	IX
Lista de tabelas	XI
Lista de esquemas	XII
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	XIII
1. Introdução	1
1.1 Conceitos teóricos	3
1.1.1 Métodos de imobilização de enzimas	3
1.1.2. Efeitos da imobilização	6
1.1.3. Ensaios de monitoramento da atividade com enzimas imobilizadas en	m
suportes cromatográficos	7
1.2. Enzima alvo	8
1.2.1. Butirilcolinesterase	8
1.3. Ensaios de monitoramento da atividade de colinesterases	11
1.3.1. Ensaio colorimétrico de Ellman	12
1.4. Cinética enzimática	13
1.5. Inibidores enzimáticos	17
1.5.1. Inibição reversível competitiva	18
1.5.2. Inibição reversível não-competitiva	20
1.5.3. Inibição reversível incompetitiva	21
1.6. Caracterização de inibidores	23
1.7. Inibidores padrões da BChE	24
2. Objetivos	26
2.1. Objetivos Gerais:	26
2.2. Objetivos específicos:	26
3. Procedimento Experimental	27
3.1. Materiais	27
3.2. Aparatos	27
3.3. Tampão de trabalho	
3.4. Imobilização da enzima BChE em capilares de sílica fundida	
3.4.1. 1ª etapa: Pré-tratamento corrosivo do capilar de sílica fundida	28
3.4.2. 2ª etapa: Imobilização da BChE	28
3.4.3. 3ª etapa: Redução das Bases de Schiff	
3.5. Determinação da atividade enzimática da BChE imobilizada	29
3.6. Preparo da solução de BTChI utilizada no desenvolvimento do método	
analítico	
3.7. Estudo da influência da vazão	
3.8. Estudo da influência do pH	
3.8.1. Influência do pH na atividade do ICER-BChE	
3.8.2. Influência do pH na estabilidade da atividade do ICER-BChE	
3.9. Validação do método desenvolvido	
3.9.1 Preparo das soluções de BTChI utilizadas na curva de calibração	
3.9.2. Curva de calibração	
3.9.3. Validação do método analítico	
3.10. Medida da Velocidade inicial da reação (V <sub>0</sub> ) no ICER - BChE	
3.11. Estudo do parâmetro cinético K <sub>M</sub>	
3.12 Modificador orgânico	
3.12.1. Modificador orgânico na atividade do ICER-BChE	32

	3.12.2. Modificador orgânico na fase móvel	33
	3.13. Estudos de inibição	
	3.13.1. Validação com inibidores padrões	
	3.13.2. Triagem de inibidores: Teste pontual com os compostos Sintéticos	
	3.13.3. Determinação da Potência Inibitória (IC <sub>50</sub> ) dos compostos sintéticos	
	3.13.4. Determinação do tipo de mecanismo e da constante (K <sub>i</sub> )	
	3.13.5. Classes de compostos avaliados	35
	3.14. Estabilidade e reprodutibilidade do ICER - BChE	36
	3.15. Ensaios enzimáticos com a BChE em solução	
	3.15.1 Ensaio em microplaca para determinação do K <sub>M</sub>	36
	3.15.2 Ensaios de inibição em microplaca	
	3.15.3 Ensaio Falso-positivo de Ellman em Cromatografia de Camada Delgac	la
	(CCD)	
4.	Resultados e discussão	39
	4.1. Preparação e caracterização do ICER-BChE	39
	4.1.1 Imobilização da BChE	
	4.1.2. Determinação da atividade enzimática do ICER-BChE	41
	4.1.3 Influência do pH	43
	4.1.4 Influência da vazão	45
	4.2. Validação do método	46
	4.3 Estudo do parâmetro cinético K <sub>M</sub>	47
	4.3.1. Medida da Velocidade inicial da reação (V <sub>0</sub> ) no ICER - BChE	47
	4.3.1. ICER-BChE e BChE em solução	48
	4.4. Modificador orgânico	50
	4.4.1. Modificador orgânico na atividade do ICER-BChE	50
	4.4.2. Modificador orgânico na fase móvel	51
	4.5. Estudos de inibição	52
	4.5.1. Validação com inibidores padrões	52
	4.5.2. Triagem dos compostos – teste pontual	55
	4.5.3. Determinação da Potência Inibitória (IC <sub>50</sub> ) dos compostos sintéticos	68
	4.5.4. Determinação do mecanismo de inibição e da constante (K <sub>i</sub> )	
	4.6. Estabilidade e reprodutibilidade do ICER – BChE	77
5.	Conclusões	79
6.	Referências bibliográficas	80

### 1. Introdução

A inibição da atividade enzimática é um dos maiores instrumentos de regulação das células vivas, e, devido a grande necessidade existente para o tratamento de diversas doenças através de inibição seletiva de enzimas envolvidas em processos vitais nos organismos infecciosos, a busca pelo desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a descoberta de novos compostos biologicamente ativos tem se intensificado (COPELAND, 2005). No entanto, há a necessidade do desenvolvimento de técnicas rápidas e eficientes que reduzam o número de possíveis candidatos a fármacos, e que auxiliem na obtenção de informações mais específicas sobre as interações inibidor-receptor e sobre o mecanismo de ação do inibidor (GOMES-HENS; AGUILAR-CABALLOS, 2007).

Um método dinâmico e rápido para realizar a triagem de novos ligantes consiste em passar as substâncias de interesse através de uma superfície na qual uma biomolécula (enzima) esteja imobilizada. Assim, as substâncias que possuem maior afinidade pela biomolécula permanecem mais tempo retidas, sendo, portanto, os melhores inibidores. Tal método cromatográfico pode ser chamado de biocromatografia e é utilizado nos estudos de afinidade de fármacos, pois ambos possuem mecanismos comuns como a adsorção, distribuição, excreção e ativação do receptor e interações intermoleculares básicas (KALISZAN; WAINER, 1997).

A biocromatografia é considerada como uma das técnicas de triagem de alta eficiência (*high throughput screening*, HTS) e demonstra ser uma poderosa ferramenta para monitorar as interações ligante-proteína, substrato-proteína, inibidorproteína (CARDOSO; MORAES, 2009, GIRELLI; MATEI, 2005).

Nesta metodologia, três passos são essenciais como; a imobilização de um alvo em um suporte; a avaliação das modificações sofridas pela biomolécula após a imobilização; e a determinação dos parâmetros de ligação do ligante depois do alvo imobilizado no sistema de separação (NIE; WANG, 2009). Com os princípios da biocromatografia muitas informações importantes sobre afinidade das ligações, equilíbrio, constantes cinéticas e de inibição podem ser obtidas.

Com a utilização desta técnica conectada a um sistema de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tem-se a junção de características de ambos como: seletividade, rapidez, reprodutibilidade e ensaios não destrutivos. Tais

características torna essa ferramenta uma alternativa útil para o desenvolvimento de métodos de triagem.

Este trabalho aborda a imobilização da enzima butirilcolinesterase (BChE) em capilares de sílica fundida utilizada como coluna acoplada ao sistema CLAE para o desenvolvimento de um método de triagem e sua aplicação na busca por inibidores seletivos.

#### 1.1 Conceitos teóricos

#### 1.1.1 Métodos de imobilização de enzimas

As enzimas têm excelentes propriedades como atividade, seletividade e especificidade, garantindo seu elevado potencial de aplicação, mas, são limitadas devido ao custo elevado e baixa estabilidade em solução. Com os avanços da tecnologia e na tentativa de aproveitar todas as propriedades catalíticas das enzimas por um tempo maior, métodos de imobilização surgem como alternativa para estudos in vitro.

"Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico" (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009, p.176).

Esta técnica tem sido utilizada desde meados dos anos 60, mas só com os avanços da tecnologia e de acordo com as necessidades dos consumidores esta técnica foi impulsionada.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante a sua aplicação. Atualmente, várias são as aplicações como; em analítica, na indústria farmacêutica; na medicina; e na indústria de alimentos (CASTRO *et al.*, 2003).

As vantagens das enzimas imobilizadas, em relação às solúveis, surgem de sua retenção da atividade catalítica e maior estabilidade, devido a maior estabilização da estrutura da proteína ou porque estão menos acessíveis a ataques de microorganismos e/ou agentes desnaturantes. Também pela facilidade de separação do meio de reação, acarretando economia significativa no custo global do processo, desde que haja boa recuperação da atividade enzimática e que a meia-vida operacional da enzima imobilizada seja suficientemente longa (CAO, 2006).

Há vários procedimentos de imobilização a serem utilizados para a obtenção de um biocatalisador, mas a escolha do protocolo ideal depende essencialmente de três parâmetros; da enzima alvo, do suporte e do método de imobilização. Estes fatores influenciam o desempenho de um sistema com enzima imobilizada (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).

Com relação à enzima devem-se conhecer as suas propriedades e a estrutura do sítio ativo para evitar a sua inativação durante ou após o processo de imobilização.

A escolha do suporte é de extrema importância, pois é nele que a enzima vai se ligar, e então este deve garantir a acessibilidade do sítio ativo ao substrato. Devem-se considerar as características químicas, mecânicas e morfológicas do suporte. Com relação às características químicas têm-se a composição, os grupos funcionais presentes, a estabilidade química e as contribuições da superfície do suporte com relação aos efeitos de pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica e/ou hidrofílica, efeito redutor e a presença de íons metálicos (SAID; PIETRO, 2004).

Com respeito às mecânicas precisa ser considerado; o diâmetro do poro, o comportamento de compressão, tamanho da partícula, área superficial, volume acessível da matriz, resistência às forças mecânicas. Já as características morfológicas, envolvem os suportes serem não-porosos com baixa área superficial, e porosos que possuem grande área superficial, e estrutura de gel (SAID; PIETRO, 2004).

Considerando todos os fatores mencionados ressalta-se que a superfície do suporte tem uma importante contribuição na manutenção da estrutura terciária da biomolécula, o que influencia enormemente a estabilidade e a atividade catalítica da mesma. Enfim, o suporte ideal a ser utilizado deve ser o mais inerte possível, ter grande área superficial, ter elevada resistência mecânica e baixo custo de produção (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).

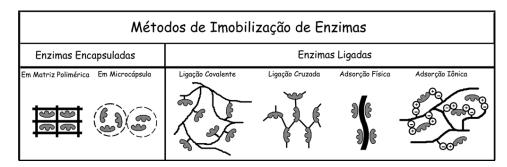
Existem vários tipos de suportes disponíveis comercialmente podendo ser orgânicos e inorgânicos (VITOLO, 2001).

O suporte inorgânico no formato de capilar de sílica fundida é muito utilizado em métodos de imobilização com enzimas, pois apresenta grande área de superfície por volume, permitindo interações adequadas entre o substrato e a enzima, as interações secundárias são minimizadas, a velocidade da reação enzimática é maior, pois a fase móvel elui através de uma coluna tubular aberta, e também possui menor resistência à transferência de massa em comparação a suportes microparticulados (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009, CARDOSO *et al.*, 2008, DE MORAES *et al.*, 2012, STIGTER; JONG; VAN BENNEKOM, 2008).

Outros exemplos de suportes podem ser encontrados na literatura (SHELDON, 2007, MATEO *et al.*, 2007). A seleção vai depender da avaliação criteriosa de todos os aspectos envolvidos no processo.

O outro parâmetro a ser considerado no desenvolvimento de um protocolo de imobilização são os métodos de imobilização empregados, ilustrados na figura 1.1

abaixo. Estes se baseiam nas ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte sendo; a adsorção, ligação covalente, ligação cruzada, imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).



**Figura 1.1:** Métodos de imobilização de enzimas (Fonte: CARDOSO; MORAES; CASS, 2009, p.180).

As enzimas podem ser encapsuladas em matriz polimérica ou microcápsula, neste modo, a enzima fica livre dentro de um espaço restrito que pode ser uma membrana, um gel, um polímero ou micela.

Na imobilização por adsorção física a enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, através de interações fracas como Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio.

Na adsorção iônica, a enzima se liga ao suporte por interações eletrostáticas entre as cargas opostas presentes na superfície do suporte e na enzima.

Imobilização por ligação cruzada têm-se enzimas ligadas umas as outras formando uma rede, ou podem ser ligadas a proteínas inertes como a gelatina ou albumina. Neste caso a imobilização é livre do suporte e as ligações entre si podem ser químicas (covalentes) ou físicas.

O método por ligação covalente, mais comumente utilizado em estudos de biocromatografia, envolve ligações covalentes entre os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos presentes na enzima com os grupos funcionais presentes na superfície do suporte. Os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos são; NH<sub>2</sub> de lisina e arginina, CO<sub>2</sub>H de ácido aspártico e glutâmico, OH de serina ou treonina, e grupo SH de cisteína.

Comparando os métodos, pode-se destacar que a imobilização por ligação covalente possui várias vantagens com relação aos outros, pois evita o fenômeno de dessorção, atuando na diminuição da velocidade de desativação espontânea além de

aumentar o tempo de vida útil e da estabilidade térmica do biorreator. Porém promovem rigidez na estrutura da enzima, limitando seu movimento quando submetida a altas temperaturas, e também possui maior facilidade em alterar a estrutura terciária nativa da enzima. Por adsorção física, pouca perturbação na estrutura da enzima é causada, mas há a desvantagem do fenômeno da dessorção. E, na ligação cruzada, o método apresenta pouca reprodutibilidade, baixa retenção da atividade e estabilidade mecânica dificultando sua aplicação industrial (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009, GIRELLI; MATTEI, 2005, CAO, 2006).

As vantagens e desvantagens entre os métodos e suportes devem ser consideradas a cada caso específico (MATEO et al., 2007).

De uma maneira geral, independente do tipo de suporte, os biorreatores com enzimas imobilizadas normalmente são denominados IMER's (do inglês: Immobilized enzyme Reactor's), e, para enzimas imobilizadas em colunas capilares nomeados (ICER's – Immobilized Capillary Enzyme Reactor's). Estes IMER's e ICER's podem ser conectados a vários tipos de sistemas analíticos para a avaliação das interações ligante-enzima. A seguir será apresentado o monitoramento desta interação em suportes cromatográficos.

#### 1.1.2. Efeitos da imobilização

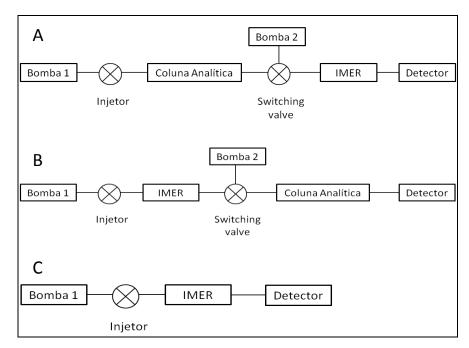
Após a imobilização, as propriedades da enzima podem sofrer modificações devido a efeitos; conformacionais, estereoquímicos, difusionais ou de transferência de massa, e microambientais. Todos esses fatores devem ser considerados sobre a estabilidade, propriedades cinéticas, especificidade e produtividade da enzima (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).

A enzima imobilizada pode apresentar novos parâmetros cinéticos ( $K_M$  e  $V_{M\acute{a}x}$ ), podendo também ter deslocamento dos valores de pH e comportamento diferente em relação a temperatura em comparação a apresentada em solução.

A diversidade de processos refletida nos diferentes substratos, tipos de reação e configuração dos biorreatores geram a necessidade do desenvolvimento de um procedimento específico de imobilização para cada biomolécula, e todos os fatores que influenciam no processo devem ser conhecidos e avaliados (CAO, 2006).

# 1.1.3. Ensaios de monitoramento da atividade com enzimas imobilizadas em suportes cromatográficos

Os IMER's ou ICER's podem ser acoplados de diferentes maneiras em sistemas cromatográficos, como; pós-coluna, pré-coluna e coluna. Esquema 1.4 A, B e C, respectivamente.



**Esquema 1.1:** Representação esquemática do uso de IMERs em sistemas on-line, A) pós-coluna, B) pré-coluna e C) coluna.

Em A, os analitos são inicialmente separados em uma coluna analítica e transferidos para o IMER para identificação dos compostos com afinidade pela enzima. Em B, os analitos são inicialmente passados pelo IMER para a seleção dos compostos com afinidade pela enzima, em seguida o produto da reação e o substrato são separados em uma coluna analítica para determinação da atividade inibitória causada na enzima. E em C, o IMER é acoplado diretamente ao detector onde os compostos da amostra são selecionados de acordo com o tempo de retenção ou pela diminuição do produto da reação catalisada pela enzima (CARDOSO; MORAES, 2009).

Assim, a atividade da enzima pode ser monitorada através da separação do excesso de substrato e produto formado em uma segunda dimensão conectando-se o biorreator em uma coluna analítica através do auxílio de uma válvula de caminhos

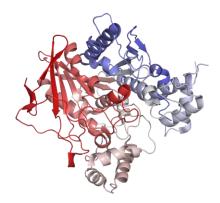
(CARDOSO *et al.*, 2008, CARDOSO *et al.* 2006); por derivatização do produto da reação enzimática gerando um composto com sinal em determinado comprimento de onda (λ) (SILVA *et al.*, 2012); ou o IMER ser diretamente conectado a um detector como espectrômetro de massas para quantificação direta do produto formado (FORSBERG; GREEN; BRENNAN, 2011). Com isto podem se obter os parâmetros cinéticos da enzima, realizar triagem e caracterização de inibidores.

A imobilização de enzimas a suportes cromatográficos tem sido amplamente utilizada em estudos farmacológicos e clínicos (GIRELLI; MATEI, 2005).

#### 1.2. Enzima alvo

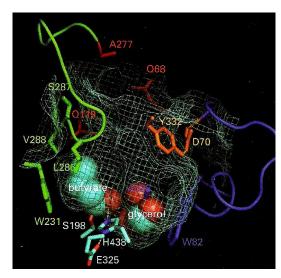
#### 1.2.1. Butirilcolinesterase

A enzima selecionada para esta pesquisa foi uma colinesterase, a Butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) da espécie humana (*human serum*), figura 1.2.



**Figura 1.2:** Estrutura cristalográfica da BChE *humana* (Fonte: http://en.academic.ru/dic.nsf/enwiki/470750).

Esta enzima é um tetrâmero de peso molecular 85 KDa, seu sítio catalítico é composto por quatro subsítios sendo: sítio periférico, onde neste acontece o primeiro contato de ligação para os possíveis substratos e inibidores; um sítio de interação  $\pi$ -cátion, onde o quaternário de amônio de colina se liga (intermediário tetraédrico do mecanismo de catálise); sítio de acilação, que é onde acontece a reação, composto por resíduos de serina (Ser 198), histidina (His 438) e Glutamina (Glu 325) formando uma tríade catalítica; e o sitío ligante acil, são alinfáticos e fazem um escudo fino contra solventes externos. E também, são encontrados moléculas de butirato e glicerol (GIACOBINI, 2003). Vide figura 1.3.



**Figura 1.3:** Sítio ativo da BChE humana (Fonte: Figure 4.6, GIACOBINI, 2003, p. 47).

A BChE é uma serina hidroxilase que atua na catálise da hidrólise de ésteres de colina, como a acetilcolina (ACh), neurotransmissor diretamente envolvido na transferencia de sinais, levando a formação de colina e ácido acético, ilustrado no esquema 1.1. Ela está presente no cérebro de mamíferos principalmente nas células gliais, no tecido endotelial e nos neurônios e exerce um papel importante na regulação da transmissão do impulso nervoso na sinapse do nervo e na junção neuromuscular (GIACOBINI, 2003).

Esquema 1.2: Hidrólise da ACh catalisada pela BChE.

Preferencialmente, a BChE catalisa a hidrólise da butirilcolina (BCh), seu substrato específico, e que é utilizado para diferenciá-la das demais colinesterases (GIACOBINI, 2003). Esquema 1.2.

Esquema 1.3: Hidrólise da BCh catalisada pela BChE.

A sua dosagem é de grande valor para o diagnóstico de pacientes com a forma atípica da enzima e em intoxicações por inseticidas organofosforados.

No caso do cérebro humano, a BChE prevalece com uma função secundária na hidrólise da ACh, desde de que a atividade da Acetilcolinesterase (AChE) predomine. No entanto, foi observado que os níveis de AChE diminuem no cérebro de pacientes portadores da Doença de Alzheimer (DA) e os níveis de BChE aumentam com o progresso da doença, fazendo com que neste momento o papel da BChE se torne mais relevante (GIACOBINI, 2003, GIACOBINI, 2000).

A DA é uma síndrome neurodegenerativa do sistema nervoso central caracterizada por um declínio progressista da memória, do pensamento, compreensão, cálculo, etc, afetando as atividades pessoais da vida diária do portador levando a óbito (ALZ. ORG, 2009, SMITH, 1999). Normalmente atinge a população idosa.

Assim, as enzimas AChE e BChE, por estarem potencialmente envolvidas em desordens do sistema nervoso central, são amplamente estudadas como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos objetivando a inibição destas enzimas para a terapêutica da DA.

Existem algumas hipóteses para explicar a DA, entre elas: neuropatologicamente no cérebro de pacientes portadores da doença observa-se, atrofia cortical difusa e alterações extracelulares com acúmulo da proteína β-amilóide; e novelos neurofibilares (alterações intracelulares verificadas no citoplasma dos neurônios com um grande acúmulo de microtubulina-*tau*) (KIM; LEE; LEE, 2010, SMITH, 1999).

Neuroquimicamente, o quadro de sinais e sintomas dessa doença está associado a déficits dos diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonima. Assim, a atividade colinérgica no sistema nervoso

central encontra-se reduzida em portadores da DA (GREENBLATT et al., 2003, FRANCIS et al., 1999, RAUNK, 2009).

Das hipóteses mencionadas, a colinérgica é a mais consistente, sendo assim, o tratamento é sintomático e consiste em resgatar a função do neurotransmissor ACh, através da inibição das enzimas AChE e/ou BChE gerando aumento nos níveis de ACh, beneficiando os portadores da doença (GOMES; KOSZUOSKI, 2005). Como mostrado no esquema 1.2.

A BChE tem também importância farmacológica e toxicológica devido a sua habilidade em hidrolisar drogas contendo éster e sequestrar inibidores de colinesterase incluindo agentes organofosforados (RAVEH *et al.*, 1997).

A BChE tem uma função importante na transmissão do impulso nervoso colinérgico em insetos, onde sua inibição causa a dessensibilização do receptor de ACh levando ao bloqueio da transmissão com consequente morte. Deste modo, esta enzima também é alvo de estudos na busca novos ligantes com o objetivo de inseticidas cada vez mais eficientes e menos agressivos tanto ao meio ambiente quanto à saúde humana (BOURGUET *et al.*, 1997, CHARPENTIER *et al.*, 2000, CORBEL *et al.*, 2009). O controle eficiente de insetos e a busca de compostos biologicamente ativos que estão intimamente relacionados com a sobrevivência do ser humano, constituem importantes aspectos a serem estudados.

Considerando a ausência de tratamentos eficientes para a DA o que constitui um sério problema não apenas de saúde pública global, mas também econômico-social. E, os grandes esforços que têm sido realizados para produzir compostos não tóxicos, principalmente ao homem, que possam controlar biorracionalmente o comportamento das pestes controlando as doenças, a enzima BChE foi selecionada como alvo biológico para a produção de ICERs no desenvolvimento de métodos de triagem de inibidores seletivos.

#### 1.3. Ensaios de monitoramento da atividade de colinesterases

Atualmente a atividade de colinesterases pode ser determinada através de diferentes métodos: ensaios colorimétricos baseados nos trabalhos de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961) e Marston (MARSTON, KISSLING, HOSTETTMANN, 2002), fluorimétricos (DÍAZ, 1997), radiométricos (GUILARTE, 1983) e eletroquímicos (SERENA *et al.*, 2007).

Segue uma descrição do método baseado no trabalho de Ellman, onde neste, o produto da reação enzimática, tiocolina, não absorve no UV então se faz uso da derivatização com um corante.

#### 1.3.1. Ensaio colorimétrico de Ellman

Nos ensaios de atividade baseados neste método modificado de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961), emprega-se o análogo do substrato ACh, a acetiltiocolina (ACThI). Ele é baseado na medida da velocidade de produção da tiocolina formada através da hidrólise da ACThI. A tiocolina formada reage com o chamado Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo com intensa absorção em 412 nm, esquema 1.4.

Esquema 1.4: Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.

Rhee e colaboradores (RHEE; VAN RIJN; VERPOORTE, 2003) estudaram o efeito falso-positivo do método de Ellman, onde os compostos¹ tidos como inibidores da AChE podem impedir a reação entre o produto da catálise enzimática e o revelador. Neste caso, não haveria a formação do ânion amarelo e resultaria na formação do halo branco, resultado considerado positivo para inibição da AChE. No entanto, não há inibição da atividade enzimática, e sim da reação química entre o produto da reação e o reagente de Ellman, fornecendo um resultado falso-positivo.

Este método é comumente utilizado em trabalhos com as colinesterases (AChE e BChE) para monitoramento de sua atividade, tanto em solução quanto imobilizadas.

-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Mais especificamente, aldeídos e aminas.

Em solução este pode ser realizado em cromatografia de camada delgada (CCD), ou micropoços (RHEE et al., 2001, RHEE et al., 2003). Segundo Jarvinen et al.(2011), obtêm-se variações nos resultados de acordo com modificações nos ensaios em solução baseados na reação de Ellman. Estas modificações podem ser diferentes tempos de incubação e de medida, temperatura, concentração de substrato e ordem de adição de reagentes. Com isto, alguns tipos de inibidores são mais favorecidos que outros acarretando resultados não reprodutíveis.

Diferentes protocolos de imobilização de colinesterases para as mais diferentes aplicações têm sido reportados na literatura<sup>2</sup>. Nestes exemplos, diferentes suportes e métodos de imobilização são utilizados empregando como método de determinação de atividade enzimática o método modificado de Ellman. Nestes casos a reação química pode ser controlada e operada continuamente, ocasionando maior reprodutibilidade nos resultados (CAO, 2006).

Para a BChE, o ICER resultante foi conectado diretamente ao sistema CLAE com detecção por UV, e utilizando o método modificado de Ellman para monitoramento dos estudos (ELLMAN, 1961, SILVA *et al.*, 2012).

#### 1.4. Cinética enzimática

Enzimas são proteínas altamente especializadas com alto grau de especificidade, aceleram a velocidade das reações químicas, pois oferecem um ambiente específico onde uma dada reação é energeticamente mais favorável, sem afetar energia livre  $(\Delta G)$  ou o equilíbrio  $(K_{eq})$ . Poucos catalisadores não biológicos têm essas propriedades (SEGEL, 1979).

Cinética enzimática é a parte da enzimologia que estuda os fatores que afetam a velocidade das reações catalisadas pelas enzimas, como; concentração da enzima [E], do substrato [S], do inibidor [I], do produto [P], de ativadores, do pH e da temperatura.

A estrutura tridimensional de uma enzima é uma decorrência da estrutura e a forma do seu sítio ativo, e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças em sua conformação fazendo com que sua atividade se torne dependente de características do meio.

\_

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Para maiores detalhes: (MARINOV et al., 2009, TUMTURK; SAHIN; DEMIREL, 2007, TANG; WANG; KANG, 2007, BARTOLINI; CAVRINI; ANDRISANO, 2005, BARTOLINI et al., 2009).

As enzimas possuem grupos tituláveis em seus resíduos de aminoácidos, e, alguns fazem parte do sítio ativo ou são importantes para a manutenção da sua estrutura. Com isto, a cada alteração provocada em seu ambiente, pH e temperatura, alguns destes grupos estarão protonados ou desprotonados causando modificações em suas habilidades de estabelecerem ligações. Existe uma concentração hidrogeniônica e uma temperatura que propicia uma conformação ideal para a enzima exercer o seu papel catalítico com eficiência, este pH e temperatura ótimos decorre do número e tipo dos grupos ionizáveis presentes, da sequência em que estão organizados, e da energia de ativação da reação (BRACHT *et al.*, 2003, NELSON; COX, 2004, SEGEL, 1979).

Um dos principais fatores que afetam a velocidade de uma reação enzimática é a [S], no entanto, estudar este efeito é complexo devido a [S] variar durante o curso de uma dada reação à medida que o substrato é convertido em produto.

Uma abordagem simplificada em experimentos cinéticos é medir a velocidade inicial da reação (V<sub>o</sub>), quando [S] é geralmente muito maior que a concentração da enzima, [E]. Assim, se o tempo de reação é suficientemente curto as mudanças na [S] serão desprezíveis e a [S] pode ser considerada constante (NELSON; COX, 2004).

O efeito em V<sub>o</sub> provocado pela variação da [S], quando a concentração de enzima é mantida constante mostrou que; a concentrações relativamente baixas de substrato, V<sub>o</sub> aumenta linearmente com o aumento da [S]. Em altas [S], V<sub>o</sub> aumenta cada vez menos, até que finalmente é alcançado um ponto acima do qual ocorrem aumentos insignificantes de V<sub>o</sub> à medida que a [S] aumenta (NELSON; COX, 2004). Figura 1.4.

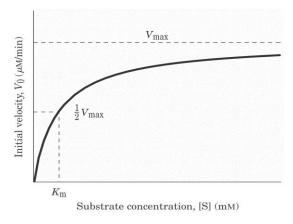


Figura 1.4: Efeito da [S] na V<sub>0</sub>. Fonte: figura 8.11 (NELSON; COX, 2004).

Para compreensão deste comportamento é fundamental entender o complexo enzima-substrato (ES) que é formado, sendo este o ponto de partida para a discussão da cinética enzimática.

Em 1913, uma teoria geral da ação das enzimas foi proposta por Leonor Michaelis e Maud Menten chegando numa equação quantitativa para a relação [S] e  $V_0$ . Equação 1.1.

$$V_0 = \frac{V_{M\text{\'A}X} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$
 Equação 1.1

Onde  $K_M$  (constante de Michaelis) é a concentração de substrato onde  $V_o$  é metade da velocidade máxima ( $V_{M\acute{a}x}$ ).

Esta equação é chamada de Michaelis & Menten e 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 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). Deste modo, a velocidade da reação enzimática deve ser proporcional à concentração da substância que reage na etapa lenta, a ES (NELSON; COX, 2004).

Uma reação catalisada por enzima existe em duas formas, a forma livre E, e a forma ligada ao substrato ES. Em baixas [S], a maior parte da enzima está na forma E e nestas condições a velocidade da reação será proporcional à [S]. A V<sub>Máx</sub> será atingida quando todas as moléculas da enzima estiverem na forma do complexo ES, isto acontece quando a [S] for suficientemente alta para manter todas as moléculas de enzima na forma combinada com o substrato, e a concentração da E for significativamente pequena, com isto, a velocidade da reação não aumenta mais com novos aumentos da [S]. Em seguida o complexo ES se transforma no produto P e a enzima é liberada para uma nova catálise (NELSON; COX, 2004).

Sempre que [S] for suficientemente alta, a condição de saturação existirá, e este efeito de saturação com o substrato é uma característica que distingue os catalisadores enzimáticos.

O conceito de estado estacionário foi introduzido por Briggs & Haldane em 1925, prediz que; se a velocidade com o qual o complexo ES forma E + P é rápida

comparada com a velocidade com que ES se dissocia em E + S, a E, o S e ES não estão em equilíbrio. Então, quando a enzima está numa condição de excesso de substrato, existe um período inicial, denominado estado pré-estacionário, onde a concentração de ES aumenta. A reação atinge rapidamente o estado estacionário, onde a [ES] permanecerá praticamente constante durante o decorrer de certo tempo. A medida da V<sub>o</sub> geralmente reflete o estado estacionário e a análise destas velocidades iniciais é chamada de cinética de estado estacionário (NELSON; COX, 2004, SEGEL, 1979).

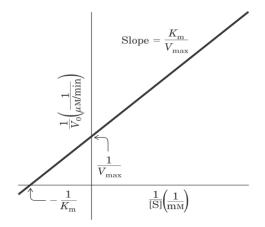
Com tratamento introduzido por Briggs & Haldane considerando condições de estado estacionário, a equação de Michaelis & Menten foi desenvolvida novamente, e a equação de velocidade obtida é a mesma, equação 1.1.

A equação de Michaelis & Menten, somente é válida quando  $V_0$  é medida num tempo pequeno o suficiente para que a [S] permaneça praticamente constante, e para isto, não mais que 5% do substrato devem ser consumidos durante o tempo de ensaio (SEGEL, 1979).

A constante de Michaelis,  $K_M$ , é dinâmica e expressa a relação entre as concentrações reais no estado estacionário. É muito importante determinar o seu valor, pois, relaciona a velocidade de uma reação enzimática com a concentração de substrato; seu valor numérico fornece um meio de comparação entre enzimas de diferentes fontes e estágios de desenvolvimento. Uma variação do seu valor real de  $K_M$  induzida por um ligante é uma maneira de regulação da atividade de uma enzima; se conhecermos  $K_M$  pode-se ajustar as condições de experiência onde  $[S] >> K_M$  e com isso dosar a atividade da enzima. Essa informação dá uma idéia da preferência da enzima pelo substrato, isto é, o substrato com valor mais baixo de  $K_M$  tem uma afinidade maior pela enzima (NELSON; COX, 2004, SEGEL, 1979).

Para a determinação dos parâmetros cinéticos,  $K_M$  e  $V_{M\acute{a}x}$ , de uma enzima, experimentos são realizados a partir de medidas de  $V_o$  de reação variando-se concentrações de substrato. Os dados são tratados por dois procedimentos, gráficos e numéricos. Os gráficos consistem em: representação gráfica da equação de Michaelis & Menten (1.1), conforme a figura 1.4; e também, pode ser por uma linearização da equação de Michaelis & Menten (1.1). A forma mais comum de linearização é a de Lineweaver-Burk, representação duplamente recíproca de  $1/V_0$  vs 1/S ilustrado na figura 1.5 (BRACHT *et al*, 2003).

Neste caso, fornece dados mais precisos que o gráfico V<sub>0</sub> vs [S].



**Figura 1.5:** Representação de Lineweaver-Burk. Fonte: figura 8.12 (NELSON; COX, 2004).

Para enzimas Michaelianas, que obedecem a cinética de Michaelis & Menten, a curvatura apresentada pelo gráfico  $V_0$  vs [S] (figura 1.4) é um hipérbole retangular cujos limites são -  $K_M$  e  $V_{M\acute{a}x}$ , a curvatura é fixa independentemente dos valores da  $K_M$  e  $V_{M\acute{a}x}$ . Então qualquer razão das [S] para quaisquer duas frações de  $V_{M\acute{a}x}$  é constante. E para o recíproco, a relação  $1/V_0$  vs 1/[S] é linear (BRACHT *et al.*, 2003, SEGEL, 1979).

Mas, há o problema da imprecisão na avaliação gráfica para os cálculos dos parâmetros cinéticos de uma enzima, então, o melhor meio de solucionar este problema veio com o método numérico.

Os métodos numéricos consistem em fazer regressões não-lineares de mínimos quadrados os quais permitem ajustar a equação de Michaelis-Menten aos dados obtidos. Para isto existem softwares modernos que permitem fazer estes ajustes, como Sigma Plot <sup>®</sup>, Scientist, etc (BRACHT *et al.*, 2003). Ou podem ser realizados por meio de planilha eletrônica ou calculadora conforme descrito pelo método de (WILKINSON, 1961).

A equação de Michaelis-Menten pode ser transformada algebricamente em formas que são úteis para a determinação prática de  $K_M$  e  $V_{M\acute{a}x}$  como na análise da ação de inibidores, descrito na próxima seção.

#### 1.5. Inibidores enzimáticos

Toda substância que reduz a velocidade de uma reação catalisada enzimaticamente pode ser considerada um inibidor (drogas, antibióticos, venenos, toxinas, etc).

As enzimas catalisam potencialmente todos os processos celulares e possuem papéis importantes nos processos vitais e patológicos, e, portanto são alvo em estudos de desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos, e na busca por novos ligantes com o objetivo de agrotóxicos<sup>3</sup> cada vez mais eficientes e menos agressivos tanto ao meio ambiente quanto à saúde humana. O método normalmente utilizado para a descoberta de novos inibidores candidatos a fármacos envolve a seleção da enzima cuja atividade está associada a alguma desordem ou doença (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).

O estudo dos inibidores das enzimas tem fornecido informações fundamentais a respeito dos mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir algumas vias metabólicas (NELSON; COX, 2004).

Há duas classes principais de inibidores, os reversíveis e os irreversíveis.

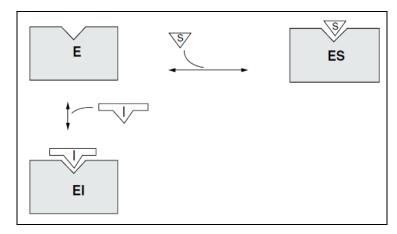
Os reversíveis são compostos que se ligam em sítios específicos na enzima de modo que a atividade enzimática possa ser resgatada por meios físicos. Estes estão subdividos em competitivos, não-competitivos, incompetitivos de acordo com o modo de atuação de inibição. Os irreversíveis reagem covalentemente com a enzima inativando-a. Somente por meios químicos a atividade da enzima pode ser restaurada (NELSON; COX, 2004, COPELAND, 2005).

Segue uma descrição sucinta de cada tipo de inibição reversível.

#### 1.5.1. Inibição reversível competitiva

Um inibidor competitivo atua competindo com o substrato pelo sítio ativo da enzima, neste caso, o inibidor não se liga no complexo ES. Esquema 1.4.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Outros termos podem aparecem como sinônimos como: agroquímicos, defensivos agrícolas e pesticidas.

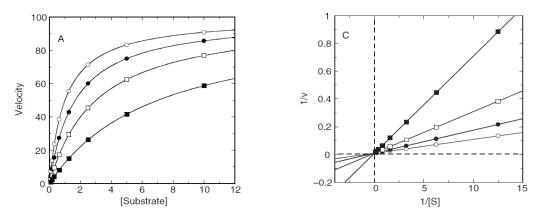


**Esquema 1.5:** Representação de equilíbrio enzimático com um inibidor competitivo. (Fonte: figura 3.2 A de COPELAND, 2005 p. 50).

A equação de velocidade de Michaelis & Menten para um inibidor competitivo difere pelo termo  $[1 + ([I] / K_i)]$  multiplicando a  $K_M$ , equação 1.2 (SEGEL, 1979).

$$V_0 = V_{Máx}[S]$$
 Equação 1.2 
$$K_M \left(1 + \underbrace{[I]}{K_i}\right) + [S]$$

Com a dedução da equação acima, 1.2, tem-se que a  $V_{M\acute{a}x}$  não é afetada por um inibidor competitivo, mas a  $K_M$  aparente ( $K_{Map}$ ) é aumentada pois existe uma fração da enzima sob a forma EI que não possui afinidade pelo substrato. O aumento aparente no valor da  $K_M$  resulta da distribuição de E livre com afinidade total e nenhuma afinidade. A equação 1.2 acima pode ser linearizada como ilutrado na figura 1.6. (SEGEL, 1979).



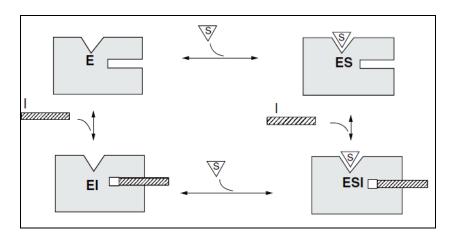
**Figura 1.6:** Representação de Michaelis & Menten e Lineweaver-Burk para inibição competitiva. (Fonte: figura 3.3 A e C de COPELAND, 2005, p. 52).

No gráfico da hipérbole (Figura 1.6 A) a curva de maior inclinação é a que representa a velocidade da reação na ausência de inibidor competitivo (controle) e as outras na presença de inibidor ilustrando o efeito na K<sub>Map</sub>. E no gráfico recíproco (figura 1.6 B) a de menor inclinação é o controle e as demais são com crescentes concentrações de inibidor. Nota-se que as retas se interceptam num mesmo ponto no eixo y, mas com inclinações diferentes.

Este efeito na  $K_{\text{Map}}$  associado com as inalterações na  $V_{\text{Máx}}$  é utilizado na identificação de inibidores competitivos (COPELAND, 2005).

## 1.5.2. Inibição reversível não-competitiva

Neste caso o inibidor não-competitivo possui afinidade tanto pela enzima quanto pelo complexo ES, então ele pode se ligar tanto na forma E livre quanto ao complexo ES, ou seja, se liga reversível e independentemente do substrato. Esquema 1.5.

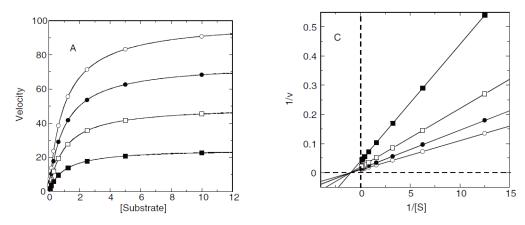


**Esquema 1.6:** Representação de equilíbrio enzimático com um inibidor não-competitivo. (Fonte: figura 3.2 A de COPELAND, 2005 p. 50).

A equação de velocidade de Michaelis & Menten para um inibidor não-competitivo difere pelo termo [1 + ([I] /  $K_i$ )] multiplicando tanto a  $K_M$  quanto a  $V_{M\acute{a}x}$ , equação 1.3 (SEGEL, 1979).

$$V_0 = \frac{V_{\textit{Máx}}[S]}{K_M \left(1 + \underbrace{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \underbrace{[I]}{K_i}\right)}$$
 Equação 1.3

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 ESI, a  $K_M$  permanece a mesma porque as formas da enzima que podem combinar com o substrato são as mesmas, E e EI. O efeito final desta inibição é fazer com que pareça que haja menor quantidade de enzima (SEGEL, 1979). Seguem ilustrações da equação 1.3.



**Figura 1.7:** Representação de Michaelis & Menten e Lineweaver-Burk para inibição não-competitiva. (Fonte: figura 3.6 A e C de COPELAND, 2005, p. 60).

Da mesma forma que anteriormente, na hipérbole (figura 1.7 A) a curva de maior inclinação é a que representa controle e as outras na presença de inibidor. No recíproco (figura 1.7 B) a de menor inclinação é o controle e as demais são as retas na presença de crescentes concentrações do inibidor não-competitivo. Neste caso, tanto as inclinações quanto as interseções são alteradas confirmando o termo acrescido na equação 1.3.

Existem poucos inibidores com esta ação refletindo a tendência na busca por novos ligantes que atuem diretamente no sítio ativo.

## 1.5.3. Inibição reversível incompetitiva

O inibidor incompetitivo demonstra pouca afinidade pela enzima, sendo assim ele se liga apenas ao complexo ES, fornecendo um complexo ESI inativo. Esquema 1.6.

Equação 1.4

A equação de velocidade de Michaelis & Menten para um inibidor incompetitivo difere pelo termo [1 + ([I] / K<sub>i</sub>)] multiplicando a [S], equação 1.4 (SEGEL, 1979).

$$V_0 = V_{M\acute{a}x} [S]$$
 Equação 1.4

Esquema 1.7: Representação de equilíbrio enzimático com um inibidor incompetitivo. (Fonte: figura 3.2 A de COPELAND, 2005 p. 50).

Aqui, qualquer que seja [I], uma [S] grande não levaria toda a enzima na forma do complexo ES, pois parte deste estará na forma do complexo inativo ESI e, portanto a reação não prossegue. Consequentemente  $V_{\text{Máx}}$  e  $K_{\text{Map}}$  são diminuídas pelo mesmo valor (SEGEL, 1979). Veja figura 1.8, com as representações da equação 1.4.

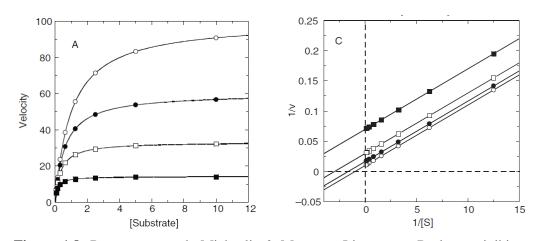


Figura 1.8: Representação de Michaelis & Menten e Lineweaver-Burk para inibição incompetitiva. (Fonte: figura 3.12 A e C de COPELAND, 2005, p. 69).

Na hipérbole (figura 1.8 A) a curva de maior inclinação é a que representa controle e as outras representam a presença de inibidor. No recíproco (figura 1.8 B) a de menor inclinação é o controle e as demais na presença de crescentes concentrações de inibidor incompetitivo, neste caso, as retas estão em paralelo, pois a medida que [I] cresce a intersecção com o eixo y também cresce.

## 1.6. Caracterização de inibidores

A caracterização de inibidores é realizada de acordo com a influência destes nos parâmetros cinéticos da enzima. Várias representações podem ser feitas, todas derivadas da equação de Michaelis & Menten, como; Lineweaver-Burk, Dixon, Eadie-Hofstee, e de Hanees (BRACHT *et al.*, 2003).

Destacando a representação recíproca de Lineweaver-Burk, para cada composto selecionado são realizados estudos cinéticos em diferentes concentrações, para cada cinética é traçada uma reta pelo método recíproco utilizando a equação de Michaelis & Menten linearizada obtendo um conjunto de retas como descrito em 1.5.1, 1.5.2, 1.5.3 (SEGEL, 1979).

De acordo com a ação de cada composto selecionado será exibido um perfil de gráfico podendo então ser classificado em competitivos, não-competitivos ou incompetitivos. Reveja figuras 1.6, 1.7, 1.8.

Para cálculos dos valores de Ki, é traçado outro gráfico com os valores encontrados das inclinações e/ou intersecções (dependendo do mecanismo de inibição encontrado) das retas do recíproco versus a [I] correspondente. (SEGEL, 1979).

Para inibição competitiva um gráfico é traçado com os valores das inclinações, que corresponde a  $(K_{Map}/V_{Máx})$ , de cada reta do recíproco versus as concentrações de inibidor correspondente, e a partir da interseção com o eixo x pode-se obter o valor de  $K_i$  (SEGEL, 1979).

Para inibição não-competitiva e incompetitiva, gráfico traçado com os valores das interseções que corresponde a  $(1/V_{M\acute{a}x})$  das retas do recíproco versus as concentrações de inibidor correspondentes, e a partir da interseção com o eixo x, o valor de  $K_i$  é encontrado (SEGEL,1979).

## 1.7. Inibidores padrões da BChE

Existem vários compostos que atuam como inibidores padrões de colinesterases, AChE e BChE, com especificidade para uma ou outra enzima. Seguem alguns compostos de interesse clínico.

Fisostigmina, também conhecido como eserina, é um alcalóide isolado da planta *Physostigmina venenosum*, considerado o primeiro e melhor alcalóide com atividade anti-colinesterásica. Este composto é um inibidor reversível específico para a BChE, no entanto, não é administrado na terapêutica em humanos devido aos efeitos colaterais causados. Mas devido a sua alta seletividade e eficácia anti-colinesterásica, várias sínteses de análogos tem sido reportados (GIACOBINI, 2003).

A Galantamina é um alcalóide de origem natural, das espécies *Gallantus nivalis*, *Narcissus sp. e Leucojum sp*, é um inibidor reversível apresentando uma seletividade de nove vezes para a AChE quando comparado para a BChE<sup>4</sup> (GIACOBINI, 2003). É administrado como fármaco para a com o nome comercial de Reminyl®.

A Rivastigmina é um inibidor derivado dos carbamatos, normalmente estes são utilizados na agricultura como inseticidas. É um inibidor pseudo-irreversível com seletividade de 122 vezes para a BChE quando comparado com a AChE. É também administrado na terapêutica da DA, níveis leve e moderado, com o nome comercial Excelon®.

Outros inibidores são conhecidos como; Donepezil, Huperzina A e Tacrina. Sendo o Donepezil, vendido comercialmente como Aricept® para o tratamento DA, e a Huperzina A mais seletivos para a AChE. A tacrina, pertencente à classe de acridinas, é um inibidor reversível com seletividade maior para a BChE (GIACOBINI, 2003). Segue tabela 1.1 com as estruturas químicas de cada composto.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Tabela 6.1 p. 74 em (GIACOBINI, 2003) mostra quantitativamente a comparação de valores de IC50 para AChE e BChE em solução.

Tabela 1.1: Estruturas químicas de inibidores padrão de colinesterases.

Eserina	Galantamina	Rivastigmina		
H O N H	H <sub>3</sub> CO H OH			
Huperzina-A	Tacrina	Donepezil		
H <sub>2</sub> N O	NH <sub>2</sub>			

## 2. Objetivos

## 2.1. Objetivos Gerais:

Desenvolver colunas enzimáticas com a enzima butirilcolinesterase para serem empregadas na triagem de inibidores seletivos em coleções de moléculas naturais e combinatórias sintéticas.

## 2.2. Objetivos específicos:

- Imobilizar a enzima BChE em capilares de sílica fundida preparando ICER-BChE;
- Avaliar a atividade enzimática e a estabilidade nas condições cromatográficas de análise;
- Realizar os estudos cinéticos para BChE imobilizada;
- Desenvolver e validar o método com o ICER-BChE;
- Validar o uso do ICER na avaliação da atividade biológica de inibidores, empregando compostos conhecidamente ativos.
- Aplicar o método desenvolvido e validado na triagem e caracterização de novos ligantes inibidores da BChE.

## 3. Procedimento Experimental

#### 3.1. Materiais

A enzima BChE (EC 3.1.1.8, de soro humano, 50 unidades / mg), o substrato iodeto de butiriltiocolina (BTChI), reagente de Ellman, galantamina, eserina foram adquiridos da Sigma – Aldrich. Glutaraldeído, componentes do tampão, e todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico e adquiridos de diversas fontes como, Sigma, Merck, Synth e Acros.

As colunas enzimáticas foram preparadas utilizando capilares de sílica fundida (0,375 mm x 100  $\mu$ M d.i.) adquiridos da Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema MILLI-Q (MILLIPORE).

Todas as soluções tampão e solventes grau analíticos foram filtrados a vácuo em um sistema MILLIPORE, utilizando membranas de nitrato de celulose PHENOMENEX de 0,45  $\mu$ M, e posteriormente degaseificados em ultrassom Unique – Ultracleaner 1400.

## 3.2. Aparatos

Para o preparo do capilar e imobilização da enzima foi utilizada uma bomba seringa - Syringe Pump 2211 plus.

As análises foram realizadas no cromatógrafo líquido SHIMADZU — PROMINANCE possui duas bombas SHIMADZU LC 20 AD, onde uma delas está acoplada a uma válvula seletora de solvente SHIMADZU FCV-20AL para gradiente de baixa pressão; um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável SHIMADZU SPD-M20A; um auto-injetor SHIMADZU SIL-20A e uma válvula de seis caminhos VALCO que será utilizada para o sequenciamento de colunas. O equipamento está acoplado a uma interface SHIMADZU CBM-20A e os cromatogramas são registrados através de um software LC Solutions no Departamento de Química da USP-RP.

A homogeneização das amostras foi efetuada em um vórtex Heidolph Reax top.

28

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica Marte, modelo

AY220, com precisão 0,0001g.

As medidas de pH foram realizadas em pH-metro Marte MB 10 com precisão

0,01.

Para o ensaio com a enzima em solução foi utilizado um sistema de microplacas

leitora de Elisa (Elisa readers – Versa Max – Molecular Device).

3.3. Tampão de trabalho

A fase móvel designada tampão de trabalho utilizada nas análises foi preparada

acrescentando-se 1,21g (0,1 M) de Tris [(hidroximetil) aminometano] e 0,005g

(1,26.10<sup>-4</sup> M) do Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) a um

volume final de 100 mL em água com pH ajustado a 8,0 (adição de solução de HCl

10% em volume).

3.4. Imobilização da enzima BChE em capilares de sílica fundida

A enzima BChE foi imobilizada em capilares de sílica fundida com dimensões

de 100 µM d.i x 0,375 mm x 15 cm pelo método de imobilização covalente usando o

agente homobifuncional amino-reativo, glutaraldeído como espaçador (SILVA et al.,

2012), consistindo de três etapas.

3.4.1. 1ª etapa: Pré-tratamento corrosivo do capilar de sílica fundida

Utilizando uma bomba seringa com uma vazão de 130 µL.min <sup>-1</sup> percolou-se

pelo capilar, 2,0 mL de uma solução de HCl (2,0 M), em seguida 1,0 mL de água

deionizada e este foi colocado na estufa à 95 °C durante 1 hora. Após, 1,0 mL de uma

solução de aminopropiltrietóxisilano (APTES) (10% em água) foi percolada pelo

capilar e este foi novamente colocado em estufa a 95°C durante meia hora.

Posteriormente, o capilar foi deixado a temperatura ambiente por 12 horas.

3.4.2. 2ª etapa: Imobilização da BChE

No capilar pré-tratado, 1,5 mL de solução glutaraldeído 1% em solução KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM, pH 7,4) foi percolada pelo capilar, em seguida 0,5 mL de solução KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM, pH 7,4). Após esta etapa a vazão da bomba seringa passa para 5 μL.min <sup>-1</sup>. Em seguida 0,5 mL de solução enzimática é percolado (0,34 mg/mL com aproximadamente 16.93 unidades de enzima) por três vezes.

## 3.4.3. 3ª etapa: Redução das Bases de Schiff

Na sequência se inicia o processo de redução das bases de schiff formadas durante o processo de imobilização. Esse processo consiste em percolar uma solução do borohidreto de sódio (5 mg/mL) preparada em tampão fosfato por 1h, após uma solução de tampão fosfato por 5 min seguido de uma solução de monoetanolamina (0,1M) por 1h e novamente uma solução de tampão fosfato por 5min, e por fim 1,0 mL de tampão trabalho.

O capilar resultante foi denominado ICER-BChE, e permaneceu com suas extremidades imersas no tampão trabalho a 4 °C quando não estava em uso.

## 3.5. Determinação da atividade enzimática da BChE imobilizada

O ICER-BChE preparado foi conectado a um sistema de cromatografia líquida (CL) e equilibrado por 30 minutos com o tampão de trabalho. A atividade enzimática foi avaliada pelo método modificado de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961).

Alíquotas de 10µL de solução de BTChI (50 mM) foram injetadas em fluxo para a avaliação da atividade enzimática do ICER-BChE recém preparado, e o produto da reação foi observado pela banda cromatográfica que corresponde ao ânion amarelo formado em 412 nm.

# 3.6. Preparo da solução de BTChI utilizada no desenvolvimento do método analítico

A solução de substrato utilizada para o estudo da atividade enzimática foi preparada na concentração de 50,0 mM solubilizando-se 0,40 g em um volume final de 25,0 mL de água.

## 3.7. Estudo da influência da vazão

Alíquotas de 10μL da solução de substrato BTChI (50 mM) foram injetadas (em duplicata) em cinco diferentes vazões no ICER-BChE, num sistema em fluxo. Foram avaliadas as vazões de 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1e 0,15 mL.min <sup>-1</sup>.

## 3.8. Estudo da influência do pH

## 3.8.1. Influência do pH na atividade do ICER-BChE

O ICER-BChE conectado a CL foi equilibrado por 30 minutos com o tampão de trabalho com valores de pH ajustados entre 7,0 a 9,0. Alíquotas de 10µL da solução de BTChI (50 mM) foram injetados (em duplicata, vazão 0,05 mL.min <sup>-1</sup>, detecção em 412nm). A área da banda cromatográfica referente ao produto da reação enzimática foi integrada e plotada contra o valor de pH da fase móvel.

## 3.8.2. Influência do pH na estabilidade da atividade do ICER-BChE

Três ICER-BChE foram utilizados, suas extremidades ficaram imersas no tampão de trabalho em três diferentes valores de pH: 7,5; 8,0 e 8,5. Alíquotas de 10 μL de BTChI (50 mM) foram injetadas (duplicata) a cada duas horas num total de 10 horas para cada valor de pH. Condições: vazão 0,05mL.min<sup>-1</sup> e detecção 412nm.

A área da banda referente ao produto da reação enzimática foi integrada e plotada contra o tempo de exposição em cada valor de pH.

## 3.9. Validação do método desenvolvido

## 3.9.1 Preparo das soluções de BTChI utilizadas na curva de calibração

Soluções estoques de 10 mM e 100 mM de BTChI foram preparadas. Para 10 mM solubilizou— se 3,16 mg de BTChI em um volume final de 10 mL de água e para 100 mM, 31,6 mg de BTChI em volume final de 10,0 mL de água. As soluções utilizadas na obtenção da curva de calibração foram preparadas a partir de diluições das soluções estoques nas seguintes concentrações: 0,25; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0 mM a um volume final de 5mL.

## 3.9.2. Curva de calibração

A partir das soluções de BTChI: 0,25; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0 mM foram preparadas amostras (em triplicata) com 50 μL de cada concentração acima e 50 μL de tampão de trabalho. As amostras foram homogeneizadas em vortéx por 10 segundos, alíquotas de 100 μL foram transferidas para o frasco do auto-injetor, e 10 μL foram injetados no cromatógrafo.

A curva de calibração foi obtida através da regressão linear a partir da área da banda cromatográfica a uma dada concentração de BTChI.

## 3.9.3. Validação do método analítico

Para a validação do método analítico, segundo parâmetros preconizados pela ANVISA - métodos bioanalíticos (RIBANI *et al.* 2004, CASSIANO *et al.*, 2009), as seguintes figuras de mérito foram avaliadas: seletividade, linearidade, repetibilidade, precisão, exatidão, limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).

A precisão intra – dia e a exatidão foram avaliadas pela análise de três controles de qualidade em três diferentes concentrações (baixo, médio e alto - 3, 30, e 54 mM em relação ao intervalo da curva de calibração). Cinco amostras de cada concentração foram injetadas no ICER – BChE em três dias não consecutivos.

Para a avaliação da seletividade, amostras de branco (50  $\mu$ L de água e 50  $\mu$ L de tampão) foram injetadas três vezes a cada sequência de análise (RIBANI *et al.* 2004, CASSIANO *et al.*, 2009).

## 3.10. Medida da Velocidade inicial da reação (V<sub>0</sub>) no ICER - BChE

Foram injetadas alíquotas de  $10~\mu L$  da solução do substrato BTChI nas concentrações de: 1; 5; 10; 15; 20; 50 e 100~mM no ICER-BChE, nas mesmas condições cromatográficas descritas para o método. O produto da reação enzimática foi coletado, após 5 minutos de análise cromatográfica em poços de microplacas para leitura em 412nm utilizando-se uma leitora de Elisa. Através da lei de Lambert Beer, a  $V_0$  pôde ser determinada.

#### $A = \varepsilon.b.c$

Onde:

A = Absorbância da área do pico coletado;

b = comprimento do micropoço em cm;

c = concentração de produto formado;

 $\varepsilon$  = coeficiente de extinção molar do ânion amarelo formado, 13.600 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup> (ELLMAN *et al.*, 1961).

## 3.11. Estudo do parâmetro cinético K<sub>M</sub>

O parâmetro cinético, constante de Michaelis  $(K_M)$  utilizando o ICER-BChE foi obtido pela medida da velocidade da reação frente a diferentes concentrações de substrato BTChI.

As soluções estoque de BTChI foram preparadas nas concentrações de 10 mM, 100 mM e 200 mM, a um volume final de 10mL. As soluções utilizadas para a obtenção da curva foram preparadas a partir de diluições das soluções estoques nas seguintes concentrações: 5; 10; 15; 20; 30; 40; 60; 80; 100 mM. Foram injetados 10μL das soluções de BTChI em duplicata nas condições cromatográficas: vazão 0.05 mL.min<sup>-1</sup> e detecção 412 nm.

Os dados experimentais obtidos foram analisados usando o software Sigma Plot versão 12.0 e o valore de  $K_M$  calculado através da análise de regressão não linear de melhor ajuste.

## 3.12 Modificador orgânico

#### 3.12.1. Modificador orgânico na atividade do ICER-BChE

Para avaliar a influência de solventes orgânicos na atividade enzimática foi realizado um estudo com os solventes: Metanol (MeOH), etanol (EtOH), 1- Butanol, 2- propanol, Dimetilsulfóxido (DMSO) e Acetonitrila (ACN).

Para cada solvente foram preparadas soluções de 50% v/v, onde alíquotas de 50  $\mu L$  dos solventes foram adicionadas a 100  $\mu L$  da solução de BTChI (50mM) e a 50 $\mu L$  de tampão de trabalho. 10  $\mu L$  dessas soluções foram injetadas em fluxo utilizando o

tampão trabalho como fase móvel. Antes de cada injeção da amostra com o solvente a atividade do ICER-BChE foi avaliada na ausência do solvente.

## 3.12.2. Modificador orgânico na fase móvel

Foi realizado um estudo com a adição do solvente orgânico, EtOH, na fase móvel variando de 10 a 80 %, injetando 10 µL do substrato BTChI (50 mM). Após, foi realizado o teste de atividade do ICER-BChE sem solvente orgânico na fase móvel.

## 3.13. Estudos de inibição

#### 3.13.1. Validação com inibidores padrões

## Determinação da Potência Inibitória (IC<sub>50</sub>) de inibidores padrões

Dois inibidores padrões de colinesterases (GIACOBINI, 2003), a eserina e a galantamina foram avaliados no ICER-BChE.

As soluções estoque dos inibidores padrões galantamina e eserina nas concentrações de 1 mM e 1  $\mu$ M, respectivamente, foram preparados em água. Para as curvas dose resposta, as concentrações de cada inibidor padrão variavam de 0,005 a 10  $\mu$ M para galantamina, e de 2 a 12 nM para eserina com a adição da solução de substrato BTChI (50 mM).

O preparo das soluções foi realizado a partir da adição de 30  $\mu$ L do tampão de trabalho, 20  $\mu$ L da solução de BTChI (50 mM), e volumes variáveis entre 0 e 50  $\mu$ L das soluções estoque dos inibidores galantamina e eserina. O volume foi completado para 100  $\mu$ L com MeOH : H<sub>2</sub>O (1:1 v/v).

A atividade enzimática na ausência do inibidor consistiu em:  $30\mu L$  do tampão de trabalho,  $20~\mu L$  da solução de BTChI (50~mM),  $20\mu L$  de MeOH :  $H_2O$  (1:1~v/v) e  $30\mu L$  de água. As soluções foram preparadas em duplicata e alíquotas de  $10\mu L$  foram injetadas.

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor  $(A_i)$  com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor  $(A_0)$ , de acordo com a equação abaixo:

Os dados foram tratados através do método da regressão não-linear de melhor ajuste empregando o programa SigmaPlot 12.0.

## 3.13.2. Triagem de inibidores: Teste pontual com os compostos Sintéticos

A triagem inicial dos compostos foi realizada avaliando-se o percentual de inibição a 200  $\mu M$ .

As soluções estoque dos compostos sintéticos foram preparadas em MeOH:  $H_2O$  (1:1 v/v) na concentração de 1 mM. As amostras foram preparadas adicionando – se 60  $\mu$ L da solução de tampão de trabalho, 20  $\mu$ L da solução do inibidor e 20  $\mu$ L da solução de BTChI (200 mM) em volume final de 100  $\mu$ L. As soluções foram preparadas em duplicata, homogeneizadas em vortéx por 10 segundos e em seguida transferidas para o frasco do auto-injetor e alíquotas de 10  $\mu$ L foram injetadas no cromatógrafo.

A atividade da enzima na ausência do inibidor foi avaliada (em duplicata) antes de cada composto avaliado. A solução foi preparada com a adição de 60  $\mu$ L da solução de tampão de trabalho, 20  $\mu$ L de BTChI (200 mM) e 20  $\mu$ L do solvente MeOH:  $H_2O$  (1:1 v/v).

Para avaliar a absorção de cada composto no comprimento de onda utilizado (412 nm) pelo método desenvolvido, foram preparadas soluções do branco de cada composto a ser analisado com a adição de 60 μL da solução de tampão de trabalho, 20 μL da solução do inibidor e 20 μL do solvente MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1 v/v)

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor  $(A_i)$  com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor  $(A_0)$  de acordo com a equação 3.1 descrito na seção (3.13.1.)

Os compostos que apresentarem %I  $\geq$  70% a 200  $\mu M$  foram selecionados para determinação da potencia inibitória (IC50).

## 3.13.3. Determinação da Potência Inibitória (IC<sub>50</sub>) dos compostos sintéticos

Para o estudo da potência inibitória dos compostos identificados pelo ICER-BChE foram construídas curvas de IC $_{50}$  avaliando-se a porcentagem de inibição a partir de variações nas concentrações de cada ligante. Para esta avaliação utilizou-se uma faixa de concentração de 5 a 500  $\mu$ M (em duplicata) de cada composto com a adição da solução de BTChI 50 mM.

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor  $(A_i)$  com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor  $(A_0)$  de acordo com a equação 1 e tratados como descrito na seção (3.13.1.).

## 3.13.4. Determinação do tipo de mecanismo e da constante (K<sub>i</sub>)

O tipo de inibição e o valor da constante  $K_i$  foram determinados para 2 cumarinas, dois complexos metálicos com Cu e para o inibidor padrão eserina. Para este ensaio soluções de BTChI de 10, 34, 50 e 60 mM foram preparadas, valores selecionados devido ao  $K_M$  do ICER-BChE, contendo três diferentes concentrações de cada inibidor, valores escolhidos de acordo com o IC $_{50}$  de cada composto.

O preparo das soluções foi realizado a partir da adição de um volume fixo do tampão de trabalho (60  $\mu$ L), volume fixo de inibidor (para cada concentração escolhida), volumes variáveis de BTChI (de acordo com a concentração 10, 34, 50 e 60 mM), e completado para 100  $\mu$ L com  $H_2O$ . As soluções foram preparadas em duplicata, homogeneizadas em vortéx por 10 segundos e em seguida transferidas para o frasco do auto-injetor e alíquotas de 10  $\mu$ L foram injetadas no cromatógrafo.

Os dados obtidos deste estudo foram ajustados às equações 1.2 e 1.4 que descrevem inibição competitiva e incompetitiva, respectivamente.

#### 3.13.5. Classes de compostos avaliados

Cinco bibliotecas de compostos sintéticos foram avaliadas usando o ICER – BChE. Uma contendo 20 derivados de Cumarinas (tabela 4.3) (ALVIM *et al.*, 2005), cedidas pela Profa. Dra. Arlene Gonçalves Corrêa da UFSCar, fazendo parte da dissertação de mestrado do aluno Lucas Campos Curcino Vieira (VIEIRA, 2010).

A outra com 32 derivados de flavonóides e complexos metálicos com Cobre (Cu) (tabela 4.4), e outra com 14 complexos metálicos com Zinco (Zn) e Cobalto

(Co), foram cedidas pelo Prof. Dr. João Batista Fernandes da UFSCar, fazendo parte da tese de doutorado do aluno André Lúcio F. Sarria (SARRIA, 2012).

Uma classe com 23 compostos Glicosídeos cedidos pelo Prof. Dr. Ricardo José Alves da UFMG em Belo Horizonte.

E por fim, uma classe com compostos híbridos de fenilpropanóides e ácido barbitúrico cedidos pelo Prof. Dr. Antonio Luis dos Santos Lima do Instituo Militar de Engenharia (IME) do Rio de Janeiro, fazendo parte da tese de doutorado de Stefânia Priscilla de Souza, em andamento.

## 3.14. Estabilidade e reprodutibilidade do ICER - BChE

A estabilidade da ICER- BChE foi determinada utilizando o tampão de trabalho, como fase móvel e uma injeção diária de 10  $\mu$ L de BTChI (50 mM) sob as condições otimizadas (vazão de 0,05 mL. min<sup>-1</sup>, detecção no UV a  $\lambda$  = 412 nm), após 15 dias as injeções passaram a ser semanais. As análises foram realizadas em duplicata.

A reprodutibilidade da imobilização utilizada foi avaliada medindo a atividade enzimática de três diferentes ICERs (10  $\mu$ L de BTChI 50 mM), recém-preparados, em duplicata.

## 3.15. Ensaios enzimáticos com a BChE em solução

Para a ensaio com a BChE em solução foi seguido o protocolo, com algumas adaptações, como reportado em (KHORANA *et al.*, 2001, RHEE; VAN RIJN; VERPOORTE, 2003) e será sucintamente descrito a seguir.

## 3.15.1 Ensaio em microplaca para determinação do K<sub>M</sub>

Uma solução estoque de 15 mM BTChI foi preparada em água deionizada. As soluções utilizadas para a obtenção da curva foram preparadas a partir da solução estoque nas seguintes concentrações: 30; 50; 70; 90; 110; 130; 150 µM.

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços utilizando um leitor de microplacas do tipo Elisa para obtenção das medidas de absorbância. Cada poço foi preenchido com: 125 μL do reagente de Ellman (3 mM, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4); 75 μL de tampão TRIS (50 mM) pH 8,0; 20 μl de solução enzimática BChE na

concentração final 0,28 U/mL (em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4); 25  $\mu$ L de BTChI nas concentrações indicadas acima. O volume final de 250  $\mu$ L.

A microplaca foi agitada por 10 segundos seguida de leitura da absorbância em 412 nm em intervalos de 30 segundos por dois minutos.

Os dados foram tratados através do método da regressão não-linear de melhor ajuste empregando o programa SigmaPlot 12.0.

## 3.15.2 Ensaios de inibição em microplaca

Para a inibição da enzima em solução foi utilizado o padrão eserina. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços utilizando um leitor de microplacas do tipo Elisa para obtenção das medidas de absorvância. Cada poço foi preenchido com: 125 μL do reagente de Ellman (3 mM, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4); 50 μL de tampão TRIS (50 mM) pH 8,0; 25 μL de solução enzimática BChE na concentração final 0,28 U/mL (em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4); 25 μL de BTChI (15 mM) e 25 μL de cada inibidor nas concentração de (1 mM). Volume final de 250 μL.

A microplaca foi agitada por 10 segundos seguida de leitura em 412 nm em intervalos de 30 segundos por dois minutos.

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a absorbância da atividade da enzima na presença do inibidor  $(A_i)$  com a absorbância da atividade da enzima na ausência de inibidor  $(A_0)$ , de acordo com a equação 3.1.

Os dados foram tratados através do método da regressão não-linear de melhor ajuste empregando o programa SigmaPlot 12.0.

# 3.15.3 Ensaio Falso-positivo de Ellman em Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Para este ensaio (RHEE; VAN RIJN; VERPOORTE, 2003) foi preparada placa cromatográfica de sílica gel 60 para cada classe de compostos avaliados no ICER-BChE com a realização de eluição em uma fase CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O 65:30:5 (v/v). Volumes de 2,5 µL de cada amostra foram aplicados nas placas.

As seguintes soluções foram preparadas e utilizadas no ensaio:

-

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Equação 3.1: % Inibição = 100-[ $A_i/A_0$ ) x 100].

- A) 80 mL água deionizada + 0,1825g tris  $\rightarrow$  Tampão A (T.A.), pH= 8,0 (ajustar com HCl 10% v/v);
  - B) 0,0099g reagente de Ellman + 25 mL de A (TA)
  - C) 0,00723g ACThI + 25 mL A ( TA);
  - D) 0,704 mg de AChE + 300 µL água MiliQ;
  - E) 0,025 g albumina sérica bovina (BSA) + 25 mL de TA;
  - F) 15 µL da solução D e misturar com 5 mL de solução E.

Após a eluição e secagem das placas, as soluções (C) e (F) foram incubadas por 15 minutos á 37°C. Após, borrifou-se a solução de (B) sobre as placas de sílica e em seguida a mistura que foi incubada contendo o produto da reação enzimática. O padrão utilizado foi a Galantamina e eserina aplicado no final da placa.

## 4. Resultados e discussão

## 4.1. Preparação e caracterização do ICER-BChE

## 4.1.1 Imobilização da BChE

O método de imobilização selecionado neste trabalho, ligação covalente, se deu com base no sucesso alcançado em trabalhos anteriores desenvolvidos com as enzimas GAPDH e AChE (CARDOSO *et al.*, 2006, CARDOSO *et al.*, 2008, SILVA *et al.*, 2012). Este método apresenta diversas vantagens como, impedir o fenômeno de dessorção, aumentar o tempo de vida útil e da estabilidade térmica da enzima.

A BChE foi imobilizada em capilares de sílica fundida com dimensões de 15 cm x 0,1 mm d.i.. Este suporte apresenta diversas vantagens como: grande área de superfície por volume, permitindo interações adequadas entre o substrato e a enzima; minimização de interações secundárias entre os compostos e o suporte; a velocidade da reação enzimática é maior porque a fase móvel elui através de uma coluna tubular aberta; e apresenta menor resistência à transferência de massa em relação a suportes microparticuladas. Além disso, é resistente à força mecânica e estável (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).

São três etapas que envolvem o processo de imobilização da BChE no capilar sendo elas: 1ª Pré-tratamento corrosivo do capilar de sílica fundida; 2ª Imobilização da BChE; 3ª Redução das Bases de Schiff.

## 1ª etapa: Pré-tratamento corrosivo do capilar de sílica fundida

Nesta etapa o capilar sofre um pré-tratamento corrosivo com HCl a fim de limpar e ativar o capilar, e também , um tratamento químico com o APTES. A corrosão das paredes internas do capilar aumenta a área superficial, removendo impurezas das paredes internas e assim diminuindo os efeitos de irreprodutibilidade. A ativação do capilar ocorre com a liberação dos grupos silanóis presentes na sílica.

Em seguida acontece o tratamento químico com APTES, a silanização, onde ocorre uma reação de substituição nucleofílica com os grupos silanóis livres presentes na parede do capilar e o APTES.

## 2ª etapa: Imobilização da BChE

Nesta etapa foi utilizado um agente espaçador, glutaraldeído, a fim de se evitar a imobilidade da biomolécula dentro do suporte. Este agente é bifuncional e muito reativo, então, após percolar o glutaraldeído na superfície interna do capilar, eluiu-se imediatamente solução de tampão fosfato para evitar a polimerização do mesmo.

O grupamento amino presente no APTES se liga em uma das extremidades do glutaraldeído através da formação de uma base de Schiff. Em seguida a solução enzimática é percolada no capilar sendo imobilizada em suas paredes através da reação com os grupos NH<sub>2</sub> dos resíduos de lisina e a outra extremidade reativa do glutaraldeído formando outra base de Schiff. (Esquema 4.1)

## 3ª etapa: Redução das Bases de Schiff

As bases de Schiff podem ser facilmente hidrolisadas, causando a liberação da enzima dentro do capilar e também garantindo menores grupos reativos dentro do capilar. Assim, com o intuito de melhorar o protocolo de imobilização, foi realizada a redução das bases de Schiff com borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) e comparado com o protocolo sem a redução. O esquema 4.1 ilustra todas as reações do processo de imobilização realizado.

As bases de Schiff são reativas em meio ácido, e no nosso caso, o pH utilizado é 8, então não seria necessário a redução, mas, experimentalmente foi comprovado que com a redução a imobilização da BChE foi mais eficiente quando comparado com a imobilização sem a etapa da redução das bases de Schiff.

Esquema 4.1: Método de imobilização da BChE em capilares de sílica fundida.

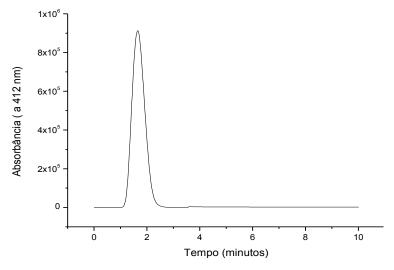
## 4.1.2. Determinação da atividade enzimática do ICER-BChE

Com o ICER-BChE preparado o próximo passo foi a verificação da atividade da enzima. Os ensaios de atividade foram feitos de acordo com o método modificado de Ellmann (ELLMAN *et al.*,1961), frequentemente utilizado na literatura. Este método baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina formada através da hidrólise do análogo do substrato da BChE, a butiriltiocolina. A tiocolina gerada não possui cromóforo, então foi necessário o uso do Reagente de Ellman, onde este reage com a tiocolina gerada formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo com intensa absorção em 412 nm, esquema 4.2.

O ICER-BChE recém-preparado foi utilizado como fase estacionária em um sistema de CLAE. O monitoramento foi *on line* envolvendo detecção UV, e o reagente de Ellman foi adicionado à fase móvel.

Esquema 4.2: Reações envolvidas no método empregado para monitorar a atividade da BChE.

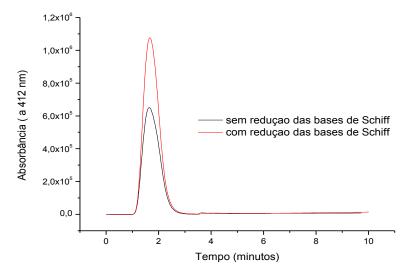
Após a injeção de 10 μL de BTChI (50 mM) observou-se uma banda cromatográfica que corresponde ao produto da reação gerado pelo ICER-BChE, tiocolina e consequente reação com o reagente de Ellman formando o ânion amarelo visualizado a 412 nm. Figura 4.1.



**Figura 4.1:** Cromatograma correspondente ao ânion amarelo formado pelo ICER-BChE. Fase móvel: tampão de trabalho e vazão de 0,05 mL. min<sup>-1</sup>.

A atividade da BChE foi mantida após a imobilização mostrando a eficiência do método de imobilização utilizado.

Comparando o procedimento de imobilização com e sem a 3ª etapa, a redução das bases de Schiff, figura 4.2, observa-se que com a redução há um aumento de 35% na atividade da enzima, fazendo com que esta etapa seja necessária no protocolo de imobilização com a BChE.



**Figura 4.2:** Cromatograma correspondente ao ânion amarelo formado pelo ICER-BChE com e sem redução das bases de Schiff. Fase móvel: tampão de trabalho e vazão de 0,05 mL. min<sup>-1</sup>.

O próximo passo foi a otimização das condições cromatográficas a serem utilizadas, como vazão e pH. O tamanho do capilar e a fase móvel utilizada com o ICER-BChE já foram otimizadas no trabalho com a AChE (SILVA *et al.*, 2012).

## 4.1.3 Influência do pH

## Influência do pH na atividade da BChE

A estrutura e a forma do sítio ativo de uma enzima são decorrentes da sua estrutura tridimensional e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças em sua conformação. Então, a atividade enzimática é dependente de características do ambiente como temperatura, força iônica e pH (SEGEL, 1979).

As enzimas apresentam grupos tituláveis em seus resíduos de aminoácidos, e, alguns destes resíduos fazem parte do sítio catalítico da enzima ou são importantes para a manutenção da estrutura espacial da biomolécula. Sendo assim, mudanças no

ambiente pode não afetar totalmente a estrutura da enzima, mas diminuem sua atividade por intervir nos resíduos do sítio catalítico.

Com relação ao efeito do pH, em geral, as enzimas apresentam uma curva de dependência do pH, um pH ótimo é onde ela está na sua conformação ideal para exercer seu papel catalítico.

No nosso caso além dos efeitos ambientais temos o efeito da imobilização, podendo ocorrer deslocamento no valor do pH ótimo da BChE. A figura 4.3 mostra o pH 8,0 como o mais adequado para a conversão do substrato em produto. Este resultado foi analisado pelos valores das áreas correspondentes as bandas cromatográficas e indicou o mesmo pH utilizado em solução para esta enzima (BRENDA, 2012) mostrando que não houve alteração após a imobilização.

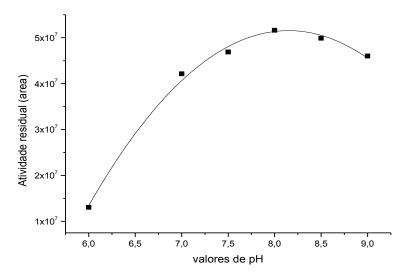


Figura 4.3: Avaliação do pH ótimo para o ICER-BChE.

## Influência do pH na estabilidade da atividade do ICER-BChE

Como o ICER-BChE será utilizado em fluxo com muito tempo de exposição ao tampão de trabalho, foi realizado o estudo para avaliar o efeito dessa exposição. È importante saber em qual valor de pH a enzima permanece mais estável e ativa por um longo período de tempo.

Os três melhores resultados de pH obtidos no estudo anterior foram selecionados. A figura 4.4, ilustra o pH 8,0 como sendo também o mais adequado.

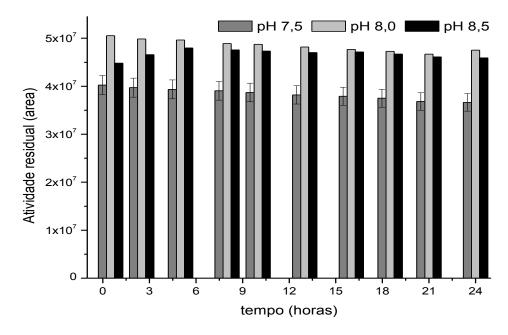


Figura 4.4: Estabilidade do ICER-BChE em diferentes valores de pH.

## 4.1.4 Influência da vazão

A reação catalisada pela enzima depende do contato com o substrato e com os compostos a serem avaliados. Considerando que o método desenvolvido é realizada on flow a vazão é um parâmetro muito importante a se avaliar. Os resultados mostraram melhor atividade em menores vazões, evidenciando que quanto maior o tempo de contato entre substrato e enzima mais produto é formado. Embora com vazões de 0,02 e 0,01 mL.min<sup>-1</sup> maior concentração de produto foi obtido o tempo de análise torna-se também maior. Observamos que utilizando uma vazão média de 0,05 mL. min<sup>-1</sup> temos a formação de produto em excelente quantidade e um tempo de análise que consideramos mais adequando para ensaios de triagem rápida. (Fig. 4.5).

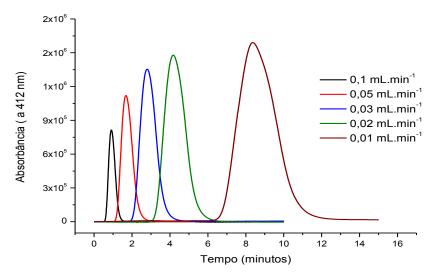


Figura 4.5: Influência da vazão na atividade enzimática.

## 4.2. Validação do método

A curva de calibração foi construída admitindo-se que 100% do produto da reação enzimática (Tiocolina) reagiu com o reagente de Ellman, presente na fase móvel, formando o ânion amarelo. A produção de tiocolina pelo ICER-BChE foi quantificada pela área da banda cromatográfica, e a correlação entre as áreas da banda do ânion amarelo e as concentrações de BTChI injetadas, na faixa de concentração citada, gerou resultados proporcionais apresentando linearidade, conforme mostrado na figura 1.

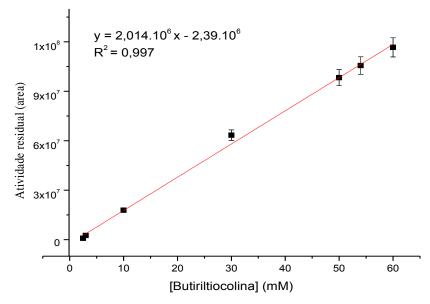


Figura 4.6: Curva de calibração.

Com os três controles de qualidade selecionados 3, 30, e 54 mM (de BTChI) foram avaliados a precisão intra – dia e a exatidão do método. Resultados obtidos estão apresentados na tabela 4.1.

A precisão intra - dia foi expressa como o coeficiente de variação (CV%) e foram aceitos valores de CV menores ou iguais a 20%. A exatidão foi determinada pelo cálculo de volta e expressa, em porcentagem, como a razão entre o valor médio encontrado pelo método e o valor de referência das concentrações adicionadas. Para a exatidão, foram aceitos desvios menores ou iguais a 15% do valor nominal da concentração (RIBANI *et al.*, 2004).

**Tabela 4.1.** Precisão intra - dia (n = 5) e Exatidão do método de análise para quantificação de tiocolina formada pelo ICER-BChE.

Concentração	16	' dia	2	° dia	ŝ	3° dia	Média do	os três dias
Butiriltiocolina	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão
(mmol/L)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
3	8,02	85,0	15,0	86,0	6,0	84,0	9,68	85,0
30	6,32	91,8	6,93	85,2	6,27	88,0	6,50	88,3
54	5,00	98,0	3,20	94,0	3,11	95,0	3,77	95,7

O LQ, a menor concentração onde a precisão e a exatidão de três amostras não excediam o valor de 20%, encontrado para o método foi de 2,5 mM de BTChI (CV = 6,0%, n=3 e precisão obtida foi de 98%). E o LD para o método foi calculado pela relação sinal/ruído, e este deve corresponder um razão igual a 3. O valor encontrado foi de 1 mM (RIBANI *et al.*, 2004, CASSIANI *et al.*, 2009).

A seletividade do método foi garantida pelas análises do branco após cada sequência de análise. Nenhum interferente visível no comprimento de onda utilizado foi observado.

Pelos valores obtidos dos parâmetros avaliados para métodos bioanalíticos, vimos que o método atende as exigências preconizadas pelas normas e, portanto foi utilizado na sequência dos estudos.

# 4.3 Estudo do parâmetro cinético K<sub>M</sub>

## 4.3.1. Medida da Velocidade inicial da reação (V<sub>0</sub>) no ICER - BChE

Para medidas de cálculos cinéticos as condições utilizadas nas análises devem estar na  $V_0$ . Assim, a velocidade da reação enzimática será considerada inicial se durante o tempo de medida da atividade enzimática a variação da concentração de substrato for igual ou inferior a 5% da concentração inicial de substrato utilizada. Caso contrário, há substrato sem acesso à enzima, e então deixa-se de medir a velocidade real da enzima (NELSON; COX, 2004).

Os resultados deste estudo mostraram que a velocidade de conversão de substrato para o ICER-BChE foi de aproximadamente 1% para todas as concentrações de BTChI avaliadas, confirmando que as análises são realizadas na  $V_0$  permitindo a obtenção do parâmetro cinético  $K_M$  no nosso método.

#### 4.3.1. ICER-BChE e BChE em solução

K<sub>M</sub> corresponde à concentração do substrato onde a velocidade da reação é igual à metade da velocidade máxima de catálise (BRACHT *et al.*, 2003). A determinação deste parâmetro cinético permite avaliar a afinidade da ligação entre a enzima e o substrato.

Nesse trabalho, é muito importante avaliar este parâmetro devido aos efeitos que o processo de imobilização pode causar na estrutura da enzima, então, com o intuito de se determinar a eficiência catalítica do ICER-BChE e a afinidade de ligação entre a enzima e o substrato, os estudos foram realizados com o ICER e comparados com os resultados obtidos com a enzima BChE em solução.

Neste experimento, foram empregadas concentrações crescentes de BTChI (5 – 100 mM), onde o aumento da concentração do substrato não produzisse mais alterações na velocidade da reação. Os valores de  $K_M$  encontrados foram: 33,60  $\pm$  6,9 mM para o ICER-BChE e 0,12  $\pm$  0,02 mM para a BChE livre em solução. Vide figuras 4.7 e 4.8.

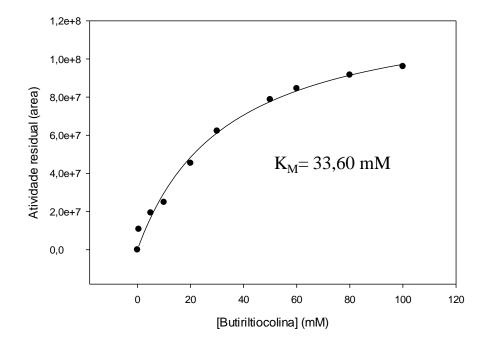


Figura 4.7: Hipérbole de Michaelis-Menten para o ICER-BChE.

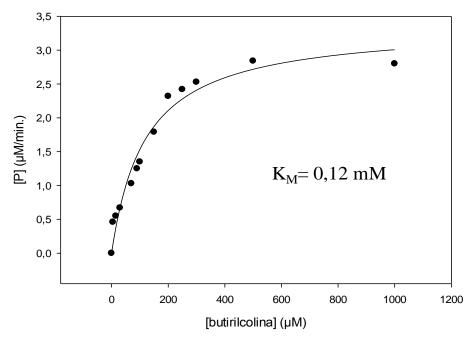


Figura 4.8: Hipérbole de Michaelis-Menten para BChE em solução.

Pelas curvas obtidas observa-se que em baixas concentrações de substrato a velocidade da reação<sup>6</sup> é diretamente proporcional a concentração de substrato, e, progressivos aumentos na concentração de substrato produzem incrementos cada vez

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Para o ICER-BChE a velocidade da reação é dada pela área da banda cromatográfica.

menores na velocidade da reação. Assim os perfis das duas hipérboles estão de acordo com a equação de Michaelis-Menten (Equação 1.1).

Também, os resultados obtidos evidenciam que o processo de imobilização afetou a afinidade da enzima pelo substrato. O valor de K<sub>M</sub> para o ICER-BChE é bem maior do que o valor da constante determinada para a enzima livre em solução. Este aumento era esperado e pode ser explicado por diversos fatores, como: modificação conformacional da molécula da enzima devido à alteração na estrutura terciária do sítio ativo; efeitos estereoquímicos que podem causar inacessibilidade ao sítio ativo da enzima; efeitos difusionais ou de transferência de massa, que têm origem na resistência de difusão do substrato até o sítio catalítico da enzima, e do produto da reação; e efeitos microambientais (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009). Todos estes fatores mencionados podem ser correlacionados as ligações covalentes envolvidas no processo de imobilização adotado.

Cabe destacar ainda que, em solução usam-se condições estáticas e alíquotas frescas de enzima (0,28U), e no método proposto as condições utilizadas estão em um sistema em fluxo.

No entanto, observa-se que a seletividade e atividade enzimática foram mantidas no ICER-BChE permitindo a utilização do método proposto para triagem de inibidores.

## 4.4. Modificador orgânico

## 4.4.1. Modificador orgânico na atividade do ICER-BChE

O método foi desenvolvido para triagem de compostos de origem natural ou sintéticos que tenham potencial para uso como fármacos. As classes de compostos a serem triadas variam em características estruturais e propriedades fisíco-químicas como por exemplo a solubilidade. Normalmente, poucos desses compostos apresentam alta solubilidade em água sendo necessário o uso de solventes orgânicos. Este é um aspecto muito importante a ser considerado, pois a presença de solventes orgânicos pode causar vários efeitos na atividade da enzima tais como: bloqueio do sítio ativo, energia desfavorável de dessolvatação para o substrato, redução da mobilidade conformacional, situação de pH subótimo, e desnaturação da enzima (KLIBANOV, 1997).

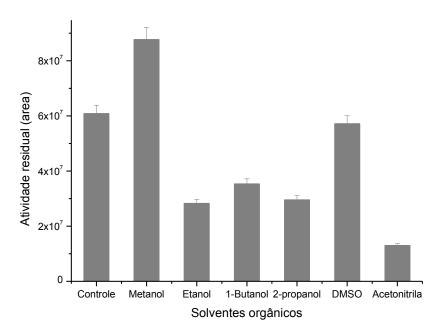
Desse modo, foram realizados estudos sobre a influência de alguns solventes orgânicos comumente utilizados na preparação de amostras, como; ACN, DMSO, MeOH, EtOH, 1-butanol e 2- propanol.

Os resultados foram analisados comparando a atividade do ICER-BChE na presença e na ausência de solventes orgânicos.

Dos solventes orgânicos testados o isopropanol e o etanol provocaram uma queda de 50% da atividade enzimática comparado ao controle. A ACN apresentou o pior resultado, pois provocou uma queda maior que 50% comparado ao controle. Observase, no entanto, que em presença de DMSO a atividade catalítica não foi afetada e na presença de metanol a atividade catalítica foi maior que o controle. Vide figura 4.9.

Assim, de acordo com os resultados obtidos, DMSO e MeOH são os melhores solventes a serem empregados no preparo de amostras para análises utilizando o ICER-BChE.

Cabe destacar que a atividade do ICER-BChE foi completamente recuperada após o ensaio com os solventes orgânicos na presença apenas do tampão de trabalho.

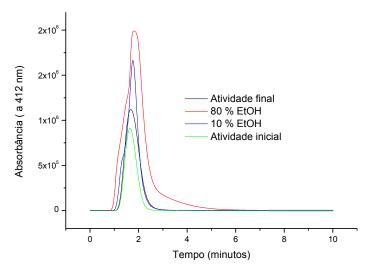


**Figura 4.9:** Influência do uso de solventes orgânicos (em 50%) sobre a atividade enzimática

## 4.4.2. Modificador orgânico na fase móvel

O efeito da adição de uma porcentagem de modificador orgânico na fase móvel foi investigado com o intuito de limitar interações não específicas entre os inibidores testados e o suporte cromatográfico. A introdução de um solvente orgânico pode ser requerida para suprimir algumas interações não específicas que podem ocorrer com compostos mais hidrofóbicos (KLIBANOV, 1997).

Sendo assim, a adição de 10 a 80% de EtOH na fase móvel culminou em um aumento de 1,5 a 5 vezes na atividade enzimática, respectivamente, em comparação com a atividade observada sem o solvente orgânico. Após uma semana em condições extremas (80% de EtOH), a ICER - BChE ainda manteve a sua atividade. Figura 4.10.



**Figura 4.10:** Cromatograma ilustrando a atividade enzimática do ICER-BChE na presença de EtOH na fase móvel.

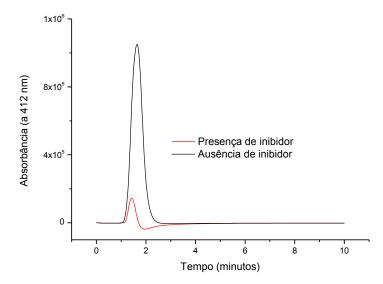
Estes resultados asseguram a possibilidade de se utilizar uma maior quantidade de solvente orgânico na fase móvel, sem danificar a enzima.

## 4.5. Estudos de inibição

Para validar o método com o ICER-BChE foram utilizados os inibidores padrões de colinesterases, eserina e galantamina ambos reversíveis e competitivos, sendo a eserina específico para a BChE, (GIACOBINI, 2003). Os resultados obtidos para o ICER-BChE foram comparados com o ensaio de inibição da BChE em solução encontrados na literatura.

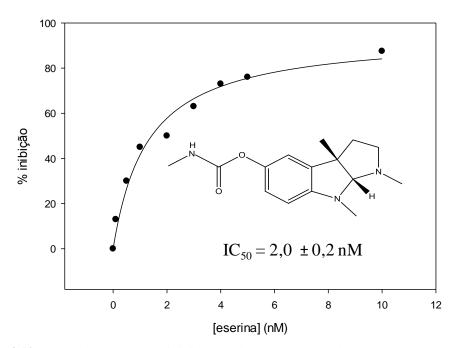
## 4.5.1. Validação com inibidores padrões

Os resultados dos estudos de IC<sub>50</sub> mostram uma redução da área da banda (ânion amarelo) em concentrações crescentes de eserina e galantamina evidenciando um decréscimo na hidrólise do substrato. O cromatograma abaixo, figura 4.11, ilustra a diminuição da banda de absorção na presença do inibidor eserina a 10 nM.



**Figura 4.11:** Cromatograma ilustrando o decrescimento da atividade enzimática do ICER-BChE na presença de inibidor.

A curva de inibição foi obtida e por extrapolação da mesma, o valor de  $IC_{50}$  foi calculado para cada inibidor. Figuras 4.12 e 4.13.



**Figura 4.12**: Curva de IC<sub>50</sub> para o inibidor eserine no ICER-BChE.

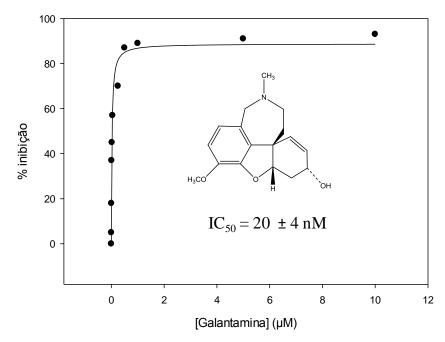


Figura 4.13: Curva de IC<sub>50</sub> para o inibidor galantamina no ICER-BChE

O ICER-BChE reconheceu valores de IC $_{50}$  em escala nano-molar para eserina (2,0  $\pm$  0,2 nM) e galantamina (20  $\pm$  4 nM), o que é consistente com valores da literatura (WEINSTOCK, 1999, PEI NHG *et al.*, 1995). Para além, foi capaz de identificar a especificidade de inibidor mostrando um valor de 10 vezes maior para a galantamina, que não é específico para a BChE, corroborando o método apresentado.

Comparando os valores de IC<sub>50</sub> obtidos com dados da literatura para a enzima em solução e outros modelos de enzima imobilizada (IMERs), tabela 4.2, observou-se que os valores para eserina estão na mesma ordem de magnitude que os alcançados para a enzima em solução e IMER, ou seja, a tendência é mantida.

Para galantamina os dados mostram que o ICER-BChE foi mais sensível e seletivo que a BChE em solução e em relação aos dados da literatura. Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos em solução e IMER para galantamina foram altos, esta diferença pode estar relacionada ao efeito dos pontos de imobilização e do método de análise utilizado.

Tabela 4.	2: Valores	de $IC_{50}$ d	de inibidores	padrões no	o ICER-	BChE e BChE e	m
solução.							

Inihidan	$IC_{50}$ $(nM) \pm EPM$	$IC_{50}$ (nM) $\pm$ EPM	$IC_{50}$ (nM) ± EPM		
Inibidor	ICER-BChE	IMER-BChE	BChE em solução		
eserina	$2,0\pm0.2$	$87,3 \pm 5^{a}$	$16.0 \pm 2.9^{c}$		
galantamina	$20 \pm 4$	0.65 x 10 <sup>6 b</sup>	$26,3 \times 10^3 \pm 1,9 \times 10^{3d}$		

\*EPM: Erro padrão da média. (<sup>a</sup> PEI NHG *et al.*, 1995, <sup>b</sup> BARTOLINI *et al.*, 2009, <sup>c</sup> SERMBOONPAISARN; SAWASDEE, 2012, <sup>d</sup> LUCKARIFT *et al.*, 2004).

A imobilização pode afetar a sensibilidade da enzima frente ao inibidor, mas no nosso caso, os resultados mostram que o ICER - BChE foi capaz de identificar os inibidores e apresentou -se eficaz na determinação do parâmetro quantitativo, IC $_{50}$ .

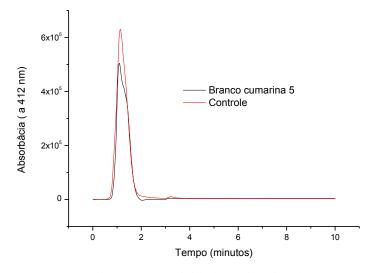
Assim sendo, o método desenvolvido proposto está validado e é capaz de reconhecer inibidores padrões da BChE estando pronto para ser aplicado na triagem e caracterização de novos ligantes.

## 4.5.2. Triagem dos compostos – teste pontual

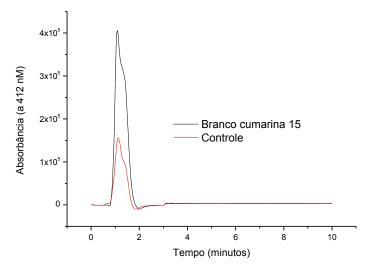
As coleções obtidas com professores colaboradores de outras instituições foram avaliadas em uma concentração fixa de 200 μM, considerada uma concentração limite, acima dessa concentração o inibidor seria considerado muito fraco. A triagem foi realizada conforme descrito no item 3.13.2. A concentração do substrato BTChI utilizada nos ensaios de inibição foi de 1,5 vezes o valor de K<sub>M</sub> para o ICER-BChE (33,60 mM) garantindo uma concentração de saturação para a enzima. A concentração padronizada utilizada foi de 50,4 mM de BTChI.

Um fator limitante do ensaio é que não é possível analisar compostos que absorvam no mesmo comprimento de onda do ensaio (412 nm) e que possuam intensidade de absorção maior ou próxima a do produto formado. Para avaliar isto, foi

realizado o branco de cada composto testado no ICER-BChE, como ilustrado nas figuras 4.14 e 4.15. Os que apresentaram este problema não foram selecionados para o ensaio



**Figura 4.14:** Cromatograma ilustrando a atividade enzimática do ICER-BChE e o branco da cumarina 5.



**Figura 4.15:** Cromatograma ilustrando a atividade enzimática do ICER-BChE e o branco da cumarina 15.

Outro problema do ensaio é que compostos com grupos aldeídos e aminas podem provocar resultados falso-positivo no ensaio de Ellman (RHEE; VAN RIJN; VERPOORTE, 2003). Estes compostos impedem a reação entre a tiocolina e o reagente de Ellman, o que impediria a formação do ânion amarelo, e nesse caso, o que acontece é uma reação química entre o produto da reação e o corante. Assim, a fim de resolver este problema e distinguir entre os compostos que atuem realmente na inibição da atividade

enzimática e aqueles que atuam na reação química, as amostras foram submetidas ao teste de falso positivo, como reportado em 3.15.3. Este teste é qualitativo e sua análise se dá pela comparação com um inibidor padrão aplicado na mesma placa cromatográfica.

Seguem abaixo os resultados obtidos

#### Biblioteca de Cumarinas

Derivados de cumarinas têm sido descritos como sendo inibidores duais AChE/BACE1 com afinidade sub-micromolar para ambas as enzimas (ALVIM *et al.*, 2005). Foram investigados esses derivados usando a ICER - BChE para avaliar a sua atividade contra outras colinesterases e os resultados obtidos foram comparados com os alcançados em solução (VILELA *et al.*, 2013)<sup>7</sup>. Tabela 4.3.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Resultados submetidos, Vilela, A. F. L. *et al.* Screening of selective inhibitors by immobilized capillary reactors based on butyrylcholinesterase: Development and application, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2013.

**Tabela 4.3:** Resultados do teste pontual obtidos para derivados cumarínicos utilizando o ICER- BChE e BChE em solução.

Cumarinas	Fórmula estrutural	Falso- Positivo	% inibição ICER-BChE a 200 µM	% inibição BChE em solução
Eserine <sup>a</sup>	H O N H	-	77,0	78,9
1	но	-	2,00	*
2	Н <sub>3</sub> СО О О	-	9,40	14,6
3	ОН	-	22,0	22,2
4	ОН	-	3,00	*
5	HONON	-	*	*
6	H <sub>3</sub> CO N	-	8,00	10,7
7		-	6,1	34,9
				Continua

8	HOOOO	-	*	21,6
9	Br OCH <sub>3</sub>	-	4,30	13,0
10	Br	-	2,60	12,0
11	CI	-	3,20	14,7
12	H <sub>3</sub> CO OOO	-	2,40	12,7
13	HO	+	*	*
14	HO OCH <sub>3</sub>	+	*	*

15	HO OOO	-	*	*
16	HOOH	+	*	*
17	HO	+	56,1	60,9
18	OH N	-	0,20	24,9
19	HO	-	70,3	63,0
20		-	1,60	*

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Inibidor padrão eserina; \* compostos que não apresentaram resposta com a metodologia utilizada; (+) falso inibidor, (-) inibidor.

Duas cumarinas numeradas 17 e 19 exibiram uma atividade inibitória significativa no ICER - BChE e foram selecionadas para determinação dos valores de IC $_{50}$ .

Comparando os resultados pelas duas metodologias aplicadas, valendo lembrar-se das diferenças de cada uma, observa-se a mesma tendência nos valores obtidos, comprovando mais uma vez a eficácia do método com o ICER-BChE. E, além disso, o ICER apresentou vantagens como; rapidez, reprodutibilidade, reutilização da enzima e pequeno manuseio de amostra.

### Biblioteca de Complexos

Os resultados para esta coleção estão divididos em; uma tabela (4.4) e uma figura (4.16) conforme a classe de compostos. Na 1ª classe de compostos temos os derivados de flavonóides e flavonóides complexados com cobre (Cu). Desta avaliação de atividade inibitória, dez compostos, todos complexados com o metal, mostraram valores de inibição significativos sendo cinco com valores superiores a 70% a 200 µM (HPTBCu, HesFCu, NarBCu, NNINABCu e NarFCu), e foram, portanto, selecionados para estudos de IC<sub>50</sub>.

Também foi avaliado a atividade do próprio metal Cu, seu sal CuCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O, que exibiu uma alta atividade inibitória a 200 μM. Esse resultado sugere que o metal seja o maior responsável pela atividade observada para os derivados complexados sem apresentar os problemas de toxicidade encontrados para o metal livre (SARRIA, 2012). Tabela 4.4.

A outra coleção de compostos contém diversos tipos de complexos, como; derivados de flavonóides e vitamina K complexados com Zinco (Zn) e Cobalto (Co). Para esta coleção apenas o composto 13, derivado de flavonóide complexado com Co apresentou alta atividade inibitória no ICER – BChE (78%), mas também apresentou resultado falso-positivo, não sendo selecionado para prosseguimento dos estudos.

**Tabela 4.4:** Resultados do teste pontual obtidos para os complexos utilizando o ICER- BChE.

Compostos	Estrutura	Falso-positivo	% inibição ICER- BChE a 200 μM
Eserine <sup>a</sup>	H O N H	-	77,0
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	CI 	-	98,4
M3Cu	F NH O-CH-O	-	0
M4	OH HN	-	0
M4Cu	NH N	-	0 Continua

M5	OH HN	-	0
M5Cu	O-CU O HN	-	0
M6	OH HN P	-	0
M6Cu	F O O O O O O O O O O O O O O O O O O O	-	0
M7	OH H	-	0
M7Cu	NH O-CI-O	-	0
			Continua

M8	OH HN O	-	0
M8Cu	NH O CHO O H	-	0
M9	OH OH	-	0
M10	OCF <sub>3</sub>	-	0
M11	OH H N O	-	0
M11Cu	NH N	-	0
M12	OH H H Q		0 Continua

НРТ	HO OCH3	-	0
HPT2Cu	HO OH	-	14,06
НРТВСи	HO OCH3 OH	-	97,25
HPTFCu	OCH <sub>5</sub> OH	-	58,84
Hesp	HO <sub>Min</sub> OH OH OH OH	-	1,46
Hesp2Cu		-	51,80

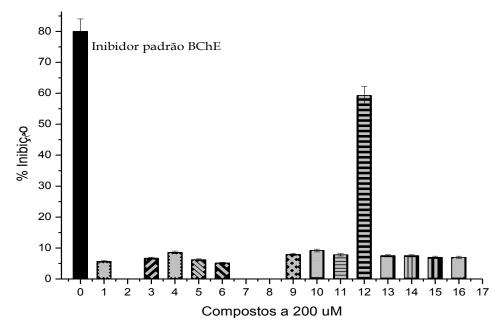
## Coleção de Glicosídeos

A classe glicosídica não apresentou nenhum composto com atividade inibitória para a BChE.

## Coleção de híbridos de fenilpropanóides e ácido barbitúrico.

Para esta série de compostos avaliados, também foi feita a representação em barras, figura 4.17. Apenas o composto **12** apresentou atividade inibitória mais elevada, de 59%.

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Inibidor padrão eserina, (+) falso inibidor, (-) inibidor.



**Figura 4.16**: Porcentagem de inibição dos compostos híbridos com o ICER-BChE a 200  $\mu M$ .

### 4.5.3. Determinação da Potência Inibitória (IC<sub>50</sub>) dos compostos sintéticos

Os compostos sintéticos selecionados para determinação do IC<sub>50</sub> as cumarinas 17 e 19 e cinco derivados de flavonóides complexados com Cu nomeados HPTBCu, HesFCu, NarBCu, NNINABCu e NarFCu.

Os resultados das curvas dose-resposta são ilustrados nas figuras 4.17 a 4.23.

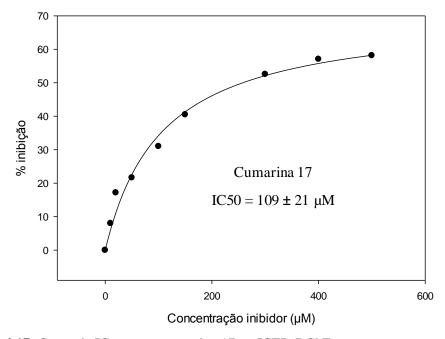


Figura 4.17: Curva de IC<sub>50</sub> para o cumarina 17 no ICER-BChE

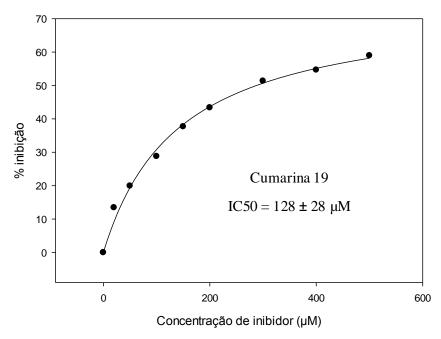
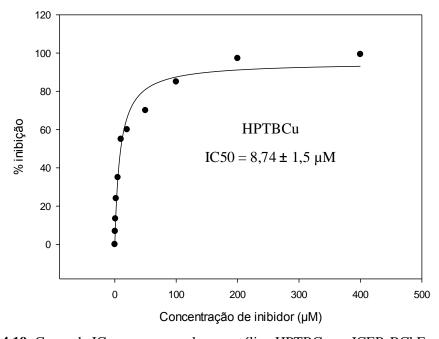


Figura 4.18: Curva de IC<sub>50</sub> para o cumarina 19 no ICER-BChE



**Figura 4.19**: Curva de  $IC_{50}$  para o complexo metálico HPTBCu no ICER-BChE

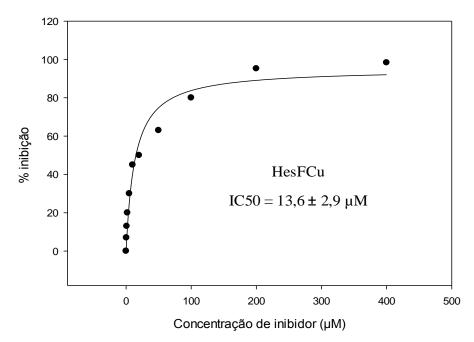
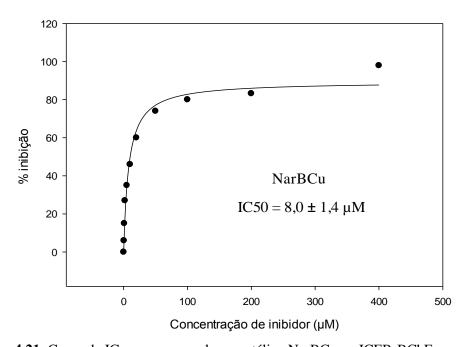


Figura 4.20: Curva de IC<sub>50</sub> para o complexo metálico HesFCu no ICER-BChE



**Figura 4.21**: Curva de  $IC_{50}$  para o complexo metálico NarBCu no ICER-BChE

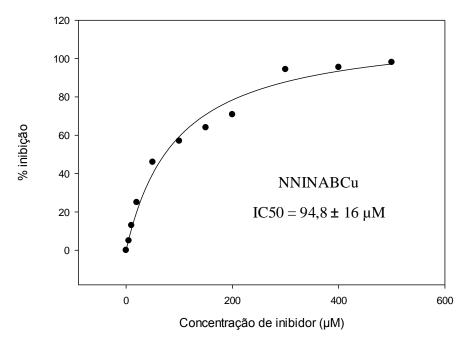


Figura 4.22: Curva de IC<sub>50</sub> para o complexo metálico NNINABCu no ICER-BChE

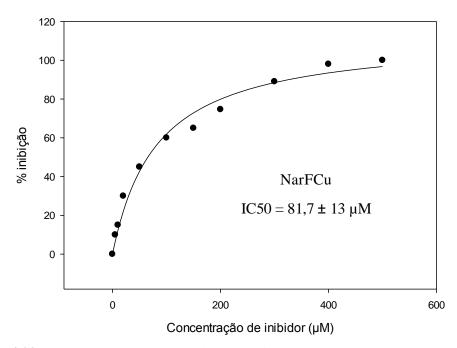


Figura 4.23: Curva de IC<sub>50</sub> para o complexo metálico NarFCu no ICER-BChE

Para as cumarinas obteve-se valores de IC<sub>50</sub> altos, **17** (109  $\pm$  21  $\mu$ M) e **19** (128  $\pm$  28  $\mu$ M), mas comparáveis e até melhores do que valores descritos para cumarinas naturais que variam de 155 a 274  $\mu$ M (ORHAN, 2012). Assim, estes compostos foram selecionados para o estudo do mecanismo de ação aplicando o ICER-BCE.

Para os derivados de flavonóides complexados com Cu, os valores de IC<sub>50</sub> foram mais interessantes e três apresentaram resultados promissores, **HPTBCu** (8,74  $\pm$  1,5  $\mu$ M), **NarBCu** (8,0  $\pm$  1,4  $\mu$ M) e **HesFCu** (13,6  $\pm$  3  $\mu$ M).

Podemos concluir que os valores de IC<sub>50</sub> indicam que o ICER-BChE é capaz de reconhecer inibidores com diferentes potências inibitórias, sendo o próximo passo a caracterização destes ligantes.

#### 4.5.4. Determinação do mecanismo de inibição e da constante (K<sub>i</sub>)

A busca por inibidores reversíveis é importante e se torna cada vez mais intensa, pois estes se ligam reversivelmente em sítios específicos na enzima podendo a atividade da enzima ser restaurada posteriormente por meios físicos.

A determinação da constante  $K_i$  evidencia a afinidade do inibidor pela enzima na formação do complexo EI, ou seja, o valor desta constante avalia a força do inibidor. Quanto menor o valor de  $K_i$  mais forte é o inibidor, sendo, portanto um importante parâmetro a ser determinado (SEGEL, 1979).

O ensaio foi realizado como reportado em 3.13.5, e para a determinação do tipo de mecanismo de inibição e K<sub>i</sub> foram construídos gráficos de duplo-recíproco.

Primeiramente foi realizado o estudo de caracterização com o inibidor padrão específico da BChE e depois com os outros compostos selecionados.

A figura 4.24 mostra o resultado obtido com o inibidor padrão eserina. A curva de menor inclinação (controle) representa a ausência de inibidor, as outras três curvas representam concentrações crescentes de eserina. Neste caso, à medida que a concentração de inibidor [I] cresce, as retas aumentam de inclinação no sentido contrário ao ponto de interseção com a reta controle. Assim, a interseção com o eixo 1/V, que mede a velocidade máxima, não é alterado, e a inclinação ( $K_M/V_{Máx}$ ) é alterada aumentando o valor de  $K_M$  aparente ( $K_{Map}$ ).

Este comportamento confirma o mecanismo do tipo competitivo para este inibidor, em concordância com o reportado na literatura (STOJAN; ZORKO, 1997).

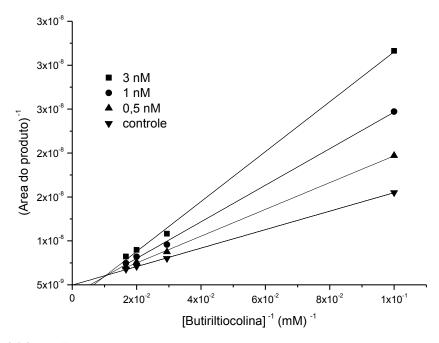


Figura 4.24: Gráfico de duplo recíproco para eserina no ICER-BChE.

Para o cálculo do valor de K<sub>i</sub> (SEGEL, 1979) um segundo gráfico foi traçado com os valores das inclinações das retas do gráfico recíproco versus as concentrações de eserina correspondentes. Figura 4.25.

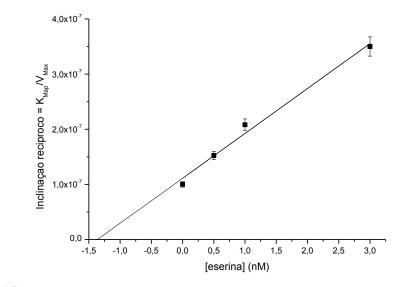


Figura 4.25.: Determinação de K<sub>i</sub> para inibidor eserina.

A partir da intersecção com o eixo x pode-se obter o valor de  $K_i = 2.2 \pm 0.2$  nM. Pelo resultado, observa-se que o ICER- BChE reconheceu mais uma vez valores em escala nano molar para um inibidor padrão, mostrando-se efetivo para estudos de caracterização de ligantes.

### Cumarinas e flavonóides complexados com Cu

Para estes compostos o ensaio foi realizado e representado graficamente da mesma maneira que para o padrão eserina.

As figuras, 4.26 e 4.27, ilustram os resultados alcançados para as duas cumarinas.

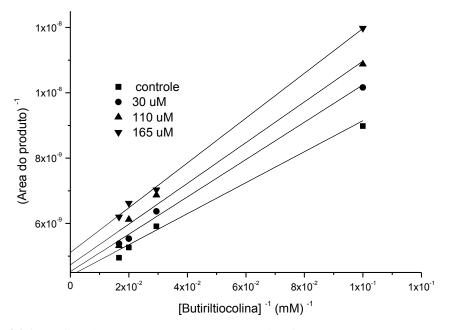


Figura 4.26: Gráfico de duplo recíproco para cumarina 17 no ICER-BChE.

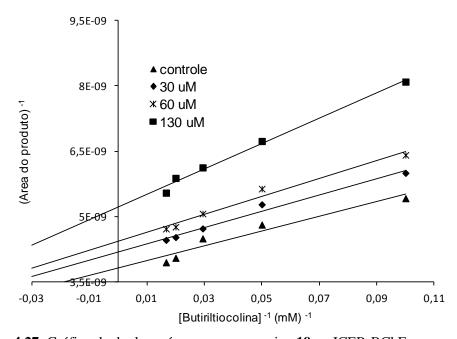
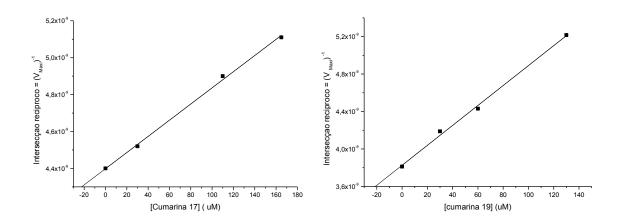


Figura 4.27: Gráfico de duplo recíproco para cumarina 19 no ICER-BChE

No caso das cumarinas avaliadas a menor inclinação representa o controle e as outras concentrações crescentes de inibidor. A medida que [I] cresce, a inclinação da reta ( $K_M/V_{M\acute{a}x}$ ) não é alterada e a intersecção no eixo 1/V cresce, consequentemente o valor de  $V_{M\acute{a}x}$  e  $K_{Map}$  é diminuída. Os comportamentos destes dois gráficos confirmam o mecanismo do tipo acompetitivo (incompetitivo).

Para o cálculo do valor de K<sub>i</sub> (SEGEL, 1979), nestes dois casos, também foi realizado um segundo gráfico, só que desta vez, com os valores das intersecções das retas do gráfico recíproco versus as concentrações de cumarina correspondentes. Figura 4.28.



**Figura 4.28.:** Determinação de K<sub>i</sub> para cumarina 17 e 19.

A partir da intersecção com o eixo x, os valores de  $K_i$  encontrados foram  $108 \pm 10$   $\mu M$  para cumarina 17 e  $36.0 \pm 5.0$   $\mu M$  para 19.

Para os complexos metálicos, as figuras 4.29 e 4.30 ilustram os resultados.

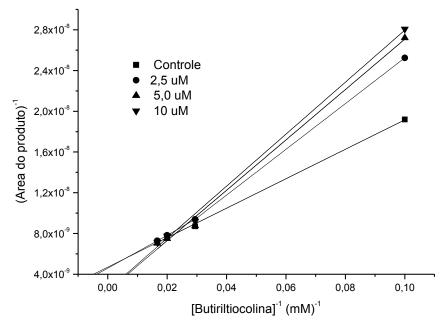


Figura 4.29: Gráfico de duplo recíproco HPTBCu no ICER-BChE.

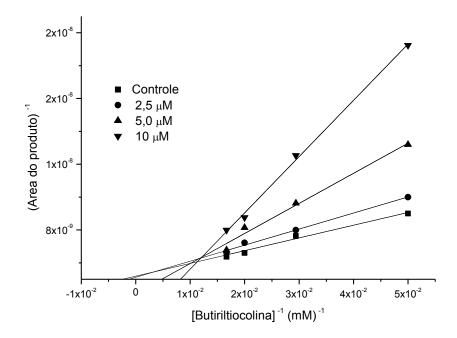
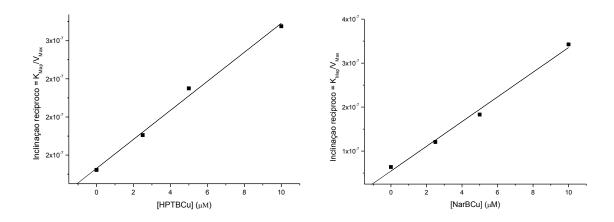


Figura 4.30: Gráfico de duplo recíproco NarBCu no ICER-BChE.

Nestes dois casos, tem-se comportamentos característicos de inibição competitiva, semelhante ao padrão, com as linhas interceptando o eixo Y no mesmo ponto e inclinações diferentes alterando o valor de  $K_{\text{Map}}$ . Para o cálculo de  $K_{\text{i}}$  seguiu-se o mesmo procedimento que o padrão eserina para inibição competitiva (SEGEL, 1979). Figura 4.31 abaixo.



**Figura 4.31.:** Determinação de K<sub>i</sub> para HPTBCu e NarBCu.

Os valores de  $K_i$  obtidos foram de 9,6  $\pm$  0,5  $\mu M$  para HPTBCu e 2,0  $\pm$  0,1  $\mu M$  para NarBCu, evidenciando que o composto NarBCu possui maior afinidade pela enzima que o HPTBCu.

Com estes resultados, pode-se afirmar que o ICER-BChE é uma excelente alternativa para o fim a que foi proposto fornecendo resultados rápidos e seletividade.

## 4.6. Estabilidade e reprodutibilidade do ICER – BChE

A reprodutibilidade do preparo do capilar atestou a robustez do método de imobilização utilizado, onde o desvio-padrão relativo da atividade do ICER - BChE encontrado foi de CV = 6,55% para n = 3.

O estudo da estabilidade também comprovou a eficácia do método desenvolvido, pois, o ICER-BChE permaneceu com a enzima ativa por mais de dezessete meses conservando 83% da sua atividade inicial, tornando possível a sua utilização para um grande número de experimentos. Figura 4.32.

Cabe relatar que este resultado de manutenção da atividade enzimática foi observado para o ICER-BChE utilizado em todas as análises realizadas e descritas neste trabalho.

A estocagem, quando não estava em uso, foi a 4°C e imersos no tampão de trabalho.

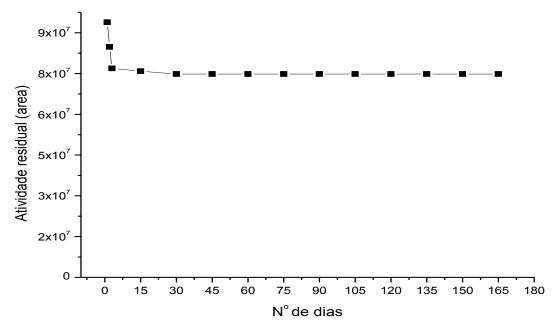


Figura 4.32: Estabilidade do ICER-BChE.

#### 5. Conclusões

Diante de todos os estudos realizados, podem-se fazer algumas considerações finais sobre este trabalho.

A escolha do método de imobilização, baseada em outros trabalhos do grupo, provou ser eficiente para a BChE refletindo na retenção da atividade catalítica da enzima com elevada estabilidade e atividade durante um período superior a 17 meses. Cabe destacar que este método é inédito para esta enzima.

Os experimentos foram realizados sob condições de velocidades iniciais, de acordo com o previsto em ensaios com enzimas, com isto a determinação do parâmetro cinético  $K_M$  com a enzima imobilizada pôde ser realizado, os resultados evidenciaram o efeito da imobilização sobre a estrutura enzimática quando comparada com a enzima em solução, conforme previsto, mas a sua utilização nas triagens foi efetuada devido à alta retenção de atividade e seletividade apresentado pelo método desenvolvido.

As figuras de mérito avaliadas de acordo com os órgãos de regulamentação para métodos bioanalíticos foram alcançadas com sucesso evidenciando um método robusto, reprodutível, linear, preciso e exato.

A validação do método com inibidores padrões confirmou que o ICER-BChE foi capaz de identificar inibidores padrões da BChE com alta sensibilidade reconhecendo valores de IC<sub>50</sub> em escala nano-molar. Consequentemente, o método foi aplicado e os resultados obtidos foram promissores, mostrando que o ICER-BChE distinguiu inibidores de diferentes classes, com diferentes mecanismos de ação, corroborando ser uma ótima ferramenta para se utilizar em triagem de inibidores seletivos.

O método desenvolvido neste trabalho oferece muitas vantagens como: redução de custos, interações não específicas da matriz; recuperação imediata da atividade enzimática; tempo de análise pequeno; e pode ser utilizado na presença de solventes orgânicos como EtOH na fase móvel, o que é relevante para a análise de amostras com baixa solubilidade em água e para suprimir íons.

Visto todas as vantagens que o ICER-BChE apresentou pode-se concluir que os objetivos deste trabalho foram alcançados com grande sucesso, proporcionando mais um método de triagem para inibidores seletivos de colinesterase.

### 6. Referências bibliográficas

ALVIM, JR. J. *et al.* Preparation and Evaluation of a Coumarin Library towards the Inhibitory Activity of the Enzyme gGAPDH from *Trypanosoma cruzi*. **J Braz Chem Soc** p.763-773, 2005.

Academic dictionaries and encyclopedias.

Disponível em: < http://en.academic.ru/dic.nsf/enwiki/4710750>. Acesso em 10 dez 2012.

ALZ.ORG – Alzheimer and Association® - Alzheimer Dieseases Facts and Figures. < Disponível em: http://www.alz.org/national/documents/report\_alzfactsfigures2009.pdf >. Acesso em 10 dez 2012.

BARTOLINI, M.; CAVRINI, V.; ANDRISANO, V. Batchwise covalent immobilization of human acetylcholinesterase: Kinetic and inhibition spectrophotometric studies. **Analytical Biochemistry**, n. 342, p. 163–166, 2005.

Characterization of reversible and pseudo-irreversible acetylcholinesterase inhibitors by means of an immobilized enzyme reactor. **J. Chromatog. A**, n. 1144, p. 102–110, 2007.

Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies. **J. Chromatog. A**, n. 1031, p. 27–34, 2004.

BARTOLINI, M. *et al.* Immobilized butyrylcholinesterase in the characterization of new inhibitors that could ease Alzheimer's disease. **J. Chromatog. A**, n. 1216, p. 2730–2738, 2009.

BRACHT A. *et al.* Enzimas. In: BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de laboratório em bioquímica.** Barueri-São Paulo: Ed. Manole, 2003. Cap. 5, p. 103-138.

BRENDA – ENZYME DATABASE. The comprehensive enzyme information system. Departamento de Bioinformática e Bioquímica. Braunschweig, Alemanha. Disponível em: <a href="http://www.brenda-enzymes.org/index.php4">http://www.brenda-enzymes.org/index.php4</a>. Acesso em: 24 fev. 2012.

BOURGUET, D. *et al.* Analysis of molecular forms and pharmacological properties of acetylcholinesterase in several mosquito species. **Neurochemistry International**, n.31, p. 65-72, 1997.

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 Chromatography A**. n. 1120, p. 151- 157, 2006.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, V. 32, n.1, p. 175 - 187, 2009.

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**, n. 133 p. 93-99, 2008.

CASTRO, *et al.* Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, *et al.* **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Ed. Local: Editora, ano. Cap. 6, 2008. p. 123-151.

CHARPENTIER, A., *et al.* A method to estimate acetylcholinesterase-active sites and turnover in insects. **Analytical Biochemistry**, n. 285, p. 76-81, 2000.

CORBEL, V. *et al.* Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. **BMC Biology**, n. 7, p. 47, 2009.

CAO L. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and designs, Ed. Willey-VCH, Weinheim, 2006.

CASSIANO, N. M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, V. 32, n.4, p. 1021-1030, 2009.

COPELAND R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal Chemists and Pharmacologists. New Jersey: Ed. John Wiley & Sons, 2005. 266p.

DÍAZ, A.N. *et al.*, Enzymatic determination of fenitrothion by cholinesterase and acetylcholinesterase on fluorogenic substrates. **J. Anal. Chem**, n. 357, p. 958-961, 1997.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, n. 7 p. 88, 1961.

FORSBERG, E. M.; GREEN, J. R. A.; BRENNAN, J. D. Continuous Flow Immobilized Enzyme Reactor-Tandem Mass Spectrometry for Screening of AChE Inhibitors in Complex Mixtures. **Analytical chemistry**, 2011

FRANCIS, P.T. *et al.*, The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **The Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**. 66, p. 137-147, 1999.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: a review. **J Chromatogr B**, V. 819, n.1, p. 3-16, 2005.

GIACOBINI, E. **Butyrylcholinesterase: Its Function and Inhibition**. 1<sup>a</sup> ed. United Kingdom: Ed. Martin Dunitz Ltda, 2003. 192p.

	Cholinesterases and	d cholinesterases	inhibitors.	1ª ed.	United
Kingdom: Ed M	artin Dunitz Ltda, 20	00. 270p.			

GREENBLATT, H. *et al* Acetylcholinesterase: A Multifaceted Target for Structure-Based Drug Design of Anticholinesterase Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Journal of Molecular Neurosciences**, v. 20, n. 3, p. 369, 2003.

GOMES, A. M.; KOSZUOSKI, R. Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular. **Revista de Psiquiatria RS**, v. 27, n.2, p. 197, 2005.

GOMES-HENS, A.; AGUILAR-CABALLOS, M. P. Modern analytical approaches to high-throughput drug discovery. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 171, 2007.

GUILARTE, T.R., *et al.* A simple radiometric in vitro assay for acetylcholinesterase inhibitors. **J. Pharmaceutical Science**, n. 72, p. 90-92, 1983.

HAGE, D. S. Affinity chromatography: a review of clinical applications. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 593-615, 1999.

JARVINEN, P. *et al.* A. Potency determinations of acetylcholinesterase inhibitors using Ellman's reaction-based assay in screening: Effect of assay variants. **Analytical Biochemistry**, n. 408, p. 166–168, 2011.

KALISZAN, R.; WAINER, I. W. Combination of biochromatography and chemometrics: a potential new research strategy in molecular pharmacology and drug design .In:\_\_\_\_\_\_. Chromatographic Separations Based on Molecular Recognition. New York: Ed. Wiley, 1997. p. 273.

KHORANA, N. *et al.* Evaluation of a new lead for acetylcholinesterase inhibition. **Medicinal Chemistry Research**, n. 18, p. 231-241, 2001.

KIM, J.; LEE, H. J.; LEE, K. W. Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, n. 196, p. 439-442, 2010.

KLIBANOV, A. M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? **Trends in Biotechnology**, V. 15, n. 3, p. 97-101, 1997.

LUCKARIFT, H. R. *et al.* Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. **Nature Biotechnology**,n. 2, p. 211-213, 2004.

LUCKARIFT, H. R.; JOHNSON, G. R.; SPAIN, J. C. Silica-immobilized enzyme reactors; application to cholinesterase-inhibition studies. **Journal of Chromatogr B**, n. 843, p. 310-316, 2006.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K.; A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. **Phytochem. Anal**, n. 13, p. 51–54, 2002.

MARINOV, I. *et al.* Immobilization of acetylcholinesterase on nanostructure. **International J. Biol. Macromol**, n. 44, p. 338–345, 2009.

MATEO, C. *et al.* R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n.6, p. 1451, 2007.

MOADDEL, R. *et al.* Immobilized receptor- and transporter-based liquid chromatographic phases for on-line pharmacological and biochemical studies: a minireview. **Journal of Chromatogr B**, v. 768, n.1, p. 41-53, 2002.

MORAES, M. C. **Desenvolvimento e aplicação de biorreatores capilares para a triagem de ligantes de Purina Nucleosídeo Fosforilases**. 2002. 141f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

MORAES, M. C. *et al.* Capillary bioreactors based on human purine nucleoside phosphorylase: A new approach for ligands identification and characterization. **Journal of Cromatography A**, n. 1232, p. 110-115, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. L. **Principles of Biochemistry**. 4 ed. New York: W. H. Freeman, 2004. 1100p.

NIE, Y-I.; WANG, W-H. Immobilized Enzyme Reactor in on-line LC and its application in drug Screening. **Chromaotgraphia**, n. 69, p. S5-S12, 2009.

ORHAN, I. E. Current Concepts on Selected Plant Secondary Metabolites With Promising Inhibitory Effects Against Enzymes Linked to Alzheimer's Disease. **Current Medicinal Chemistry**, n. 14, p. 2252-2261, 2012.

PEI NHG, X.-F.; BI, S.; BROSSI, A.; TOOME, V. Inhibition of human acetylcholinesterase by unnatural (+)-(3AR)-N1-norphysostigmine and arylcarbamate analogues. **Med che res**, n. 5, 1995.

RAUNK, A. The chemistry of Alzheimer disease. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 9, p. 2698-2715, 2009.

RAVEH L *et al*. The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with human butyrylcholinesterase. **Toxicol. Appl. Pharm**, n. 145, p. 43-53, 1997.

RHEE, I.K., *et al.* Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts using a fluorimetric flow assay. **Phytochemical Analysis**, n. 14, p. 145-149, 2003.

RHEE, I. K. *et al.* Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, n. 915, p. 217, 2001.

RHEE, I.K.; VAN RIJN, R.M.; VERPOORTE, R., Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. **Phytochemical Analysis**, n. 14, p. 127-131, 2003.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 412p.

SARRIA, A. L. F. **Atividade inseticida de Myracrodruon urundeuva e seus compostos metálicos frente a insetos sociais.** Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

SEGEL, I. H. Enzimas. In: Bioquímica: Teoria e problemas. Tradução de Denise Mattatia Grassiano, revisão técnica de Luiz Paulo Ribeiro. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 1979. Cap. 4, p. 257-388.

SERMBOONPAISARN, T.; SAWASDEE, P. Potent and selective butyrylcholinesterase inhibitors from ficus foveolata. **Fitoterapia**, n. 83, p. 780-784, 2012.

SERENA, L.; S. DOMINIKA O. D.; PALCHETTI, I. M. M. Evaluation of pesticide-induced acetylcholinesterase inhibition by means of disposable carbon-modified electrochemical biosensors. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 40, p. 485–489, 2007.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Adv. Synth. Catal,** n. 349, p. 1289 – 1307, 2007.

SILVA J. I. *et al.* Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitor. **J Pharmacol Biochem Anal**, in press, 2012.

SMITH, M. A. C. Doença de Alzheimer. **Genética**, n. 21, p. SII3, 1999.

STIGTER, E. C. A.; DE JONG, G. J.; VAN BENNEKOM, W.P. Pepsin immobilized in dextran-modified fused-silica capillaries for on-line protein digestion and peptide mapping. **Analytica Chimica Acta**, v. 619, n. 2, p. 231, 2008.

STOJAN, J.; ZORKO, M. Kinetic characterization of all steps of the interaction between acetylcholinesterase and eserine, **Biochim. Biophys Acta**, n. 1337, p. 75-84, 1997.

TUMTURK, H.; SAHIN, F.; DEMIREL, G. A new method for immobilization of acetylcholinesterase. **Bioprocess Biosyst Eng**,n. 30, p. 141–145, 2007.

TANG, Z; WANG, T.; KANG, J. Immobilized capillary enzyme reactor based on layer-by-layer assembling acetylcholinesterase for inhibitor screening by CE. **Electrophoresis**, n. 28, p. 2981–2987, 2007.

VIEIRA, L. C. C. **Síntese de uma coleção de cumarinas e análogos, possíveis inibidores da enzima acetilcolinesterase**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

VITOLO, M. Imobilização de enzimas. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; Schmidell, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial**. 1 ed, v. 3. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 391-404.

WILKINSON, G. N. Statistical estimations in enzyme kinetics. **Biochemical Journal**, n. 80, p. 324-32, 1961.

WEINSTOCK, M. Selectivity of Cholinesterase Inhibition: Clinical Implications for the Treatment of Alzheimer's Disease. **CNS Drugs**, n. 4, p. 307-323, 1999.