

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento de métodos para estudo  
de inibidores da acetilcolinesterase  
(Tratamento sintomático da Doença de Alzheimer)**

**Sofia M. Machado Pinheiro**

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

(Especialização em Bioquímica Médica)

**2011**

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento de métodos para estudo de  
inibidores da acetilcolinesterase  
(Tratamento sintomático da Doença de Alzheimer)**

**Sofia M. Machado Pinheiro**

**Orientador Externo:** Doutor Pedro Carlos de Barros Fernandes

**Orientador Interno:** Professora Doutora Maria Luísa Mourato de  
Oliveira Marques Serralheiro

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

(Especialização em Bioquímica Médica)

**2011**



O trabalho experimental que conduziu à elaboração desta dissertação de Mestrado foi realizado no Departamento de Biotecnologia do Instituto Superior Técnico, com o suporte da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

# AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à Professora Maria Luísa Serralheiro por ter aceitado ser minha orientadora e me ter encaminhado para um projecto fantástico. E ao professor Pedro Fernandes pela oportunidade que me deu em estagiar no seu laboratório e sob a sua orientação, bem como pela ajuda prestada nos momentos de dúvidas, pela transmissão de conhecimentos e pela disponibilidade que sempre teve para me receber.

Também gostaria de agradecer a todas as pessoas, professores e colegas, do 7º piso, do Instituto Superior Técnico, do BEBL e do BERG, que contribuíram para a concretização do meu trabalho e pela ajuda prestada nalguns momentos.

Por fim, gostaria de agradecer também às minhas colegas de laboratório, à Joélise Angelotti e em particular à Elisabete Ribeiro pelos bons momentos que me proporcionou, e pela boa disposição sempre presente, até mesmo em momentos de algum *stress*. Mas também pela ajuda e apoio que demos uma à outra ao longo deste trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos e família, em especial aos meus pais e ao Rui por me ajudarem sempre que preciso e compreenderem as ausências forçadas.

Obrigada a todos!

# RESUMO

A acetilcolina é um neurotransmissor, em grande parte responsável pela aprendizagem e pela formação de memória. Sabe-se que na Doença de Alzheimer, este neurotransmissor encontra-se em concentrações reduzidas devido à diminuição da actividade do enzima colina acetiltransferase, responsável pela sua síntese. Tendo em conta que o enzima acetilcolinesterase (AChE) é o responsável pela hidrólise da acetilcolina, pressupõe-se que a inibição deste enzima possa contribuir para o tratamento sintomático da AD leve a moderada, aumentando os níveis de acetilcolina na fenda sináptica.

Por outro lado, sabe-se também que os “chás” tipicamente portugueses têm na sua constituição fitoconstituintes com capacidade inibitória sobre a AChE. O screening destes inibidores é possível através da determinação da sua actividade inibitória, por métodos espectrofotométricos, com base no ensaio de Elman et al..

No entanto, após cada ensaio o enzima é deitado fora sem hipóteses de reaproveitamento. Sabendo que um enzima pode ser imobilizado, e deste modo ser reutilizado, testaram-se diversos métodos de imobilização. Entre os métodos testados um foi seleccionado como o mais promissor. Com este método a imobilização é efectuada em microplacas de poliestireno de 96 poços, recorrendo à activação da mesma com APTES e usando o GA como agente de reticulação. É também utilizada uma molécula espaçadora, o quitosano.

Este método provou ser bastante eficiente e estável, sendo possível obter actividades de 0,124 UA/min a qual se manteve estável pelo período de 44 dias.

Os perfis de pH e temperatura também foram determinados de modo a avaliar o comportamento do enzima quando imobilizado.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer, Acetilcolinesterase, Imobilização, GA, microplacas

# ABSTRACT

Acetylcholine is a neurotransmitter, in large part responsible for learning and memory formation. It is known that in Alzheimer's Disease, this neurotransmitter is found in small concentrations due to the decreased activity of the enzyme choline acetyltransferase, which is responsible for its synthesis. Given that the enzyme acetylcholinesterase is responsible for the hydrolysis of acetylcholine, it is assumed that inhibition of this enzyme may contribute to symptomatic treatment of mild to moderate AD, increasing levels of acetylcholine in the synaptic cleft.

On the other hand, we also know that typically Portuguese "teas" have phytochemicals in its constitution with inhibitory capacity on AChE. The screening of these inhibitors is possible by determining their inhibitory activity by spectrophotometric methods, based on Elman et al. assay.

However, after each test, the enzyme is discarded with no chance of retrieval. Knowing that an enzyme can be immobilized, and thus be reused, we tested several methods of immobilization. Among the methods tested, one was selected as the most promising. With this method, the immobilization is carried out in 96-well microtiter plates, using APTES as activation reagent and GA as crosslinking agent. It is also used a spacer molecule, the chitosan.

This method proved to be very efficient and stable, resulting in activities of 0,124 UA/min, which remained stable for a period of 44 days.

The pH and temperature profiles were also determined to assess the enzyme's behavior when immobilized.

**Key words:** Alzheimer Disease, Acetylcholinesterase, Immobilization, GA, 96-well microplate

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE QUADROS.....	xiii
ABREVIATURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1    A Doença de Alzheimer (AD).....	2
1.2    Hipótese Colinérgica - Acetilcolina e a Doença de Alzheimer.....	4
1.3    Enzima Acetilcolinesterase.....	7
1.4    Inibidores da AChE e tratamento da AD .....	8
1.5    Fontes naturais de AChEs.....	10
1.6    Biocatalisadores .....	13
1.7    Imobilização de enzimas .....	14
1.7.1. Métodos de imobilização .....	18
1.8    Activação das microplacas .....	21
1.9    Ensaio de Actividade .....	23
2. OBJECTIVO.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
3.1    Materiais e Reagentes.....	27
3.2    Procedimentos .....	27
3.2.1    Preparação das soluções .....	27
3.2.2    Ensaio de Actividade .....	27
3.2.2.1    Preparação das soluções enzimáticas .....	27
3.2.2.2    Ensaio de Actividade em Cuvettes .....	28
3.2.2.3    Adaptação do Ensaio de Actividade a microplacas.....	28
3.2.3    Ensaio de caracterização .....	28
3.2.3.1    Perfil de Temperatura do enzima.....	28
3.2.3.2    Perfil de Temperatura da reacção.....	29
3.2.3.3    Perfil de pH do Enzima e da reacção .....	29

3.2.4	Métodos de imobilização .....	29
3.2.4.1	Imobilização directa com GA.....	29
3.2.4.2	Imobilização com APTES.....	29
3.2.4.3	Imobilização em Ion Jelly .....	30
3.2.4.4	Imobilização em Placas aminadas .....	30
3.2.4.5	Imobilização em superfícies fotoactivadas .....	31
3.2.4.6	Imobilização com Quitosano .....	31
3.2.4.7	Imobilização com APTES e Quitosano .....	31
3.2.5	Ensaio de estabilidade .....	32
3.2.5.1	Do Enzima livre.....	32
3.2.5.2	Do enzima imobilizado .....	32
3.2.6	Doseamento Proteico.....	32
3.2.6.1	Doseamento directo.....	32
3.2.6.2	Doseamento pelo método do BCA.....	33
3.2.6.3	Doseamento pelo método de Bradford .....	33
4.	RESULTADOS .....	34
4.1	Ensaio de Actividade em cuvettes.....	35
4.2	Ensaio de caracterização .....	37
4.2.1	Perfil de Temperatura do Enzima.....	37
4.2.2	Perfil de Temperatura da reacção.....	38
4.2.3	Perfil de pH do Enzima e da reacção .....	39
4.3	Ensaio de estabilidade .....	40
4.3.1	Do enzima livre congelado .....	40
4.3.2	Do enzima livre a 4°C.....	41
4.4	1º Método de imobilização – imobilização com GA .....	42
4.4.1	1º ensaio de Imobilização com GA.....	42
4.4.2	Doseamento pelo método do BCA.....	42
4.4.3	Adaptação do Ensaio de Actividade a microplacas .....	43
4.4.4	2º ensaio de Imobilização com GA.....	44
4.5	2º Método de imobilização – Imobilização com APTES .....	46
4.5.1	1º ensaio de Imobilização com APTES.....	46
4.5.2	Doseamento proteico pelo método do BCA .....	46
4.5.3	2º Ensaio de Imobilização com APTES.....	47
4.5.4	3º Ensaio de Imobilização com APTES.....	49

4.5.5	4º Ensaio de Imobilização com APTES.....	49
4.5.6	5º Ensaio de Imobilização com APTES.....	50
4.5.7	Ensaio de Actividade dos sobrenadantes do 5º ensaio de Imobilização com APTES.....	50
4.5.8	6º Ensaio de Imobilização com APTES.....	51
4.5.9	Estabilidade do 6º Ensaio de Imobilização com APTES .....	51
4.5.10	7º Ensaio de Imobilização com APTES.....	52
4.5.11	Doseamento proteico dos sobrenadantes do 7º Ensaio de Imobilização com APTES pelo método de Bradford.....	53
4.6	3º Método de imobilização – Imobilização em Ion Jelly® .....	54
4.7	4º Método de imobilização – Imobilização em Placas Aminadas .....	55
4.7.1	1º Ensaio de Imobilização em Placas aminadas .....	55
4.7.2	2º Ensaio de Imobilização em Placas aminadas .....	55
4.7.3	Ensaio de Actividade dos sobrenadantes dos ensaios de Imobilização em Placas Aminadas.....	56
4.7.4	3º Ensaio de Imobilização em Placas aminadas .....	57
4.7.5	4º Ensaio de imobilização com Placas Aminadas .....	58
4.8	5º Método de imobilização – Imobilização em superfícies fotoactivadas.....	60
4.9	6º Método de imobilização – Imobilização com Quitosano .....	61
4.9.1	1º Ensaio de Imobilização com Quitosano .....	61
4.9.2	2º Ensaio de Imobilização com Quitosano .....	62
4.9.3	Ensaio de Actividade dos sobrenadantes do 2º ensaio de Imobilização com Quitosano .....	62
4.10	7º Método de imobilização – Imobilização com APTES, GA e Quitosano.....	64
4.10.1	Validação do Ensaio de imobilização com APTES.....	64
4.10.2	Ensaio de Actividade dos sobrenadantes do ensaio de Imobilização com APTES.....	65
4.10.3	Método 7.1 – Imobilização com APTES, GA e Quitosano.....	66
4.10.3.1	1º Ensaio de imobilização pelo método 7.1 .....	66
4.10.3.2	Estabilidade do 1º ensaio de imobilização pelo método 7.1 .....	66
4.10.3.3	Repetição do ensaio de imobilização pelo método 7.1 .....	67
4.10.4	Método 7.2 – Imobilização com APTES e Quitosano e com o agente NaBH <sub>4</sub> .....	69
4.10.4.1	1º Ensaio de imobilização pelo método 7.2 .....	69
4.10.4.2	Estabilidade do 1º ensaio de imobilização pelo método 7.2 .....	70
4.10.4.3	Ensaio de Actividade dos sobrenadantes do 1º ensaio de Imobilização pelo método 7.2.....	70

4.10.4.4	Repetição do Ensaio de imobilização pelo método 7.2 .....	71
4.10.4.5	Estabilidade dos 2º e 3º ensaios de imobilização pelo método 7.2.....	71
4.10.4.6	Ensaio de Actividade dos sobrenadantes do 2º ensaio de Imobilização pelo método 7.2	72
5.	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	73
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
ANEXOS	.....	xvi
ANEXO I	.....	xvii
ANEXO II	.....	xviii
ANEXO III	.....	xix

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação da estrutura de dois fármacos. ....	5
Figura 2: Representação esquemática do cérebro humano. ....	6
Figura 3: Descrição esquemática das alterações neurológicas verificadas de acordo com hipótese da cascata amiloide para a teoria de Alzheimer .....	6
Figura 4: Representação esquemática da estrutura do enzima acetilcolinesterase (AChE) .....	8
Figura 5: Esquema representativo das alterações colinérgicas verificadas a nível da fenda sináptica. ....	9
Figura 6: Estrutura química da fisostigmina. ....	11
Figura 7: Estrutura química da rivastigmina .....	11
Figura 8: Estrutura química da huperzina-A .....	12
Figura 9: Estrutura química da galantamina.....	12
Figura 10: Estrutura química da Viniferina-A .....	12
Figura 11: Estrutura química do ácido ursólico .....	12
Figura 12: Representação esquemática dos parâmetros a determinar a quando da selecção de um método de imobilização. ....	16
Figura 13: Custo de manufacturação para enzimas imobilizados .....	18
Figura 14: Imagem ilustrativa de uma microplaca de 96 poços (A) e estrutura química do poliestireno (B). ....	22
Figura 15: Estrutura química do glutaraldeído .....	22
Figura 16: O efeito do pH na taxa de hidrólise da acetilcolina .....	23
Figura 17: Actividade enzimática da AChE, em UA/min. ....	35
Figura 18: Actividade enzimática da AChE, em UA/min.....	36
Figura 19: Perfil de temperatura do enzima.....	37
Figura 20: Recuperação do enzima sujeito a elevadas temperaturas. ....	38
Figura 21: Perfil de temperatura da reacção de actividade. ....	38
Figura 22: Perfil de pH. ....	39
Figura 23: 1º Ensaio de estabilidade do enzima livre congelado. ....	40
Figura 24: Ensaio de estabilidade do enzima livre congelado (2º e 3º ensaios).....	41
Figura 25: Ensaio de estabilidade do enzima livre a 4°C. ....	41
Figura 26: Actividade enzimática da AChE imobilizada com GA (1º ensaio), em UA/min.....	42
Figura 27: Actividade enzimática da AChE segundo o ensaio , em UA/min. ....	44
Figura 28: Actividade enzimática da AChE imobilizada directamente com GA (2º ensaio), em UA/min. ..	44
Figura 29: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (1º ensaio), em UA/min. ....	46
Figura 30: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (2º ensaio), em UA/min. ....	48
Figura 31: Estabilidade da actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES. ....	51
Figura 32: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (7º ensaio), em UA/min. ....	52
Figura 33: Actividade enzimática da AChE imobilizada em Ion Jelly®, em UA/min.....	54
Figura 34: Actividade enzimática da AChE imobilizada em Placas aminadas (1º ensaio), em UA/min. ....	55
Figura 35: Actividade enzimática da AChE imobilizada em placas aminadas (2º ensaio), em UA/min. ....	56
Figura 36: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada em placas aminadas, em UA/min. ....	57
Figura 37: Actividade enzimática da AChE imobilizada em placas aminadas (4º ensaio), em UA/min. ....	59
Figura 38: Actividade enzimática da AChE imobilizada em superfícies fotoactivadas, em UA/min.....	60
Figura 39: Actividade enzimática da AChE imobilizada na presença de quitosano (1º ensaio), em UA/min. ....	61
Figura 40: Actividade enzimática da AChE imobilizada na presença de quitosano (2º ensaio), em UA/min. ....	62

Figura 41: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada na presença de quitosano (2º ensaio), em UA/min.....	63
Figura 42: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES, em UA/min.....	64
Figura 43: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada com APTES, em UA/min. ....	65
Figura 44: Estabilidade da actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.1 (1º ensaio). ....	67
Figura 45: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.1 (2º e 3º ensaios), em UA/min...	68
Figura 46: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.2 (1º ensaio), em UA/min.....	69
Figura 47: Estabilidade da actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.2 (1º ensaio). ....	70
Figura 48: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.2 (2º e 3º ensaios), em UA/min...	71
Figura 49: Estabilidade da actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.2 (2º e 3º ensaios). .....	72
Figura 50: Resumo das possíveis formas do GA em solução aquosa .....	75
Figura 51: Reacções do GA com proteínas. ....	76
Figura 52: Mecanismo de reacção do método de imobilização com APTES. ....	76
Figura 53: Representação esquemática da activação fotoquímica de uma superfície inerte para imobilização de uma proteína. ....	77
Figura 54: Esquema da estratégia de derivatização com moléculas espaçadoras na superfície de microplacas aminadas para a imobilização de proteínas. ....	78
Figura 55: Curva de calibração obtida através da representação gráfica da absorvência a 562 nm das soluções padrão em função da concentração proteica da proteína padrão, BSA.....	xvii
Figura 56: Curva de calibração obtida através da representação gráfica da absorvência a 562 nm das soluções padrão em função da concentração proteica da proteína padrão, BSA.....	xix

# ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Esquematização das propriedades bioquímicas do enzimas, das características químicas do transportador e das interacções entre ambas, a ter em conta a quando da selecção de uma método de imobilização.....	17
Quadro 2: Quadro resumo dos principais métodos usados para imobilização de enzimas.....	19
Quadro 3: Doseamento proteico dos sobrenadantes das soluções enzimáticas imobilizadas, pelo método de BCA..	43
Quadro 4: Doseamento proteico das Soluções enzimáticas originais, pelo método de BCA.....	43
Quadro 5: Doseamento proteico dos sobrenadantes das soluções enzimáticas imobilizadas, pelo método de BCA. ....	45
Quadro 6: Doseamento proteico dos sobrenadantes das soluções enzimáticas imobilizadas com APTES, pelo método de BCA.....	47
Quadro 7: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (2º ensaio), em UA/min. ....	47
Quadro 8: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (3º ensaio), em UA/min. ....	49
Quadro 9: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (4º ensaio), em UA/min. ....	50
Quadro 10: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (5º ensaio), em UA/min. ....	50
Quadro 11: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada com APTES (5º ensaio), em UA/min. ....	51
Quadro 12: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (6º ensaio), em UA/min. ....	51
Quadro 13: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada com APTES (7º ensaio), em UA/min. ....	52
Quadro 14: Concentrações proteicas dos sobrenadantes do 7º ensaio de imobilização com APTES doseados pelo método de Bradford.....	53
Quadro 15: Actividade enzimática da AChE imobilizada em placas iNUNC (3º ensaio), em UA/min. ....	58
Quadro 16: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.1, com APTES, GA e quitosano em placas de PS (1º ensaio), em UA/min. ....	66
Quadro 17: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.1, com APTES, GA e quitosano em placas de PS (2º e 3º ensaios), em UA/min..	68
Quadro 18: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.2, com APTES, GA, quitosano e NaBH <sub>4</sub> em placas de PS (1º ensaio), em UA/min.....	69
Quadro 19: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada pelo método 7.2, com APTES, GA, quitosano e NaBH <sub>4</sub> em placas de PS (1º ensaio), em UA/min. Valores de actividade calculados directamente do declive da absorvência a 405 nm em função do tempo. ....	70
Quadro 20: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.2, com APTES, GA, quitosano e NaBH <sub>4</sub> em placas de PS (2º e 3º ensaios), em UA/min.....	71
Quadro 21: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada pelo método 7.2, com APTES, GA, quitosano e NaBH <sub>4</sub> em placas de PS (sobrenadantes do 2º ensaios), em UA/min.....	72
Quadro 22: Valores de absorvência a 562 nm das soluções padrão para o doseamento proteico pelo método do BCA .....	xvii
Quadro 23: Doseamento proteico das soluções enzimáticas originais livres, pelo método de BCA.....	xviii
Quadro 24: Doseamento proteico das soluções enzimáticas livres sujeitas ao processo de imobilização, pelo método de BCA.....	xviii
Quadro 25: Doseamento proteico das soluções de GA originais, pelo método de BCA .....	xviii

Quadro 26: Doseamento proteico das soluções de GA sujeitas ao processo de imobilização, pelo método de BCA. .... xix

# ABREVIATURAS

AD – Doença de Alzheimer (do inglês Alzheimer's Disease)

ACh – Acetilcolina (do inglês Acetylcholine)

AChE – Acetilcolinesterase (do inglês Acetylcholinesterase)

AChEIs – Inibidores da Acetilcolinesterase (do inglês Acetylcholinesterase Inhibitors)

ROS – Espécies Reactivas de Oxigênio (do inglês Reactive Oxigene Species)

FDA – Food and Drug Administration (in the United States)

APP – Proteína Precursora Amilóide (do inglês Amyloid Precursor Protein)

nAChRs – Receptores nicotínicos da acetilcolina (do inglês Nicotinic acetylcholine receptors)

mAChRs – Receptores muscarínicos da acetilcolina (do inglês Muscarinic acetylcholine receptors)

OMS – Organização Mundial de Saúde

MTPs – Microplacas de 96 poços (do inglês Microtiter Plates)

PCMCs - Proteínas Revestidas de Microcristais (do inglês Protein-Coated Microcrystals)

CLEAs – Agregados de Enzimas Crosslinked (do inglês CrossLinked Enzyme Aggregates)

PS – Poliestireno (do inglês Polystyrene)

GA – Glutaraldeído (Glutaraldehyde)

AChI – Iodeto de Acetilcolina (do inglês 2-Acetylthioethyltrimethylammonium Iodide)

TNB – 5-tio-nitrobenzóico (do inglês 5-thio-nitrobenzoate)

DTNB – 5,5'-bis-Ditio-2-nitrobenzoato (do inglês 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid))

HEPES – Tampão HEPES (do inglês 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid))

RT – Temperatura Ambiente (do inglês Room Temperature)

DDW – Água destilada (do inglês distilled water)

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 A Doença de Alzheimer (AD)

A doença de Alzheimer (AD) é a principal forma de demência nos dias de hoje. Afecta maioritariamente a população envelhecida, afectando entre 2 a 10% dos Norte-Americanos e Europeus com mais de 65 anos [1-10].

É uma doença degenerativa primária do cérebro, caracterizada pelo declínio cognitivo, a progressiva perda de memória e a demência [1, 3, 6, 11-16]. Apesar da inúmera investigação ao longo dos últimos anos sobre este tema, ainda nenhum factor foi determinado como sendo o responsável por esta condição. Geralmente, num paciente com AD, a doença tem um início gradual, apresentando um declínio progressivo, acompanhado por mudanças neuropatológicas específicas. Este declínio, a longo prazo, acaba por interferir com o funcionamento diário do indivíduo, da sua qualidade de vida e daqueles que o rodeiam [1, 3, 5].

A doença apresenta três principais lesões patológicas características: placas amilóides, emaranhados neurofibrilares e perdas sinápticas [2, 8, 11-13, 15]. A redução dos níveis de Acetilcolina (ACh) é a principal alteração a nível sináptico [1, 4, 17, 18].

A taxa de progressão da doença, e os seus sintomas, varia de um indivíduo para outro. Normalmente, os primeiros sinais do início da doença são percebidos pelo indivíduo, ou por membros da sua família ou rede social [3].

A nível cognitivo verifica-se uma perda de memória de curto prazo, um comprometimento da linguagem e desorientação no espaço, lugar e das pessoas. É também comum numa fase inicial, os pacientes apresentarem sintomas de depressão. Alterações psiquiátricas, como agressividade, agitação, delírios e alucinações, são os sintomas verificados numa fase mais avançada. Numa fase mais tardia, é mesmo observado o declínio das funções motoras, incontinência e necessidade de acamar os pacientes [3, 6].

O diagnóstico desta doença é um dos principais desafios da ciência, uma vez que como já foi referido anteriormente, ainda não foi determinado um factor responsável. Assim, a maior parte dos diagnósticos só são estabelecidos quando os sintomas clínicos se tornam significativos ao ponto de interferirem com o funcionamento social ou ocupacional do paciente [1, 3, 6]. Foi determinado, num estudo realizado numa população dos EUA, que o tempo médio desde o início estimado da doença até ao diagnóstico inicial é de 2,2 anos. Conclui-se também com este estudo, que infelizmente, quando a doença segue o seu curso normal, todos os indivíduos afectados acabam por se tornar totalmente dependentes de cuidados externos e/ou de familiares [3, 5].

Antigamente, o diagnóstico era efectuado *pos-mortem*, por autópsia, que revelava a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares [1]. Actualmente é possível obter o mesmo diagnóstico, *in vivo*, através de uma biopsia de tecido cerebral, não sendo no entanto este um procedimento comum. Por norma, os pacientes são avaliados e, depois, diagnosticados com a AD com base num exame físico, no histórico do paciente, e numa determinação sistemática do seu estado mental, usando testes cognitivos e psicológicos específicos. Mas neste campo, residem também algumas dificuldades, pois apesar de terem sido criados critérios de diagnóstico para uniformizar a classificação, esses mesmos critérios são difíceis de por em funcionamento. Além dos estabelecidos pela NINCDS-ADRDA (National

Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke e pela Alzheimer's Disease and Related Disorders Association), não existe especificidade quanto aos testes neuropsicológicos e ferramentas de diagnóstico que devem ser usados. Por conseguinte, isto introduz uma alta variabilidade entre os estudos [3, 5].

De qualquer forma, tem sido inúmera a investigação sobre esta doença, e foram já examinados e determinados quais os principais factores de risco e de protecção. Como principais factores de risco associados à AD encontram-se: a idade, um factor indiscutível, uma vez que, um grande número de casos de AD aparece em pessoas de idade avançada; a história familiar de AD; a presença do alelo  $\epsilon 4$  do gene para apolipoproteína E; um historial de depressão; Síndrome de Down; e a raça. Todos estes factores genéticos são prováveis de influenciar a etiologia da doença. Entre outros factores suspeitos estão: o traumatismo craniano com perda de consciência; a baixa escolaridade; a absorção de alumínio; os campos electromagnéticos; o sexo; o consumo de antiácidos; a hipertensão; os baixos níveis séricos de vitamina B12; e a doença vascular. Existem também alguns factores considerados, mas que despertam alguma controvérsia como: a idade materna ao nascimento; a exposição ocupacional a solventes e colas; a diabetes; e o consumo de álcool [3, 12].

Infelizmente, não existe um tratamento eficaz que seja capaz de parar completamente ou diminuir a progressão desta desordem. Também nesta área, um dos maiores impedimentos de progresso é a falta de entendimento sobre as causas precisas da AD. No entanto, existem alguns fármacos que proporcionam um alívio temporário dos sintomas. Esses mesmos fármacos são direccionados para os sistemas colinérgicos e glutamatérgicos. Assim sendo, é essencial determinar a causa desta doença neurodegenerativa para desenvolver tratamentos eficazes e a descoberta de uma eventual cura para os seus pacientes [1, 5].

Não existe tratamento, mas vários factores, considerados de protecção foram examinados. Os mais comuns descritos na literatura são eles: O tabagismo, surpreendentemente, e apesar de inicialmente avaliado como um factor de risco, tem sido geralmente encontrado como sendo um factor de protecção; anti-inflamatórios não-esteróides; a ingestão de estrogénio; e a artrite. Existem outros que são também suspeitos de serem protectores para AD, como: fortes dores de cabeça; o alelo  $\epsilon 2$  da apolipoproteína E; a actividade física; e as transfusões de sangue. Para otimizar as estratégias preventivas e de tratamento, é necessária uma melhor compreensão destes factores de risco e de protecção [3].

O estudo sobre esta doença continua a desempenhar um importante papel na comunidade científica, pois a mesma, afecta cada vez mais indivíduos. Na América do Norte e na Europa, a proporção de pessoas idosas, em relação à população em geral tem aumentado a um ritmo rápido. A prevalência da demência na população geral acima de 65 anos está estimada com uma variação entre 2,2 e 8,4%, em que a AD representa cerca de  $45 \pm 67\%$  de todas as formas de demência. E prevê-se que, devido ao envelhecimento da população, a prevalência da AD na América do Norte e na Europa aumente drasticamente nas próximas décadas [3].

As taxas de prevalência são um dado importante e útil para fins de saúde pública e económica. Todavia é importante ter dados sobre as taxas de incidência, que podem fornecer informação importante acerca dos factores de risco, e, portanto, sobre a etiologia e patogénese da doença. Infelizmente, poucos são os estudos que estimam as taxas de

incidência. Assim, entre os poucos estudos realizados com populações Europeias, verificaram-se taxas de incidência de 100 000 pessoas-ano. Taxas semelhantes são encontradas nas populações norte-americanas com idade entre 65 e 75 anos, no entanto, estas taxas têm uma tendência a ser um pouco maiores nos indivíduos com idade acima de 75 anos [3].

No que diz respeito à sobrevivência, os estudos existentes, indicam uma sobrevivência média, após o diagnóstico de 3,4 a 5,9 anos. Uma curiosidade interessante, está relacionada com as diferenças entre sexos, embora já tenha sido demonstrado que o mesmo afecta de forma independente a taxa de sobrevivência, tem sido observado de forma consistente que os homens com AD têm uma menor sobrevivência, enquanto as mulheres com AD sofrem de períodos mais longos de morbidez. Isto pode ser parcialmente reflectido pelo facto de que, em geral, as mulheres têm uma esperança de vida mais longa. Mas, apesar de a maioria das mulheres com AD viverem mais que os homens com a doença, mais mulheres que homens morrem por causa da AD [3].

## 1.2 Hipótese Colinérgica - Acetilcolina e a Doença de Alzheimer

A primeira teoria proposta, para explicar a AD, foi a hipótese Colinérgica para a AD, formulada pela primeira vez por Whitehouse et al. (1982) [1, 8].

Em 1936, Henry Dale e Otto Loewi partilharam um prémio Nobel pela investigação pioneira sobre a neurotransmissão química e em particular pela descoberta e caracterização funcional do primeiro neurotransmissor identificado, a ACh. A história deste neurotransmissor inicia-se com as experiências cruciais executadas por Dale, que identificou a ACh como sendo responsável por um forte efeito vasodepressor e por Loewi que demonstrou a neurotransmissão química numa preparação de tecido nervoso de rã [19].

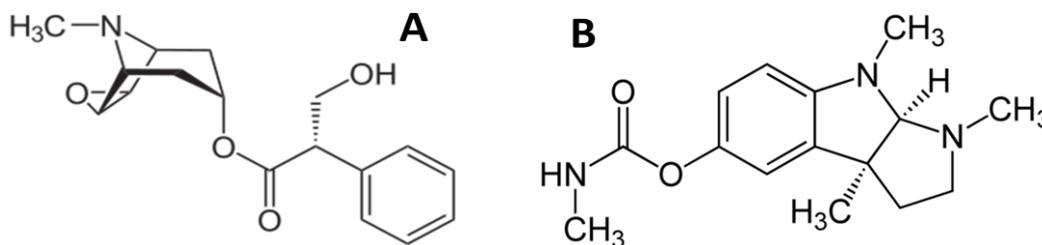
Vários são já os neurotransmissores conhecidos, mas o primeiro a ser descoberto no cérebro foi a Acetilcolina, e também no sistema nervoso periférico. Este neurotransmissor está associado à aprendizagem e à memória. Uma vez produzida, a ACh é armazenada em células cerebrais e libertada na fenda sináptica através de um estímulo. Na AD, verifica-se uma diminuição de ACh disponível devido a uma diminuição da sua síntese [20, 21].

O enzima responsável pela síntese da Acetilcolina é a colina acetiltransferase. Em muitos casos verifica-se uma diminuição significativa deste enzima, com a idade. Assim, a determinação deste enzima no cérebro torna-se útil, pois possibilita um entendimento dos mecanismos de neurotransmissão e neuroregulação. Com esta determinação torna-se possível a detecção e o tratamento eficaz de doenças neurodegenerativas, como a AD [18, 22, 23]. O enzima responsável pela hidrólise da ACh é a acetilcolinesterase [20, 21].

Foi a descoberta inicial da neurotransmissão colinérgica que conduziu à “Hipótese Colinérgica”, elaborada por vários investigadores. Esta hipótese abrange várias funções cerebrais e disfunções, desde desordens afectivas, como a depressão, a esquizofrenia, e o

delírio, à regulação do sono e danos cerebrais traumáticos. [18, 24] A mais conhecida e actual é a Hipótese Colinérgica para a demência e a perda da função cognitiva. Estudos iniciais sugeriram uma forte relação entre a função cognitiva e a neurotransmissão mediada pela ACh. [19] Esta hipótese sugere que a perda selectiva de neurónios colinérgicos na AD resulta de um défice relativo da ACh em regiões específicas do cérebro que medeiam as funções de aprendizagem e memória, sendo a ACh necessária para as mesmas. [6, 7, 9, 11, 16, 24-27]

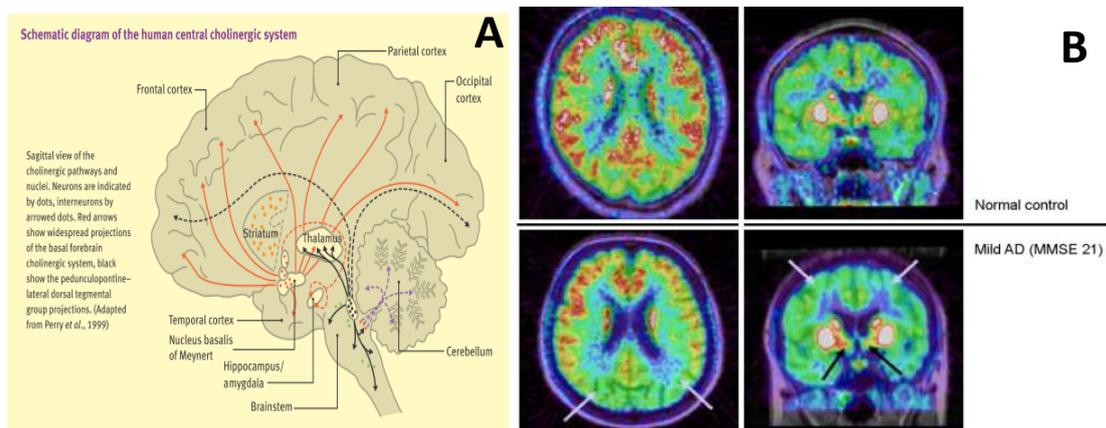
Foi esta primeira teoria proposta para explicar a AD, que conduziu ao desenvolvimento das únicas drogas aprovadas para o tratamento da doença leve a moderada. Na base desta teoria está a perda de actividade colinérgica observada em cérebros de pacientes de AD. Outros estudos experimentais realizados com humanos e primatas sugeriram um papel para a ACh na aprendizagem e memória. Nestes estudos, sujeitaram-se indivíduos jovens à inibição da actividade colinérgica com escopolamina (Figura 1A), os quais apresentaram défices de memória semelhantes aos observados em indivíduos idosos. Neste caso, foi possível reverter os défices através do tratamento com um agonista colinérgico, a fisostigmina (Figura 1B). E com base nesta ideia deu-se início a vários ensaios clínicos, utilizando outros agonistas colinérgicos, inibidores da Acetilcolinesterase (AChEIs) que inicialmente se mostraram promissores na reversão dos défices da memória em pacientes de AD. [1, 28]



**Figura 1: Representação da estrutura de dois fármacos.** A, escopolamina, com capacidade inibitória sobre a actividade colinérgica. B, fisostigmina, um agonista colinérgico.

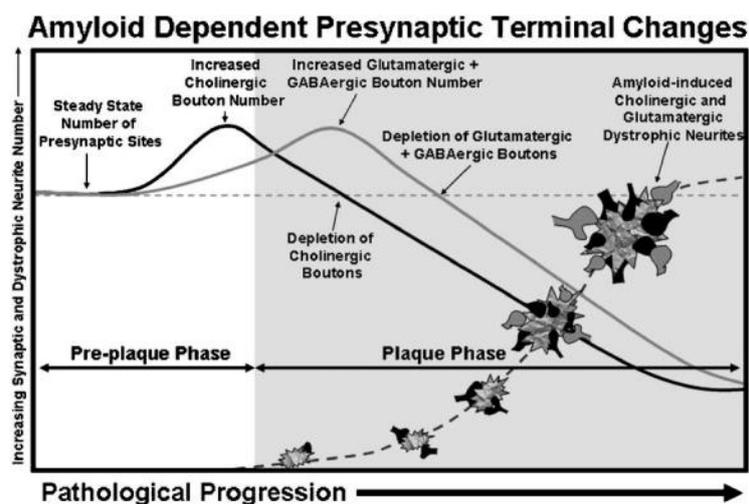
Foi a partir do conhecido até então que surgiu a ideia de se desenvolvem aproximações terapêuticas racionais para a doença, tendo como alvo a correcção das alterações neuroquímicas encontradas. Isto ocorreu durante os anos 70 e 80, quando a ideia anterior foi aplicada à examinação de amostras do cérebro de doentes com AD, e assim a Hipótese Colinérgica atingiu o seu auge. Os resultados desta análise revelaram um défice colinérgico específico, envolvendo a projecção colinérgica de uma população neuronal do proenséfalo basal, do *nucleus basalis magnocellularis of Meynert* até ao córtex e hipocampo (Figura 2). Durante esta análise verificou-se também uma diminuição marcada da ACh em amostras patológicas do córtex e do hipocampo de pacientes com AD. Em alguns tecidos também foi detectada uma redução de dois outros marcadores específicos da função das sinapses colinérgicas, da despolarização induzida pela libertação da ACh e da captação da colina em nervos terminais para repor a maquinaria sintética da ACh [19, 27, 29, 30].

Desde sempre a Hipótese Colinérgica foi questionada, e com o progresso da bioquímica algumas ideias tornaram-se recorrentes, como o caso das teorias associadas à proteína  $\beta$ -amilóide e à hiperfosforilação da proteína tau, relacionadas com os dois estigmas mais antigos associados a esta doença desde a sua descrição inicial por Alois Alzheimer, as placas senis e os emaranhados neurofibrilares [19]. E a partir do momento em que se determinou que a diminuição da actividade colinérgica não é a única característica responsável pela AD, começaram a ser estabelecidos vários modelos de co-factores [1].



**Figura 2: Representação esquemática do cérebro humano.** A – Representação com referência às principais regiões neuronais com projecção colinérgica (imagem adaptada da referência 30). B – Tomografias cerebrais comparativas entre um cérebro normal e o de um paciente com AD leve (imagem adaptada da referência 29)

A investigação acerca da AD foi impulsionada devido ao importante papel que a proteína  $\beta$ -amilóide revelou na patogénese da doença, o que conduziu a uma investigação sobre possíveis interacções entre os mecanismos colinérgicos e a proteína amilóide [18, 19].



**Figura 3: Descrição esquemática das alterações neurológicas verificadas de acordo com hipótese da cascata amilóide para a teoria de Alzheimer (imagem adaptada da referência 2)**

Embora os resultados iniciais tenham sido em grande parte contraditórios, dados posteriores forneceram algum apoio mais convincente para a possibilidade de uma interacção bi-direccional entre a função colinérgica e o processamento da proteína precursora amilóide

[19]. Inclusive, Mesulam et al. verificaram que apesar de na AD existir uma diminuição global da actividade da AChE no cérebro, os níveis deste enzima aumentam ao redor das placas amilóides e dos emaranhados neurofibrilares [18, 28, 31].

As ideias mencionadas anteriormente deram origem à hipótese da cascata amilóide para a patogénese da AD (Figura 3) [19]. Esta hipótese, que tenta explicar os défices visíveis na memória e na função cognitiva, propõe que a deposição de placas seja directamente responsável pelos sintomas clínicos da doença [2].

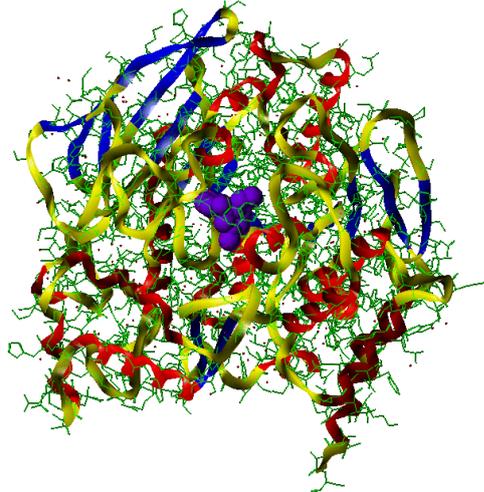
No entanto, ainda não existe uma explicação para a associação entre a AChE e a cascata amilóide, mas existe a possibilidade de que a proteína  $\beta$ -amilóide possa influenciar a expressão da AChE, e que esta possa desempenhar um papel na fibrilogénese [18].

Uma outra associação interessante verifica-se entre o stress oxidativo e as doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento. O stress oxidativo, causado pelas espécies reactivas de oxigénio (ROS), origina a oxidação de biomoléculas, conduzindo a danos celulares, desempenhando um papel patogénico importante no processo de envelhecimento [17, 23]. De acordo com alguns autores também deverá existir uma correlação entre a neurodegeneração da AD e as respostas inflamatórias locais e a quantidade de colesterol. No entanto, os resultados de ensaios clínicos com fármacos anti-inflamatórios, antioxidantes, e com agentes redutores do colesterol foram negativos [12, 32].

### 1.3 Enzima Acetilcolinesterase

O sistema neurotransmissor mais importante envolvido, na regulação das funções cognitivas, é o sistema colinérgico central. Deste modo, para contrariar a perda de neurónios colinérgicos na área do hipocampo, que é uma das principais características associadas à AD, é necessário induzir um aumento da actividade colinérgica central. Tal é conseguido através do uso de agentes anti-colinesterase, uma vez que o enzima AChE é considerado o enzima-chave na degradação da ACh [8, 33]. Ele é responsável pela interrupção da transmissão do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas, por hidrólise rápida da ACh [34].

Tendo por base este facto, a inibição da AChE é a estratégia mais indicada e investigada para o tratamento de diversas doenças do foro neurológico, como a AD, a demência senil, a ataxia, a miastenia grave e a doença de Parkinson [33].



**Figura 4: Representação esquemática da estrutura do enzima acetilcolinesterase (AChE), de acordo com o site <http://bidd.nus.edu.sg/group/research.htm>**

Esta tarefa nem sempre é facilitada, a AChE (Figura 4) é um enzima muito complexo. A AChE (EC 3.1.1.7) é uma hidrolase de serina que reage selectivamente com o seu substrato natural, a ACh [35, 36]. Este enzima apresenta diversas formas moleculares. Estas podem ser divididas em formas assimétricas e formas globulares, com estas últimas existentes como monómeros, dímeros ou tetrâmeros catalíticos, quer secretados como formas solúveis ou ancoradas à membrana por um domínio hidrofóbico [4, 28]. Vários estudos, com técnicas distintas, demonstraram que o centro activo da AChE é composto de vários domínios principais: (a) um domínio que contém a serina activa, (b) um domínio aniónico que acomoda o pólo positivo da ACh, (c) domínios hidrofóbicos que ligam substratos aril, e outros ligandos sem carga [35-37]. A tríade catalítica é constituída pelos resíduos de aminoácido Ser 203 – His 447 – Glu 334 [36, 38]. Quanto à inibição da AChE sabe-se também que alguns inibidores se ligam ao centro catalítico (inibidores competitivos), enquanto outros deverão influenciar os parâmetros de estado estacionário pela associação com um domínio alostérico afastado do centro activo. Este domínio é referido como o centro aniónico periférico (PAS) [38].

## 1.4 Inibidores da AChE e tratamento da AD

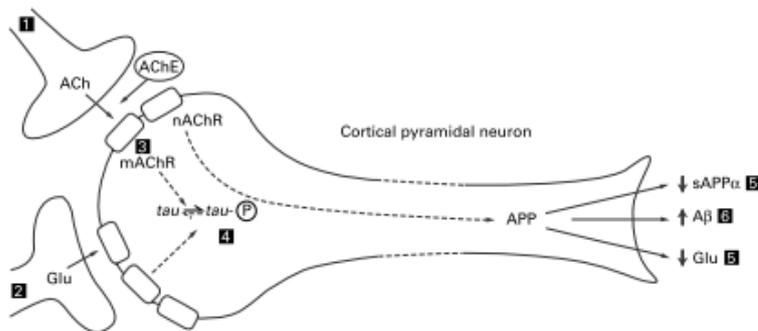
Apesar das inconsistências na literatura sobre a natureza e a extensão do sistema colinérgico, a observação geral de um défice colinérgico em pacientes com AD levou à estratégia do aumento colinérgico para o tratamento sintomático da doença (Figura 5). Num campo de várias opções teóricas, a melhor abordagem (cl clinicamente relevante) tem sido o uso de AChEIs [4, 6, 7, 9-11, 14-16, 21, 30, 39]. E de facto, actualmente, os únicos fármacos aprovados são potentes AChEIs [11]. Existem várias classes químicas de AChEIs, incluindo aminoacridinas, piperidinas, carbamatos, organofosfatos, e alcalóides terciários [6].

Uma vasta lista de plantas disponíveis na Natureza constitui a principal fonte destes potenciais inibidores [14-16, 33].

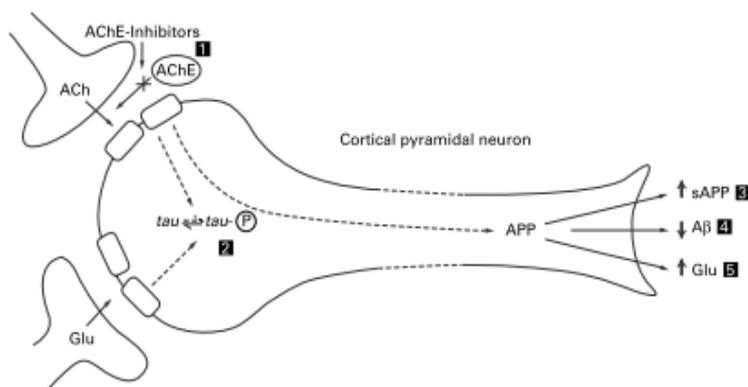
Com base nestas fontes naturais, existem alguns inibidores sintéticos legalmente aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) que são utilizados no tratamento da disfunção cognitiva e na perda de memória, sintomas associados à AD [40]. Os mesmos inibidores apresentam também efeitos positivos na ataxia, na miastenia grave, na doença de Parkinson, no Síndrome de Down, na demência senil, e noutras demências [30, 33]. Foi demonstrado que os AChEIs funcionam aumentando a ACh na região sináptica, restaurando assim a neurotransmissão colinérgica deficiente [17]. O uso destes agentes tem mostrado uma melhoria na cognição, na função global, e/ou actividades da vida diária [41].

Na AD, também se verifica, devido à morte de células nervosas em áreas corticais, uma libertação excessiva de glutamato, outro neurotransmissor. Para combater esta característica, usa-se a memantina que melhora a relação sinal-ruído da transmissão glutamatérgica e protege os neurónios corticais dos efeitos tóxicos da sobreexposição crónica ao glutamato [32].

A Proposed neurochemical changes in Alzheimer's disease



B Rectification of neurotransmission with cholinesterase inhibitors



**Figura 5: Esquema representativo das alterações colinérgicas verificadas a nível da fenda sináptica.** A, Alterações neuroquímicas propostas na AD. B, Rectificação da neurotransmissão com AChEIs (imagem adaptada da referência 39)

O primeiro inibidor especificamente aprovado, a 1,2,3,4-tetrahydro-9-aminocridina (tacrina), foi introduzido no mercado em 1993. Actualmente, existem outros fármacos, como o donepezil, a galantamina e a rivastigmina, também usados para o tratamento sintomático da

AD leve a moderada [1, 4, 5, 7, 10, 14, 15, 21, 26, 33, 40]. Esta terapia é no entanto, devido à sua natureza farmacológica, considerada como uma intervenção de curto prazo a nível sintomático, embora alguns estudos indiquem a manutenção do efeito clínico durante pelo menos 1 ano [4, 10, 18, 32]. Além disso, estes medicamentos apresentam alguns efeitos secundários, como distúrbios gastrointestinais e problemas associados com a biodisponibilidade, o que torna necessária a procura de novos agentes activos que tenham acção inibidora sobre a AChE com maior eficácia, nomeadamente, em fontes naturais [5, 17, 23, 33, 40]. De acordo com alguns ensaios clínicos, todos os medicamentos apresentam resultados semelhantes, contudo, o donepezil é o mais prescrito [1].

Actualmente, a administração de AChEIs é a estratégia de tratamento de maior sucesso na AD, e a possibilidade terapêutica de usar agonistas selectivos para as subunidades nAChRs (receptores nicotínicos da acetilcolina) e mAChRs (receptores muscarínicos da acetilcolina) está a ser investigada [39].

Há evidências que sugerem que os nAChRs e mAChRs são possíveis alvos neuroprotectores para AD, já que ambos podem estar envolvidos no controle do processamento da proteína precursora amilóide (APP) e a deposição  $\alpha\beta$  [30].

## 1.5 Fontes naturais de AChEIs

O conhecimento popular de plantas usadas por seres humanos é baseado em milhares de anos de experiência. Por "tentativa e erro", as pessoas aprenderam a reconhecer e usar plantas, incluindo aquelas com uma função mágico-religiosa. O conhecimento do uso de plantas foi difundido pelas civilizações antigas. Até meados do século 19, as plantas foram os principais agentes terapêuticos utilizados por seres humanos, e até hoje o seu papel na medicina ainda é relevante [6, 42]. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% do total da população humana continua a tratar os seus problemas de saúde com as seus remédios tradicionais baseados principalmente na fitoterapia [43].

As partes da planta mais utilizadas para fins medicinais são, por ordem decrescente: as folhas, as flores, a planta inteira, as partes aéreas completas, a raiz, os frutos e os caules [43].

Tendo em vista não só o tratamento da AD, a procura de AChEIs derivados de plantas tem sido acelerada, uma vez que os mesmos podem também ser benéficos para outras formas de demência, como a demência com corpos de Lewy, a demência vascular e o Síndrome de Down [33].

Várias plantas têm sido descritas como tendo actividade inibitória sobre a AChE [33]. Tradicionalmente, quatro plantas, *Salvia tiliifolia* Vahl. (Lamiaceae), *Chamaecrista mimosoides* L. Greene (Caesalpiniaceae), *Buddleja salviifolia* (L.) Lam. (Buddlejaceae) e *Schotia brachypetala* Sond. (Fabaceae), são usadas no tratamento de doenças neurodegenerativas [17]. O estudo dessas mesmas plantas assim como dos seus constituintes possibilitou descobrir que alguns dos seus fitoconstituintes apresentam actividade inibitória sobre a AChE. Assim foram isolados alguns compostos bioactivos constituintes dessas mesmas plantas e a partir dos mesmos procedeu-se à elucidação estrutural de uma série de novos fármacos promissores [33].

A partir de uma descoberta inicial do protótipo da fisostigmina (Figura 6A), um inibidor da AChE, obtido a partir da planta *Physostigma venenosum* (Figura 6B), foram encontradas outras moléculas com actividade muito significativa anti-colinesterase.

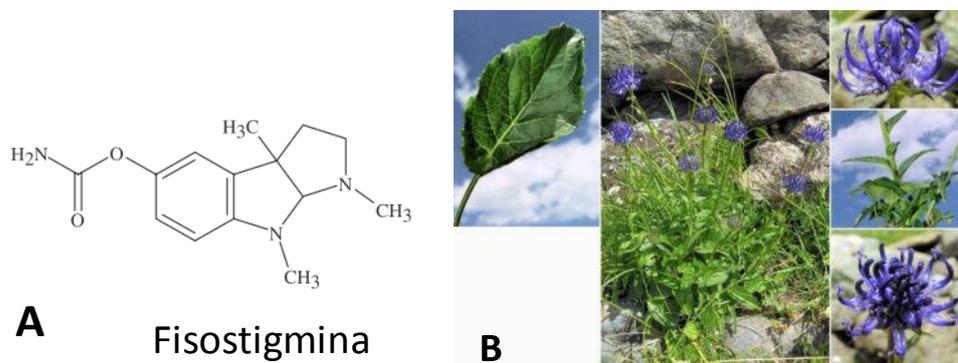


Figura 6: Estrutura química da fisostigmina (A) obtida a partir da planta *Physostigma venenosum* (B) (<http://www.luirig.altervista.org/naturaitaliana/viewpics.php?title=Physostigma+venenosum>)

A partir da estrutura química deste fitoconstituente, foi possível o desenvolvimento de um inibidor da AChE, a rivastigmina, que é autorizado, no Reino Unido, para o tratamento sintomático da AD leve a moderadamente grave. A rivastigmina (Figura 7) actua em áreas do cérebro relacionadas com a cognição, ao nível do córtex e do hipocampo, inibindo a AChE. Deste modo reconhece-se a importância de desenvolver novos possíveis medicamentos derivados de plantas apropriados para o tratamento de diversas doenças, em particular da AD [33].

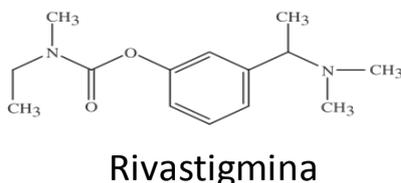
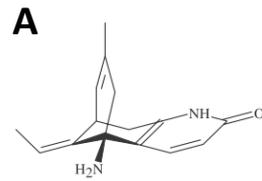


Figura 7: Estrutura química da rivastigmina

Partindo também da fisostigmina foram encontradas outras moléculas com actividade significativa anti-colinesterase como a huperzina-A (Figura 8A), a galantamina (Figura 9A), a viniferina-A (Figura 10A) e o ácido ursólico (Figura 11A) obtidos a partir da *Huperzia serrata* (Figura 8B), *Galanthus nivalis* e *Narcissus spp.* (Figura 9B e C), *Caragana chamlague* (Figura 10B) e *Origanum majorana* (Figura 11B), respectivamente [6, 33].

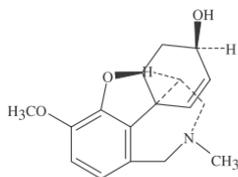
O trabalho com novos compostos bioactivos de plantas medicinais tem levado ao isolamento e elucidação estrutural de uma série de novos farmacofóros promissores [33].



Huperzina-A



Figura 8: Estrutura química da huperzina-A (A) obtida a partir da planta *Huperzia serrata* (B) (<http://www.vietnamnews.biz/tag/Been-Found>)

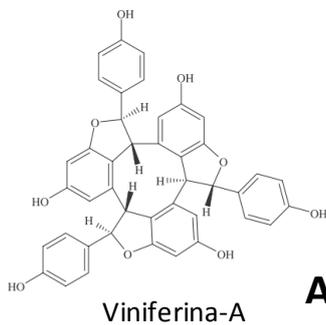


Galantamina

A



Figura 9: Estrutura química da galantamina (A) obtida a partir das plantas *Galanthus nivalis* (B) ([http://en.wikipedia.org/wiki/File:Illustration\\_Galanthus\\_nivalis0.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Illustration_Galanthus_nivalis0.jpg)) e *Narcissus spp Narciso* (C) (<http://ilchevpe.free.fr/Pages/Fleurs.htm>)

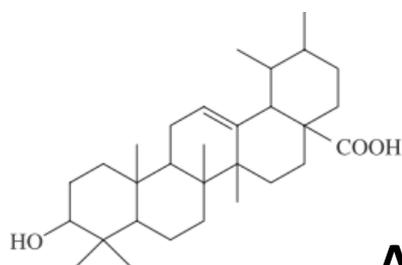


Viniferina-A

A



Figura 10: Estrutura química da Viniferina-A (A) obtida a partir da planta *Caragana chamlague* (B) (<http://www.weblio.jp/content/caragana+sinica>)



Ácido ursólico

A



Figura 11: Estrutura química do ácido ursólico(A) obtido a partir da planta *Origanum majorana* (B) (<https://sites.google.com/site/florasbs/lamiaceae/manjerona>)

Acredita-se que este tipo de compostos são benéficos, pois segundo Giacobini (2002), estes fármacos deverão interagir com a cascata amilóide, e de algum modo influenciar a expressão e/ou o processamento metabólico da APP e assim abrandar um dos principais passos patológicos do processo da doença [33].

A maioria dos estudos tem se concentrado em alcalóides anti-colinesterase, tais como a fisostigmina e a galantamina. Mas actualmente têm sido descritas outras classes principais de compostos como tendo actividade semelhante, que são os terpenóides, os glicosídeos e as cumarinas [33].

O termo etnobotânica foi estabelecido em 1895 pelo botânico norte-americano John Harshberger para descrever os estudos de "plantas utilizadas pelos povos primitivos e aborígenes". Porém em Portugal pouca ou nenhuma pesquisa científica etnobotânica teve lugar antes de 2000 [42].

Num estudo recente, foram testadas 10 plantas usadas no interior de Portugal para o tratamento de diferentes doenças e/ou utilizadas como condimentos. A maioria das plantas estudadas é usada para tratar "nervos" ou problemas relacionados, como ansiedade, insónia, anorexia ou a impotência sexual. Entre as plantas testadas, várias foram as que apresentaram tanto uma actividade inibitória da AChE como antioxidante. A *Hypericum undulatum*, *Melissa officinalis*, *Laurus nobilis* e *Lavandula pedunculata* mostraram valores elevados para ambos [23].

## 1.6 Biocatalisadores

Há já alguns anos que os enzimas assumiram um lugar de destaque tanto nas indústrias como nos laboratórios. Tal deve-se à sua capacidade de catalisar reacções com taxas de velocidade superiores 10-17 vezes comparativamente aos catalisadores tradicionais [44-46]. Estes valores devem-se com certeza à eficiente evolução destas macromoléculas face as condições fisiológicas a que são sujeitos, como uma estreita faixa de substratos naturais e normalmente baixas concentrações disponíveis. Por estes motivos, entre outros, os enzimas tornaram-se muito úteis na síntese de complexos e de moléculas de alto valor, especialmente de compostos para os quais as vias químicas são difíceis de implementar [44].

No entanto, é importante referir que na maioria dos casos os elevados valores de actividade, referidos anteriormente, são alcançados em condições de temperatura e pressão suaves, mas para muitas reacções são necessárias condições mais extremas. Sob estas condições os enzimas podem tornar-se instáveis e perder actividade [47]. De facto os valores de actividade alcançados são bastante superiores aos dos catalisadores químicos, contudo estes valores por norma são determinados sob as condições de reacção inicial e na presença de baixas concentrações de substrato, sendo assim negligenciado o fenómeno de inibição [48].

Tendo em conta as limitações indicadas existem 2 opções para tornar os enzimas bons biocatalisadores para os processos industriais. A primeira opção consiste na modificação do processo de síntese química, de modo a tornar alguns parâmetros mais suaves (temperatura, pH e solventes), devido à sensibilidade do enzima. A segunda opção recorre a metodologias de

evolução dirigida para gerar novos biocatalisadores capazes de funcionar sob as condições do processo. Esta opção conduz a processos mais robustos [48].

Há cerca de uma década, eram poucos os enzimas a partir de uma classe específica que estavam disponíveis, mas a evolução e a vulgarização de técnicas de evolução dirigida conduziram à descoberta de um número considerável de novos enzimas. Por exemplo, mais de 130 nitrilases foram descobertas em bibliotecas de DNA ambiental, em comparação com as menos de 20 nitrilases descritas anteriormente [49].

Apesar das inúmeras vantagens que os biocatalisadores apresentam, por vezes, as condições dos processos industriais sintéticos podem tornar o enzima instável ou inactivo, tais como variações de pH, temperatura e pressão extremas, o uso repetido ou prolongado, a presença de compostos solventes orgânicos que facilitam a solubilidade do substrato ou extracção do produto [39, 50, 51]. Deste modo, torna-se necessário o desenvolvimento de condições adequadas para a sua aplicação [49]. Um outro problema com que muitas vezes as indústrias se deparam é o elevado custo de aquisição/utilização dos biocatalisadores, sendo no entanto este um conceito muito relativo, já que a o custo de um processo de biocatálise não deve basear-se unicamente no custo do enzima. Uma análise deve ser efectuada com o intuito de verificar a razão custo/produção de produto [47, 52, 53].

Para ultrapassar todos estas “dificuldades”, há mais de 50 anos que se estudam e investigam métodos de imobilização, para reduzir os custos de utilização de enzimas em processos industriais, permitindo a sua recuperação e reutilização, tornando ainda o processo mais rentável e económico [47, 49, 54].

## 1.7 Imobilização de enzimas

Desde a sua descoberta que os enzimas têm sido utilizados como catalisadores em diversas áreas, e o seu uso é cada vez maior. As principais vantagens do uso de enzimas em transformações biocatalíticas são a sua quimio-, regio-, estereoespecificidade assim como as condições da reacção em que pode ser usado [22, 52, 55].

Com o intuito de ultrapassar os problemas mencionados anteriormente, propôs-se que a imobilização de um enzima num estado perto do seu ambiente natural, poderia resultar em enzimas por morna mais estáveis e eficientes [20]. Assim, hoje em dia recorre-se aos processos de imobilização, pois apresentam inúmeras vantagens como: [22, 42, 54-58]

- Maior estabilidade em condições extremas de temperatura, pH e solventes orgânicos
- Possibilidade de utilização repetida ou continuada
- Fácil separação e recuperação a partir da mistura de reacção
- Possibilidade de modulação das propriedades catalíticas
- Prevenção da contaminação por proteína no produto,
- Mais fácil prevenção de contaminações microbianas

Além disso, estes métodos foram largamente adoptados, pois à escala industrial, o uso de catalisadores sob estas condições apresentaram diversas vantagens relativamente aos

mesmos livres [22]. Os dois principais benefícios obtidos com a utilização de enzimas imobilizados encontram-se entre os mencionados anteriormente, e são a fácil separação do enzima do produto, e a reutilização do enzima. A fácil separação do enzima do produto do meio reaccional simplifica as aplicações de enzimas e permite uma reacção tecnológica mais confiável e eficiente. A reutilização do enzima fornece um número de vantagens relacionadas com o custo, que muitas vezes são um pré-requisito essencial para estabelecer um processo enzimaticamente catalisado, economicamente viável [59].

Num processo de imobilização, o ponto-chave em estudo pela maioria dos investigadores é o método de ligação entre um enzima e o respectivo transportador [54]. Existem na literatura imensos estudos sobre este assunto. Assim, existe como grande objectivo a identificação de um método de imobilização geral, que possa ser aplicado a uma grande variedade de enzimas.

Existem algumas técnicas de imobilização mais frequentemente utilizadas, as quais podem ser agrupadas em 4 categorias: [22, 54-57, 61]

- Adsorção ou deposição não covalente
- Ligação covalente a um transportador insolúvel
- Aprisionamento num gel polimérico, membrana ou cápsula
- Crosslinking enzimático com reagentes bifuncionais

Como se pode verificar pelo amplo leque de escolhas, a imobilização pode ser conseguida de muitas formas, afectando, no entanto, sempre a actividade do enzima até certo ponto. Dos métodos referidos, o aprisionamento é um dos mais simples, e por isso, resulta na mínima desnaturação do biocatalisador durante o processo de imobilização [22, 61].

A imobilização de formas insolúveis de enzimas em água é possível por métodos físicos e químicos. A imobilização física ocorre por via eletrostática, hidrofóbica ou interação topológica, na qual o enzima permanece quimicamente intacto. As técnicas químicas ligam o enzima covalentemente à matriz [20].

No início desta época o mais popular era a imobilização com eléctrodos, que possibilitavam a determinação de substratos específicos em análises clínicas. Foram inclusive produzidos muitos dispositivos de baixo custo, rápidos e sensíveis ao uso, graças à combinação de enzimas imobilizados com sensores electroquímicos. Contudo, a imobilização de material biológico é um passo crítico da construção de biosensores fiáveis [22].

A escolha do método de imobilização rege-se por algumas características e benefícios desejados no enzima imobilizado. A escolha é então baseada em propriedades do enzima e em propriedades do material de suporte (Figura 12), pois é a interacção destes dois componentes que permite que o enzima imobilizado apresente propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas. Entre todos os parâmetros a ter em conta, podem salientarem-se alguns, os quais são enumerados no Quadro 1 [59, 62, 63].

Antes da selecção de um método de imobilização, surge por vezes a dificuldade de identificar o enzima adequado para um determinado processo. Para esta identificação ser bem sucedida é necessário definir a sua especificidade de substrato e estereoselectividade. Quanto ao método escolhido, este deve ser simples e eficiente, apresentando um alto rendimento para permitir a abordagem combinatorial (teste simultâneo de diferentes suportes e diferentes condições), que muitas vezes é necessária para encontrar a preparação ideal de

imobilização. Estes parâmetros de escolha devem-se ao facto de as propriedades catalíticas de um certo enzima dependerem fortemente da conformação adquirida quando imobilizado (por exemplo, maior estabilidade térmica, estabilidade contra solventes orgânicos, enantioselectividade) [49].

Vários processos industriais fazem uso de enzimas imobilizados, no entanto, apesar do desenvolvimento de inúmeros protocolos e condições para a imobilização, a identificação do método adequado ainda é bastante empírica e requer um número considerável de experiências [49, 63].

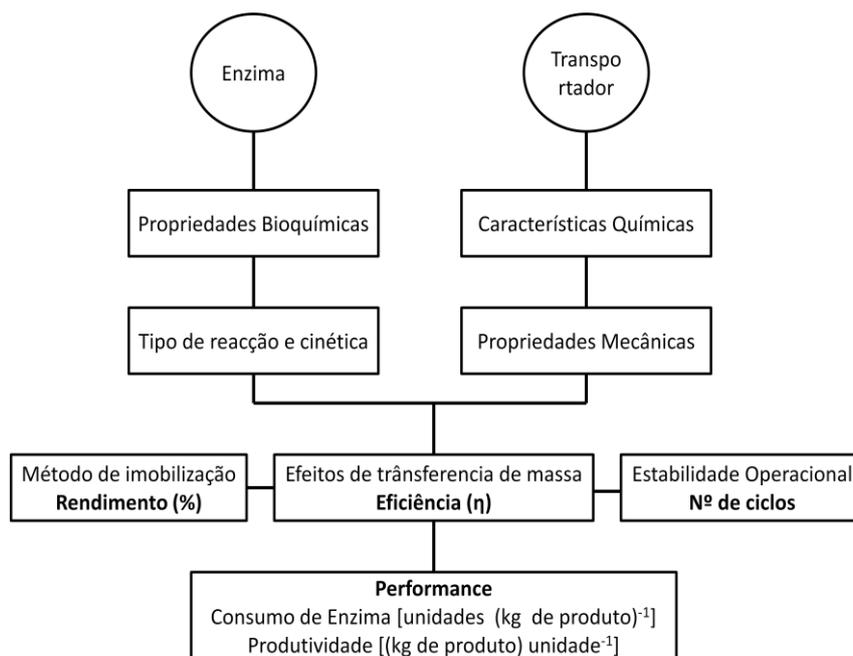


Figura 12: Representação esquemática dos parâmetros a determinar a quando da selecção de um método de imobilização. (Esquema adaptado da referência 59)

Enzimas imobilizados são actualmente objectos de interesse considerável por causa das suas vantagens sobre os enzimas solúveis ou tecnologias alternativas, e o grande aumento de aplicações para enzimas imobilizados. No entanto, investigações experimentais têm produzido resultados inesperados, como uma significativa redução ou mesmo um aumento na actividade do enzima comparativamente com os enzimas solúveis [59].

Tal como já foi referido, em grande parte dos casos, o principal objectivo a quando da utilização de processos de imobilização, prende-se com a minimização dos custos de produção. De modo a avaliar o processo, procede-se à determinação do rendimento da actividade do enzima imobilizado em relação à quantidade de enzima solúvel usado. Por norma, o rendimento é reduzido inicialmente devido aos efeitos de transferência de massa inerentes ao próprio processo de imobilização, mas na maioria dos casos a redução é ainda maior em consequência da diminuição da disponibilidade das moléculas de enzima dentro dos poros ou pela lenta difusão das moléculas de substrato. Tais limitações levam a uma baixa eficiência. No entanto, o aumento da estabilidade sob as condições de trabalho pode compensar tais inconvenientes, resultando num benefício global [59].

**Quadro 1: Esquematização das propriedades bioquímicas do enzimas, das características químicas do transportador e das interações entre ambas, a ter em conta a quando da selecção de uma método de imobilização** (Esquema adaptado da referência 59)

<b>Enzima</b>	<p align="center"><u>Propriedades Bioquímicas</u></p> <p>Massa Molecular, Grupos prostéticos, Grupos funcionais na superfície da proteína, pureza (inactivação ou função protectora das impurezas)          Parâmetros Cinéticos          Actividade Especifica, perfis de Temperatura e pH, Parâmetros cinéticos para activação ou inibição, Estabilidade vs pH e temperatura, solventes, contaminantes, impurezas</p>
<b>Transportador</b>	<p align="center"><u>Características Químicas</u></p> <p>Composição e base química, Grupos funcionais, Comportamento de swelling, volume de acessibilidade da matriz, Tamanho do poro, Estabilidade química do transportador          Propriedades Mecânicas          Diâmetro da partícula, comportamento de compressão de uma partícula única, Resistência do Fluxo (para aplicações de leito fixas), Velocidade de sedimentação (para leito fluidizado), Abrasão (para recipientes com agitação)</p>
<b>Enzima Imobilizado</b>	<p align="center"><u>Método de Imobilização</u></p> <p>Ligação da Proteína, Rendimento do enzima activo, Parâmetros cinéticos intrínsecos (i.e. propriedades livres dos efeitos de transferência de massa)          Efeitos de transferência de massa          Partição (concentrações diferentes de solutos dentro e fora das partículas catalíticas), difusão externa e interna (poros), isto dá a eficácia em relação ao enzima livre determinado sob as condições apropriadas da reacção          Estabilidade          Estabilidade operacional (expressa como decaimento da actividade sob as condições de trabalho), Estabilidade de Armazenamento          Performance          Produtividade (quantidade de produto formado por unidade de actividade ou massa do enzima), Consumo de enzima ( e.g. unidades por kg de produto)</p>

Para estimar as vantagens de custo dos enzimas imobilizados, é necessário olhar para as etapas de manufactura individualmente, e a sua contribuição para os custos em geral. Os custos do procedimento de imobilização podem aumentar ainda mais os custos de fabricação. Assim, deixando de lado a potencial vantagem da fácil remoção do enzima do produto, os enzimas imobilizados até à data não apresentam um benefício no custo. No entanto, a redução de custos é atingida pela repetida reutilização dos enzimas imobilizados. Em conclusão, só o uso repetido conduzirá a reduções dramáticas nos custos, e isto pode ser facilmente rastreado

através da monitorização da quantidade de enzima necessária por quilograma de produto formado (Figura 13). Os custos de enzima não devem ser maiores do que uma pequena percentagem dos custos de produção para o produto desejado [59].

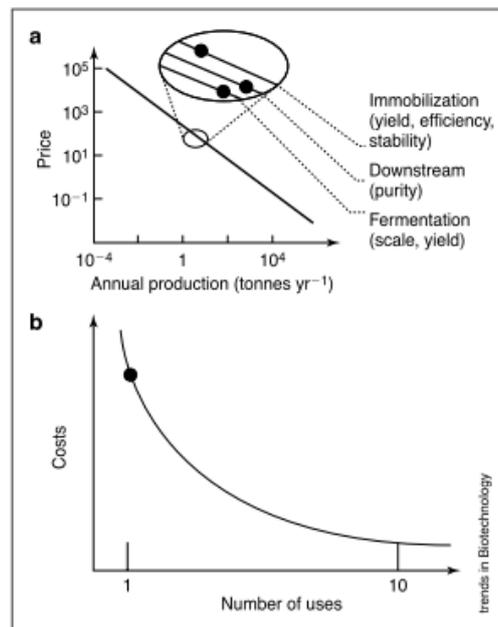


Figura 13: Custo de manufaturaç o para enzimas imobilizados (preço por grama de enzima) diminui à medida que a sua produção anual aumenta, grosseiramente ao longo de uma recta quando desenhada numa escala logarítmica (Imagem adaptada da referência 63)

### 1.7.1. Métodos de imobilização

Existem vários métodos de imobilização de enzimas, alguns mais antigos, outros mais recentes e os quais apresentam resultados mais satisfatórios.

Os métodos de imobilização variam desde a materiais transportadores pré-fabricados ao empacotamento de enzimas em cristais ou p s [59].

Como já foi referido, um dos factores mais importantes a ter em conta a quando da imobilização de um enzima é a reacção química estabelecida durante a reacção com o material de ligação, e   com base neste factor que   possível classificar os métodos de imobilização (Quadro 2) [59].

As primeiras técnicas datam da década de 1950, em que os enzimas eram intencionalmente retidos em compartimentos ou empacotados, e assim sujeitos a uma mobilidade restrita. Tal imobilização era conseguida pela inclusão em matrizes poliméricas ou pela ligação a materiais de suporte [59].

Em sistemas não aquosos, sob condições em que a desadsorção possa ser negligenciada, a imobilização por adsorção não-covalente pode ser muito útil, devido à baixa solubilidade dos enzimas nestes solventes (em sistemas aquosos, a desadsorção não pode ser negligenciada). Este método é amplamente utilizado para reacções de lipases imiscíveis em solventes aquosos. O uso de enzimas e proteínas adsorvidos   difundido em aplicações

comerciais devido à sua simplicidade [57, 59]. Este método é relativamente simples e economicamente acessível, não implica nenhuma modificação química no enzima, mas tem como grande limitação o facto de o enzima ter tendência a soltar-se, especialmente em solventes aquosos [57].

**Quadro 2: Quadro resumo dos principais métodos usados para imobilização de enzimas** (Quadro adaptado da referência 59)

<p><b>Ligação covalente</b>            Crosslinking            Ligação contra materiais transportadores pré-fabricados</p>
<p><b>Ligação Não Covalente</b>            Cristalização enzimática            Ligação por adsorção ou ligação iónica contra materiais transportadores            Dispersão de enzimas (e.g. Enzimas em pó em solventes orgânicos)</p>
<p><b>Inclusão</b>            Inclusão numa membrana            Incorporação em redes poliméricas            Separação por fases</p>

A imobilização é também alcançada pela simples dispersão de preparações enzimáticas secas. As lipases, em particular, podem ser imobilizadas com sucesso por este meio [59].

A ligação iónica é outra técnica simples de imobilização não covalente. Os enzimas podem ligar-se a biopolímeros polissacarídeos como o dextrano, a agarose e o quitosano. A ligação é reversível, e apesar das vantagens relacionadas com a capacidade de reutilização do suporte, a perda de proteína ligada apresenta-se como uma limitação [57].

Existe também o processo de imobilização através da retenção do enzima dentro de um dispositivo de membrana, como uma fibra oca, uma rede polimérica ou uma microcápsula, processo designado por inclusão. Na inclusão simples, não há necessidade de derivatização dos enzimas ou contacto com outra superfície e assim não é necessário ter em conta nenhum dos efeitos negativos das forças de ligação [59] e o enzima encontra-se protegido do ambiente externo [57]. No entanto, não há estabilização adicional como nas interações proteína-transportador [58], e a sua aplicação é limitada no que diz respeito à biocatálise de grandes substratos devido às limitações de transferência de massa [57].

O crosslinking de enzimas foi investigado exaustivamente durante a fase pioneira da imobilização de enzimas, por qualquer crosslinking de proteínas ou pela adição de materiais inertes. Este processo de imobilização é atractivo porque na preparação final, obtém-se proteína basicamente pura, com uma elevada concentração de enzima por volume [59]. Anteriormente, era preferida a ligação de enzimas a materiais transportadores pré-fabricados, mas mais recentemente o crosslinking de enzimas a cristais aparece como uma interessante alternativa [59].

O interesse por este método desvaneceu-se um pouco devido à baixa estabilidade mecânica e hidrodinâmica dos materiais proteicos, e assim outros métodos revelaram-se mais interessantes. Materiais transportadores dedicados, com grupos funcionais para ligações covalentes estão comercialmente disponíveis e estes contêm os requisitos químicos e mecânicos para os processos industriais, tanto seja em tanques agitados ou em reactores tubulares [59].

Entre os métodos de imobilização por ligação covalente destacam-se alguns mencionados de seguida.

O suporte comercial Eupergit (Evonik, anteriormente Degussa), uma esfera macroporosa, tem sido muito usado para este tipo de imobilização [57].

As Sepabeds apareceram como substituição do Eupergit. Consistem numa resina baseada em polimetilacrilato activada com grupos funcionais epóxido para a ligação com as proteínas. Apresentam uma maior superfície de ligação devido a fissuras na superfície, as quais também fornecem vantagens de protecção. A ligação ocorre por interacção iónica com os ácidos carboxílicos da proteína [57].

A é uma área de interessa para a imobilização de enzimas, mas no caso da biotecnologia industrial, a imobilização de enzimas em nanopartículas pode encontrar alguma dificuldade na recuperação por centrifugação ou filtração. Contudo, nanopartículas magnéticas podem permitir uma fácil recuperação [57].

A imobilização sem transportador é possível usando agentes reticuladores bifuncionais, como o glutaraldeído, para estabelecer a ligação entre as moléculas de enzima sem recorrer a um suporte.

Biocatalisadores fisicamente mais fortes podem ser produzidos por crosslinking, quando as moléculas de enzima estão próximas, o que acontece quando se encontram sob a forma de cristais. Enzimas cross-linked em cristais (CLECs) são comercializados pela Altus Biologics. O tamanho das partículas varia de 1 a 100  $\mu\text{m}$  apresentam uma estabilidade mecânica elevada (em parte devido à estabilidade inata fornecida pela cristalização), e tem capacidade de funcionar em solventes orgânicos. Como cada cristal contem apenas uma molécula de enzima este método previne contaminações. Todavia, a formação de CLECs requer elevada purificação de proteínas e este método só funciona com enzimas cristalizáveis e só permitindo a incorporação de um tipo de enzima. Além disso, tem como grande desvantagem ser um processo dispendioso [57].

Um método mais acessível de crosslinking de enzimas, que tira partido da proximidade de moléculas, consiste na simples precipitação da proteína permitindo a formação de partículas de 50-100  $\mu\text{m}$  de agregados de enzima crosslinked (CLEAs). Os CLEAs foram desenvolvidos no laboratório de Sheldon e são comercializados pela CLEA Technologies (Holanda). A etapa de precipitação pode ser controlada permitindo melhor rendimento, produtividade e estabilidade. No caso de enzimas multiméricos pode ocorrer alguma dissociação conduzindo à perda de enzima e de actividade. Para algumas aplicações pode ser necessário o uso de suportes físicos para aumentar a rigidez [57].

Por diversos motivos, tem se verificado uma revolução ao nível dos métodos de imobilização. Essencialmente para atender a requisitos industriais, os principais métodos tem sido utilizados em larga escala, mas por outro lado, também se tem verificado a redução de escala à dimensão microarray. Tendo em vista o aumento de escala, várias são as técnicas que

podem ser usadas, com a única limitação da escala eficaz do processo e do manuseamento de reagentes perigosos à escala industrial. Quanto à redução de escala, a prática de microarrays é já muito rotineira. A este processo, segue-se na maioria das vezes a fixação da proteína à superfície, a qual é por norma conseguida pela simples deposição sobre uma superfície de sílica modificada com aldeído, níquel, grupo amina, estreptavidina ou metades tioéster.

Como mencionado, grande parte dos processos de imobilização tem sido adaptados à microescala, especialmente à escala das microplacas (MTP) de 96 poços. Esta escala possibilita que sejam testadas não só as propriedades catalíticas de múltiplas variantes de um derivado de enzimas industriais, num volume reduzido, mas também permite a adaptação de um processo de imobilização conveniente a um enzima específico. Com a adaptação a esta escala é possível testar uma ampla gama de materiais de transporte e procedimentos diferentes, e determinar quais as melhores condições para cada biocatalisador [49].

Tendo em conta o mencionado, a adaptação dos métodos de imobilização à escala da das MTP permite uma identificação fácil e rápida de métodos adequados, tendo em conta a economia de reagentes e solventes. Além disso, o uso de um ensaio de síntese fornece informações directas sobre a utilidade de um dado enzima livre/imobilizado [49].

Vários foram os métodos testados por vários autores, adaptados a esta escala. Por exemplo, segundo o trabalho de Bettina Brandt, et al, em que foram usadas esterases recombinantes como enzimas modelo, foram testados métodos como a adsorção (adsorção em Accurel EP100), a co-precipitação (proteínas revestidas de microcristais (PCMC)), a ligação covalente por agregação (CLEAs) e a imobilização em Eupergit. A proteína coberta de microcristais comprova ser o melhor método quanto ao rendimento e actividade expressa em relação à reacção de teste [49].

## 1.8 Activação das microplacas

Na maioria dos métodos de imobilização em MTP (Figura 14A), para que o processo seja realizado com sucesso, é necessário proceder-se à prévia activação do material inerte de construção das mesmas. As placas mais rotineiras são feitas de um polímero (Figura 14B), o poliestireno (PS).

A imobilização de substâncias biológicas em superfícies de PS é governada por vários factores. Actualmente, há um esforço de a mesma ser conseguida recorrendo a vários reagentes [60]. A funcionalização dos poços é necessária para a ligação dos enzimas, e por norma, recorre-se ao uso de agentes de silanização [58].

Existem muitos métodos capazes de imobilizar enzimas em matrizes contendo grupos amina. A maioria desses métodos são baseados no tratamento das matrizes com glutaraldeído (GA) levando à formação de uma base de Schiff [58, 67-69].

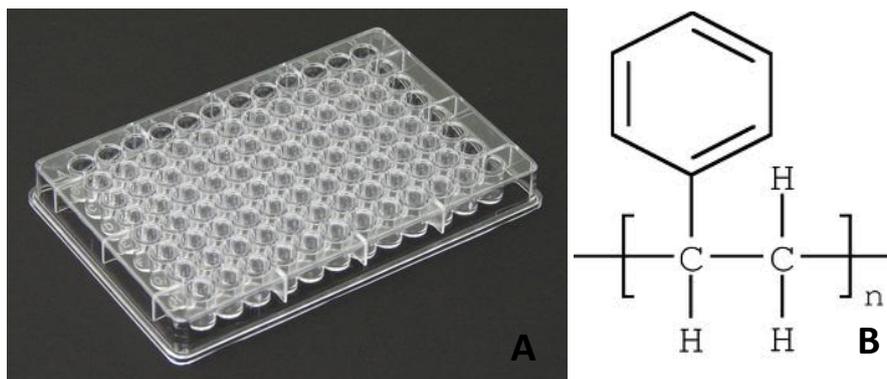


Figura 14: Imagem ilustrativa de uma microplaca de 96 poços (A) e estrutura química do poliestireno (B).

A metodologia é bastante simples e eficiente e, em alguns casos, permite mesmo que se melhore a estabilidade do enzima por imobilização de múltiplos pontos ou por imobilização de várias subunidades. Além disso, o GA, também tem sido muito usado para introduzir crosslinking intermolecular em proteínas ou para modificar as proteínas adsorvidas em suportes aminados [66, 67].



Figura 15: Estrutura química do glutaraldeído

O GA, um dialdeído linear de 5 carbonos (Figura 15), é um líquido solúvel em todas as proporções em água e álcool, bem como em solventes orgânicos. Tem tido grande sucesso devido à sua disponibilidade comercial e baixo custo além de sua alta reactividade. Reage rapidamente com os grupos amina a pHs próximos do neutro [38] e é mais eficiente que outros aldeídos na geração de crosslinks térmica e quimicamente estáveis [67].

A activação com GA é relativamente simples, sendo efectuada a ligação de uma ou duas moléculas de GA por grupo amina primário, sendo preferencial a formação de dímeros de GA, pois são capazes de imobilizar proteínas rapidamente através de uma ligação covalente directa, enquanto o GA monómero gera uma taxa de imobilização muito baixa. No entanto, a quantidade de GA introduzido no suporte deve ser limitada de modo a evitar uma polimerização não controlada do GA [66, 67].

A estrutura exacta do GA no suporte ainda é um tópico em discussão, mas dada a alta estabilidade da ligação grupo amina-GA, a formação de algum tipo de ciclo parece ser uma possibilidade [66, 67].

## 1.9 Ensaio de Actividade

Vários têm sido os compostos provenientes de fontes naturais, testados quanto à sua actividade inibitória em relação à AChE. A sua triagem é conseguida com base nas reacções de Ellman [67]. A determinação tem sido efectuada recorrendo a técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, as quais se baseiam em dois métodos principais, o método de cromatografia em camada fina e o ensaio em microplacas, os quais mostram ser os mais úteis [8, 33].

Quanto ao ensaio em microplacas, o procedimento descrito é baseado no ensaio genérico relatado por Ellman et al., adaptado para uso em microplacas. Neste método, as colinesterases catalisam a quebra da acetilcolina (ACh), um substrato artificial, em acetato e tiocolina. A actividade do enzima é medida por detecção espectrofotométrica (a 405 nm) do aumento da cor amarela do 5-tio-nitrobenzóico (TNB) produzido a partir da tiocolina quando reage com os iões 5,5'-bis-Ditio-2-nitrobenzoato (DTNB). Tendo em conta que para este ensaio se verifica uma variação da actividade, expressa como taxa de variação de OD, em função de pH (Figura 16), foi seleccionado o pH 8,0 como sendo o pH mais apropriado para a solução tampão [8, 34].

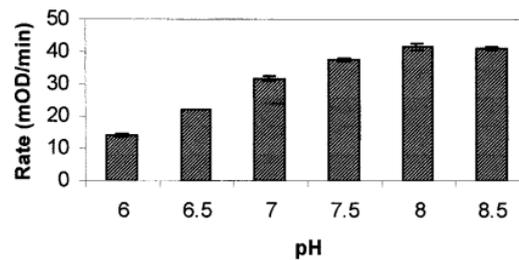


Fig. 1. The effect of pH on the rate of acetylcholine iodide hydrolysis (mOD/min) in *C. riparius*.

**Figura 16: O efeito do pH na taxa de hidrólise da acetilcolina (mOD/min) em *C. riparius* (imagem adaptada da referência 34)**

## **2. OBJETIVO**

A Doença de Alzheimer é o resultado de um conjunto complexo de alterações bioquímicas existentes no cérebro, muitas das quais permanecem ainda por descobrir. Actualmente, uma melhoria dos doentes é conseguida com base na inibição do enzima acetilcolinesterase possibilitando deste modo a presença do neurotransmissor, acetilcolina, na fenda sináptica. Os inibidores deste enzima são também aplicados no tratamento de algumas doenças do foro gastrointestinal. Com base, em estudos de investigação já realizados, sabe-se que alguns “chás” de plantas tradicionais portuguesas possuem uma acção inibitória sobre o enzima em questão. Deste modo, pretende-se, numa fase futura, estudar a inibição da AChE por estes “chás”. O teste utilizado para a determinação da actividade inibitória recorre a substratos corados que possibilitam o doseamento da actividade enzimática por métodos espectrofotométricos. No entanto, após cada ensaio o enzima utilizado é deitado fora sem hipóteses de reaproveitamento. É sabido que quando um enzima está imobilizado numa superfície sólida é facilmente recuperado após a sua utilização, muitas vezes ficando com estabilidade prolongada relativamente ao enzima livre. Assim, pretende-se com este trabalho testar diversos métodos de imobilização em microplacas, de modo a encontrar um que seja adequado para o enzima em estudo, que apresente uma elevada actividade e que se já estável de modo a que seja possível a realização de vários ensaios de actividade com a mesma microplaca.

Com este trabalho pretendia-se testar vários métodos de imobilização em microplacas, tendo-se seleccionado os seguintes:

- Imobilização directa com GA
- Imobilização com APTES
- Imobilização em Ion Jelly®
- Imobilização com placas aminadas
- Imobilização em superfícies fotoactivadas
- Imobilização com APTES e quitosano

Entre os métodos testados pretendia-se seleccionar os mais eficazes e realizar estudos de estabilidade e proceder ao doseamento proteico dos sobrenadantes por diversos métodos (directo, método de BCA e método de Bradford) para validar o processo de imobilização. Para caracterizar o enzima existia a necessidade de determinar os perfis de temperatura e pH para o enzima e reacção em estudo.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 3.1 Materiais e Reagentes

O Iodeto de Acetilcolina (Iodeto de [2-(acetiloxi)etil]trimetilamónia, AChI), a Acetilcolinesterase (AChE), purificada da *Electrophorus electricus* (electric eel), o ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), o tampão HEPES (Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico), o tetraborohidreto de Sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), Aprox 98%, a Albumina do Soro Bovino (BSA), minimum 98% electrophoresis e o reagente de Bradford foram adquiridos à Sigma. O Quitosano, massa molecular 100,000 - 300,000, e o Glutaraldeído (GA) foram adquiridos à ACROS. O Cloreto de Magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) e o Cloreto de Sódio (NaCl) foram adquiridos à FAGRON. O Cloreto de Magnésio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e a gelatina foram adquiridos à PANREAC. A Etanolamina foi adquirida à MERCK. O (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES), o 1-fluoro-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB) e o Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazol ( $\text{EMIM EtSO}_4$ ) foram adquiridos à SIGMA-ALDRICH. O  $\text{BCA}^{\text{TM}}$  Protein Assay Kit foi adquirido à Thermo Scientific. As microplacas de 96 poços de PS (Immobilizer<sup>TM</sup> plates, Nunc) e as microplacas de 96 poços com superfície aminada (Immobilizer<sup>TM</sup> plates, iNunc) foram adquiridas à VWR.

## 3.2 Procedimentos

### 3.2.1 Preparação das soluções

Foi preparada uma solução de tampão HEPES 50 mM, pH 8,0 em água destilada. A partir desta solução preparou-se um outro tampão com maior força iónica, tampão HEPES 50 mM, pH 8,0 com NaCl 50 mM e  $\text{MgCl}_2$  20 mM (ou  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ).

A solução de DTNB foi preparada dissolvendo 30 mg da mesma em 25 mL de tampão HEPES com NaCl e  $\text{MgCl}_2$ .

A solução de AChI preparou-se em água destilada, dissolvendo inicialmente 43,5 mg em 10 mL de água destilada (solução stock). Esta solução foi diluída, sendo preparada a solução usada nos ensaios, adicionando a 75  $\mu\text{L}$  de solução stock, 975  $\mu\text{L}$  de água destilada.

Todas as restantes soluções usadas ao longo do estágio, salvo indicação contrária foram preparadas em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0.

### 3.2.2 Ensaio de Actividade

#### 3.2.2.1 Preparação das soluções enzimáticas

Durante todo o projecto foi utilizada uma solução stock de AChE (designada AChE – 50 U/mL). Esta solução foi diluída 10x em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0 dando origem à solução MD (5 U/mL). A partir desta solução (MD) foram criadas as diluições utilizadas nos ensaios de imobilização e actividade. Foram criadas as soluções: DL 2 (diluição de 2x – 2,5 U/mL); 2X DL 5

(diluição de 2,5x – 2 U/mL); DL 5 (diluição de 5x – 1 U/mL) e DL 10 (diluição de 10x – 0,5 U/mL). Todas estas soluções foram diluídas em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0.

### **3.2.2.2 Ensaio de Actividade em Cuvettes**

O ensaio de actividade para o enzima livre, em cuvettes, baseia-se na metodologia descrita em [66]. Consiste na adição à cuvette de 100  $\mu$ L de amostra (que são substituídos por tampão no caso de não existir nenhuma amostra a testar). Segue-se a adição de 25  $\mu$ L de tampão HEPES 50 mM, pH 8,0 e 25  $\mu$ L AChE. Deixa-se incubar durante 15 min (este tempo pode ser excluído se não existir amostra a testar). Adicionam-se de seguida 75  $\mu$ L AchI e imediatamente 475  $\mu$ L DTNB. Segue-se a conversão da AchI em colina e acido acético espectrofotometricamente, pela leitura da absorvência a 405 nm, durante 5 min com leituras de 30 em 30 s, à temperatura ambiente (RT).

### **3.2.2.3 Adaptação do Ensaio de Actividade a microplacas**

Para os ensaios de actividade em microplacas de PS de 96 poços, procedeu-se a uma adaptação do protocolo para cuvettes. Com o intuito de atingir os melhor valores de actividade, testaram-se vários ensaios com variação dos volumes de reagentes (Ensaio  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ). Os volumes de tampão testados foram de 50, 100 e 150  $\mu$ L. Para o enzima testaram-se 10 e 15  $\mu$ L. Para a AchI foram testados 10, 20, 30 e 50  $\mu$ L e para o DTNB os volumes de 50, 100 e 150  $\mu$ L. Seleccionou-se o ensaio  $\gamma$  como sendo o melhor. Este ensaio tem como volumes 150  $\mu$ L de tampão, 15  $\mu$ L de AChE, 30  $\mu$ L de AchI e 150  $\mu$ L de DTNB. A leitura de absorvência efectuou-se como mencionado anteriormente para o ensaio de actividade em cuvettes.

## **3.2.3 Ensaio de caracterização**

### **3.2.3.1 Perfil de Temperatura do enzima**

Com o objectivo de verificar qual o comportamento do enzima face a variações de temperatura, realizaram-se vários ensaios de actividade, sendo o enzima sujeito à incubação a determinadas temperaturas, num banho durante o tempo necessário a que a temperatura desejada seja atingida e estabilize. As temperaturas estudadas foram de 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 60°C. A reacção de actividade decorreu à RT.

### 3.2.3.2 Perfil de Temperatura da reacção

Com este teste pretendia-se verificar de que modo, a reacção em estudo era alterada com a variação da temperatura. Incubaram-se então todos os reagentes (tampão, AChE, AchI e DTNB) às temperaturas de interesse durante o período de tempo necessário para atingir a temperatura desejada. Foram testadas temperaturas entre os 20°C e os 45°C. cada um dos ensaios de actividade foi efectuado à respectiva temperatura em análise.

### 3.2.3.3 Perfil de pH do Enzima e da reacção

Também foi analisado o efeito das variações de pH sobre o enzima e sobre a reacção. Deste modo foram preparadas soluções de enzima e de tampão a diferentes pHs. Foram ensaiados os pHs 6, 7, 7.5, 8, 8.5, 9 e 10. O ensaio de actividade foi realizado à RT.

## 3.2.4 Métodos de imobilização

Foram testados vários métodos de imobilização em microplacas com o objectivo de atingir o melhor valor de actividade possível.

### 3.2.4.1 Imobilização directa com GA

O 1º método testado, consiste na imobilização directa com Glutaraldeído (GA), tendo por base a referência [71].

Adicionam-se inicialmente, a cada poço 200 µL de GA 2,5 % e deixa-se incubar por um período mínimo de 2h. De seguida lavam-se os poços com tampão. Aplica-se a solução de enzima (100- 200 µL/poço). Deixa-se incubar durante o período mínimo de 18h, a 4°C (é aconselhada incubação durante a noite). No dia seguinte recolhem-se os sobrenadantes, para estudos posteriores de doseamento proteico e de rendimento de imobilização. Lavam-se os poços com tampão e por fim realiza-se o ensaio de actividade de acordo com o ensaio  $\gamma$  indicado anteriormente.

### 3.2.4.2 Imobilização com APTES

O 2º método testado, consiste na modificação da superfície da placa com uma solução de ácidos e com 3-aminopropiltriétoxissilano, seguida de incubação com GA, tendo por base o protocolo referenciado em [72].

Inicialmente prepara-se uma solução fresca de  $\text{HNO}_3$  47% (v/v) em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, num recipiente de vidro, numa hotte. Aplicam-se 250  $\mu\text{L}$  de solução ácida a cada poço e deixa-se incubar por 30 min, à RT. Lava-se a placa, duas vezes com água destilada. De seguida prepara-se uma solução de APTES 5% em água destilada (pH 6.9) e aplicam-se 250  $\mu\text{L}$  de APTES a cada poço. Deixa-se incubar por 2h, à RT. Lava-se a placa, duas vezes com água destilada e leva-se a curar a 62°C, por 2h para aumentar a ligação do APTES. Prepara-se depois uma solução de GA 2,5% em tampão. Aplicam-se 250  $\mu\text{L}$  da solução de GA a cada poço e deixa-se incubar por 2h, à RT. Lavam-se os poços, duas vezes com tampão e aplica-se a cada um, 200  $\mu\text{L}$  de solução de enzima. Deixa-se imobilizar durante a noite e no dia seguinte recolhem-se os sobrenadantes. Lavam-se os poços duas vezes com tampão e por ultimo realização o ensaio de actividade.

### 3.2.4.3 Imobilização em Ion Jelly

Em 3º lugar foi testado um método que consiste na imobilização com líquidos iónicos e gelatina, de acordo com o protocolo indicado em [73], levando à formação de um *Ion Jelly*®.

Inicialmente pesam-se e taram-se 2 tubos para a realização de dois ensaios com diferentes condições de imobilização (Ensaio 1 – enzima incorporado; Ensaio 2 – enzima à superfície). De seguida pesam-se os tubos com 0,5 mL de líquido iónico, etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazol (EMIM EtSO<sub>4</sub>) e incubam-se a 60°C durante 15 min. Segue-se a adição a cada tubo de 200 mg de gelatina e a incubação a 60°C durante 30 min. Depois adiciona-se ao tubo 1, 382,5  $\mu\text{L}$  de tampão e 600  $\mu\text{L}$  ao tubo 2 e deixa-se incubar a 60°C durante 30 min a 1h. Deixa-se arrefecer até 30/35°C e ao tubo 1, adicionam-se 217,5  $\mu\text{L}$  de enzima. Aplica-se em placas diferentes, 50  $\mu\text{L}$  em cada poço, respectivamente as soluções dos tubos 1 e 2. Deixam-se curar as placas a 4°C durante 3 dias, numa câmara saturada com NaCl. Após este período, realiza-se o ensaio de actividade enzimático para a placa 1. À placa 2, a cada poço adicionam-se 15  $\mu\text{L}$  de enzima e deixa-se curar a placa 2, novamente durante 3 dias, a 4°C, numa câmara saturada com NaCl. Por fim realiza-se o ensaio de actividade enzimática para a placa 2.

### 3.2.4.4 Imobilização em Placas aminadas

O 4º método testado, recorre à imobilização com GA usando placas modificadas, com uma superfície aminada, tendo por base a referência [74].

Inicialmente sujeita-se a placa aminada a um tratamento de activação com GA 2,5%, sendo aplicados 150  $\mu\text{L}$  desta solução a cada poço. Deixa-se actuar por 2h, à RT e de seguida lava-se com água destilada (DDW). Adicionam-se depois 150  $\mu\text{L}$  de enzima por poço e deixa-se incubar à temperatura apropriada (4°C) por 2h. Recolhem-se os sobrenadantes e lava-se com tampão. Adicionam-se 150  $\mu\text{L}$  de agente bloqueador (Etanolamina) e incuba-se por 2h, à RT. Lava-se com tampão e realiza-se o ensaio de actividade.

### 3.2.4.5 Imobilização em superfícies fotoactivadas

O 5º método testado, a imobilização é levada a cabo em superfícies fotoactivadas, recorrendo ao composto 1-fluoro-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB) para activar o poliestireno das microplacas, tendo por base o protocolo adaptado das referências [75, 76].

No primeiro passo, aplica-se a cada poço 10  $\mu\text{mol}$  FNAB/50  $\mu\text{L}$  de metanol e deixa-se que o etanol evapore à RT, no escuro. De seguida, expõe-se a placa à luz UV, durante 20 min ao comprimento de onda de 365 nm. Lavam-se os poços com metanol, e deixam-se secar para depois usar. Incuba-se a placa com enzima, 100  $\mu\text{L}$  por poço, durante 45 min, 3h e 12h e por fim realiza-se o ensaio de actividade.

### 3.2.4.6 Imobilização com Quitosano

O 6º método testado, utiliza também para o processo de imobilização o GA, no entanto recorre à utilização de um espaçador, o quitosano, seguindo o protocolo apresentado em [77].

As placas são inicialmente incubadas com GA 2.5% em tampão, à temperatura ambiente durante 15 min e depois lavadas com tampão. Incubam-se de seguida com quitosano 1% em HAc (ácido acético) (1 vol conc HAc+99 vol H<sub>2</sub>O) durante 60 min a 4°C e lavam-se com água e com tampão. Bloqueiam-se os locais de ligações não específicos, incubando a placa, por 2h a 4°C, com uma solução de BSA 2% em tampão. Lava-se o excesso de solução bloqueante com tampão e repete-se a incubação com GA 2,5%, durante 2h à temperatura ambiente. Lava-se com tampão e incuba-se com 100  $\mu\text{L}$  de enzima por poço, a 4°C durante o mínimo de 2h (de preferência durante toda a noite). No dia seguinte, recolhem-se os sobrenadantes e lava-se com tampão. Incuba-se de seguida, por 60 min, à RT com NaBH<sub>4</sub> 0.1M em tampão. Lava-se por fim, a placa sequencialmente com H<sub>2</sub>O, NaCl 0,1M em tampão contendo Tween 20 0,5% (v/v), e tampão e realiza-se o ensaio de Actividade.

### 3.2.4.7 Imobilização com APTES e Quitosano

O último e 7º método testado, consiste numa fusão do 2º método e do 6º método, isto é, a placa foi modificada com APTES (método 2) [72] mas foi também utilizado o espaçador quitosano (método 6) [77]. A imobilização foi efectuada recorrendo ao GA como agente de crosslinking.

Tal como no método 2, inicialmente prepara-se uma solução fresca de HNO<sub>3</sub> 47% (v/v) em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, num recipiente de vidro, numa hotte e aplicam-se 250  $\mu\text{L}$  de solução ácida a cada poço. Incuba-se por 30 min, à temperatura ambiente (RT) e lava-se a placa, duas vezes com DDW. Prepara-se uma solução de APTES 5% em água destilada (pH 6.9) e aplicam-se 250  $\mu\text{L}$  de APTES a cada poço. Deixa-se incubar por 2h, à RT. Lava-se a placa, duas vezes com água destilada e leva-se a curar a 62°C, por 2h para aumentar a ligação do APTES. Depois

incuba-se com quitosano 1% em HAc (ácido acético) (1 vol conc HAc+99 vol H<sub>2</sub>O) durante 60 min a 4°C. Lava-se com água e com tampão. Prepara-se depois uma solução de GA 2,5% em tampão e aplicam-se 250 µL de GA a cada poço. Deixa-se incubar por 2h, à RT. Lavam-se os poços, duas vezes com tampão. Segue-se a aplicação a cada poço de 200 µL de solução de enzima e a imobilização durante a noite. No dia seguinte, recolhem-se os sobrenadantes e lava-se a placa duas vezes com tampão. É preparada depois uma solução de NaBH<sub>4</sub>, 0.1 M em tampão e aplicados 250 µL a cada poço. Deixa-se incubar durante 1h à RT. Lava-se a placa 2 vezes com tampão e por fim realiza-se o ensaio de actividade.

Para este método foram testadas 2 versões do mesmo, uma primeira em que o ensaio de actividade foi realizado imediatamente após a recolha dos sobrenadantes e respectiva lavagem (método 7.1). Para a segunda versão deste método, o protocolo foi todo realizado na íntegra (método 7.2).

### 3.2.5 Ensaio de estabilidade

#### 3.2.5.1 Do Enzima livre

A estabilidade do enzima livre, conservado a -20°C foi avaliada, sendo realizados ensaios de actividade enzimática da solução-mãe (AChE D), de modo a confirmar que o enzima permanecia activo.

#### 3.2.5.2 Do enzima imobilizado

De modo a verificar a estabilidade da actividade do enzima imobilizado, as microplacas onde foi realizado o ensaio de imobilização foram conservadas a 4°C, com os poços cheios de tampão. E o ensaio de actividade foi realizado inicialmente de 3 em 3 dias, durante 1 mês. Após esse, período as leituras foram espaçadas a 1 por semana. E sendo o intervalo de tempo entre as ultimas leituras já de 1 mês.

### 3.2.6 Doseamento Proteico

Os sobrenadantes recolhidos dos ensaios de imobilização foram testados de modo a poder determinar a quantidade de proteína em solução, e assim ser possível calcular a percentagem de enzima efectivamente imobilizado.

#### 3.2.6.1 Doseamento directo

Inicialmente a quantidade de proteína foi detectada directamente, por leituras espectrofotométricas a 280 nm, comprimento de onda de absorção de compostos proteicos.

### 3.2.6.2 Doseamento pelo método do BCA

O doseamento proteico foi depois realizado através do método do BCA recorrendo a um Kit comercial existente, que tem como proteína padrão a BSA.

O método consiste na adição a cada poço de 25 µL de amostra e 200 µL de reagente de trabalho (WR). Agita-se a placa 30 s e incuba-se a 37°C durante 30 min. Depois deixa-se arrefecer à RT e lê-se a absorvência a 562 nm.

A curva padrão é obtida através da realização do mesmo ensaio anterior, aplicado a uma série de padrões preparados a partir da solução-mãe de BSA, de acordo com a tabela seguinte.

Para preparar o WR, mistura-se 50 partes do reagente BCA A com 1 parte do reagente BCA B (50:1, Reagente A:B). É necessário ter em atenção que quando o reagente B é adicionado ao reagente A, a solução parece turba, sendo necessária uma ligeira agitação para a obtenção de uma mistura verde clara. Para determinar o volume total de WR necessário utiliza-se a seguinte equação:

Volume de WR necessário = (# controlos + # padrões + # amostras) × (# replicados) × (volume de WR por poço)

### 3.2.6.3 Doseamento pelo método de Bradford

Por último o doseamento proteico foi levado a cabo pelo método de Bradford com na referência [78].

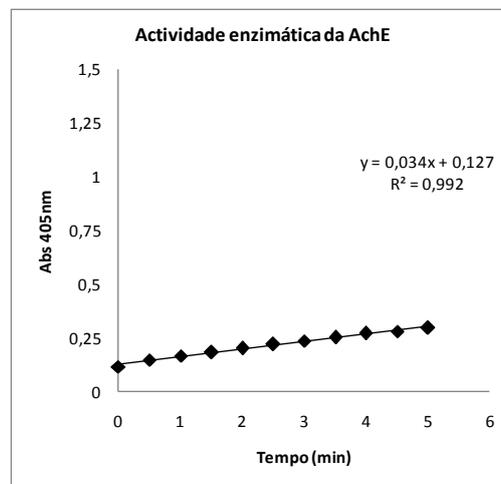
O método consiste em adicionar, por poço 30 µL de amostra com 100 µL de reagente de bradford. A placa é agitada e incubada durante 10 min. Depois lê-se a absorvência a 595 nm. É necessário ter em conta que todo o material que teve contacto com o reagente de bradford deve ser inicialmente lavado com etanol e só depois com água.

## **4.RESULTADOS**

## 4.1 Ensaio de Actividade em cuvettes

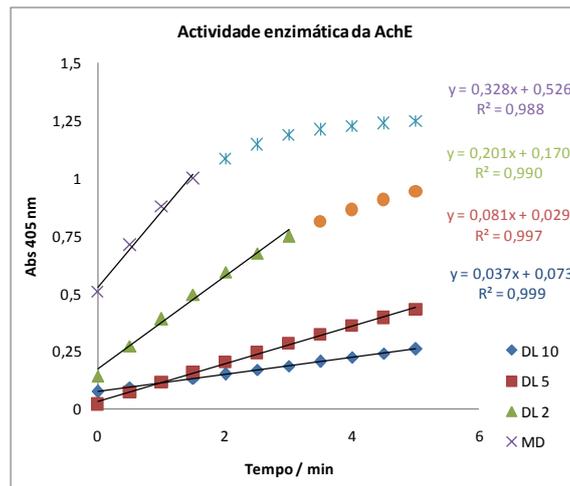
Nesta primeira etapa tinha-se como objectivo testar o ensaio de actividade assim como verificar o valor de actividade alcançado com a solução enzimática em estudo. É necessário, no entanto, ter em conta que o valor pretendido de actividade (declive) é de 0,1 UA/min.

O ensaio de actividade foi efectuado de acordo com o método mencionado anteriormente, no capítulo 3.2.2.2 da secção de métodos. A solução enzimática testada foi a mais diluída, DL 10, uma vez que, de acordo com estudos preliminares, se julgava obter o valor pretendido com esta solução.



**Figura 17: Actividade enzimática da AChE, em UA/min.** Representação da actividade enzimática da AChE DL 10 (Absorvência a 405 nm em função do tempo) em cuvettes.

Como se pode verificar pela Figura 17, o valor de actividade alcançado ficou aquém do pretendido. Por isso, procedeu-se ao ensaio de actividade de outras diluições de modo a encontrar uma que apresente a actividade enzimática necessária. Foram testadas as diluições MD; DL2; DL5 e novamente a DL10.



**Figura 18: Actividade enzimática da AChE, em UA/min.** Representação gráfica da actividade enzimática da AChE (Absorvência a 405 nm em função do tempo) em cuvettes. Foram testadas as soluções MD, DL 2, DL 5 e DL 10.

De acordo com os resultados obtidos para as 4 diluições testadas (Figura 18), seleccionaram-se duas delas como sendo aquelas que satisfazem as condições iniciais pretendidas, uma actividade próxima de 0,1 UA/min. Foram seleccionadas as diluições DL2 e DL5, com preferência para a DL5.

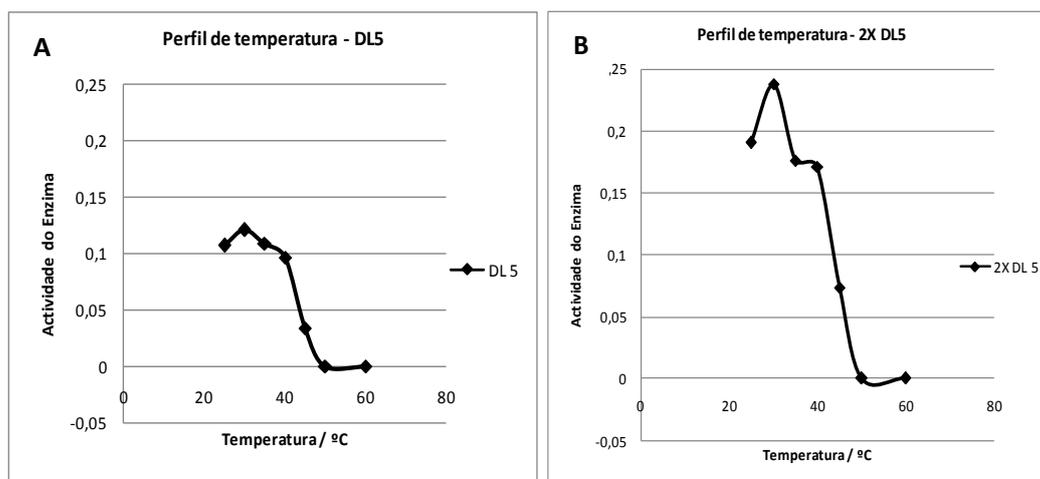
## 4.2 Ensaios de caracterização

De modo a completar este trabalho e a seleccionar as melhores condições para o ensaio de actividade foram traçados os perfis de temperatura e pH tanto do enzima como da própria reacção de actividade.

Estes perfis foram determinados numa fase intermédia do estágio, na qual já se havia decido que as duas diluições enzimáticas mais apropriadas para os ensaios de imobilização e respectiva reacção de actividade seriam as soluções DL 5 e 2X DL 5 (diluições referidas no capítulo dos métodos 3.2.2.1).

### 4.2.1 Perfil de Temperatura do Enzima

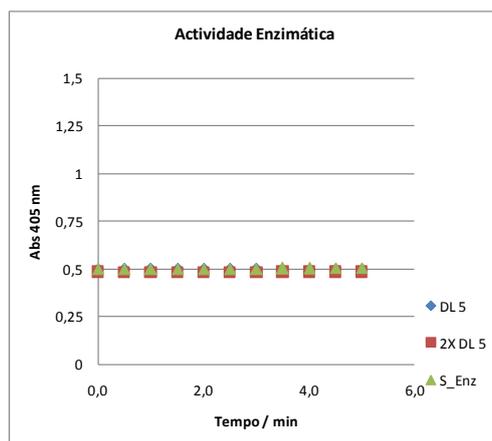
Como mencionado anteriormente para a determinação deste perfil de temperatura, a solução de enzima foi previamente incubada a cada uma das temperaturas em estudo. O resultado obtido é apresentado de seguida na Figura 19.



**Figura 19: Perfil de temperatura do enzima.** Resultados dos ensaios de actividade das soluções de enzima DL 5 (A) e 2X DL 5 (B), quando sujeitas a variações de temperatura.

De acordo com os valores de actividade enzimática obtidos face às variações de temperatura, verifica-se que o enzima se mantém activo até aos 40°C, perdendo actividade quando incubado a temperaturas mais elevadas. A melhor actividade foi obtida com a incubação do enzima a 30°C. Estes valores estão de acordo com os encontrados na literatura [20, 22].

A solução enzimática depois de sujeita à temperatura mais elevada (60°C) do ensaio anterior foi deixada em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0, a 4°C, durante 24 h e depois sujeita a um novo ensaio de actividade de modo a verificar a capacidade de recuperação do enzima. Com este ensaio é possível determinar a ir(reversibilidade) da desactivação térmica.

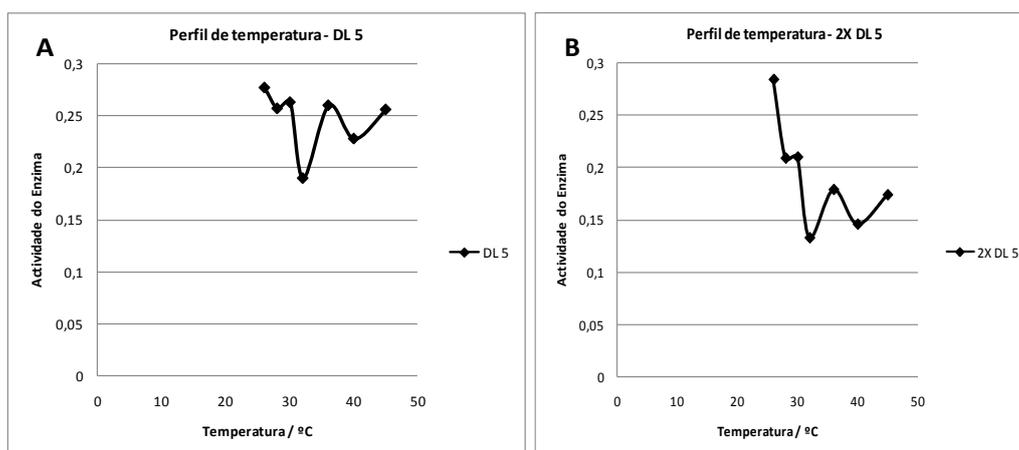


**Figura 20: Recuperação do enzima sujeito a elevadas temperaturas.** Representação da actividade enzimática (em UA/min) da solução de AChE sujeita à incubação a 60°C, e armazenada em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0, a 4°C por 24h.

Como se pode verificar pelo resultado apresentado na Figura 20, quando sujeito à temperatura de 60°C, o enzima perde toda a sua actividade e não tem capacidade de a recuperar, o que sugere que a desactivação térmica é irreversível. Este facto poderia ser confirmado por outras técnicas como a fluorescência, estando no entanto, fora do âmbito deste trabalho.

## 4.2.2 Perfil de Temperatura da reacção

Para obter este perfil foram realizados ensaios de reacção de hidrólise da acetilcolina, incubando previamente os reagentes correspondentes à maior parte do volume reaccional (tampão e DTNB) à temperatura pretendida. A própria reacção decorreu a essa mesma temperatura fixa no leitor de ELISA.



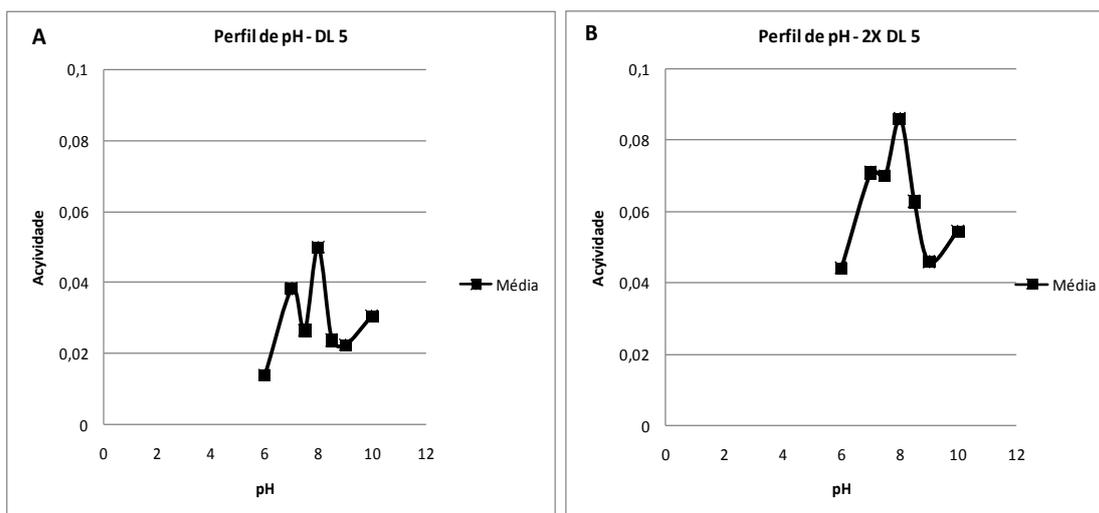
**Figura 21: Perfil de temperatura da reacção de actividade.** As soluções de tampão HEPES 50 mM, pH 8,0 e DTNB foram incubadas a diferentes temperaturas. Foram testadas as soluções de acetilcolinesterase DL 5 (A) e 2X DL 5 (B).

O perfil de temperatura da reacção, Figura 21, apresentou-se ligeiramente distinto do perfil de temperatura do enzima, uma vez que se verificou actividade enzimática mesmo com incubações a temperaturas elevadas. Isto sucede porque só foram incubadas as soluções de tampão HEPES 50 mM, pH 8,0 e DTNB, enquanto a solução de enzima permaneceu à RT. Todavia, verificaram-se melhores resultados, em particular para a solução 2X DL 5, com temperaturas mais baixas, entre os 26°C e os 30°C. Tendo em conta os resultados do ensaio anterior foi seleccionada a temperatura de 28°C como a mais apropriada para a realização de todos os restantes ensaios de actividade.

Todavia, uma vez que os intervalos de temperatura são muito próximos, poderá não se conseguir assegurar que os valores apresentados sejam representativos e independentes da flutuação de temperatura dos aparelhos de termostatização.

### 4.2.3 Perfil de pH do Enzima e da reacção

Quanto ao perfil de pH, o resultado apresentado na Figura 22, comprovou que o pH óptimo para a solução enzimática e para as restantes soluções necessárias à reacção de actividade é o pH 8,0.

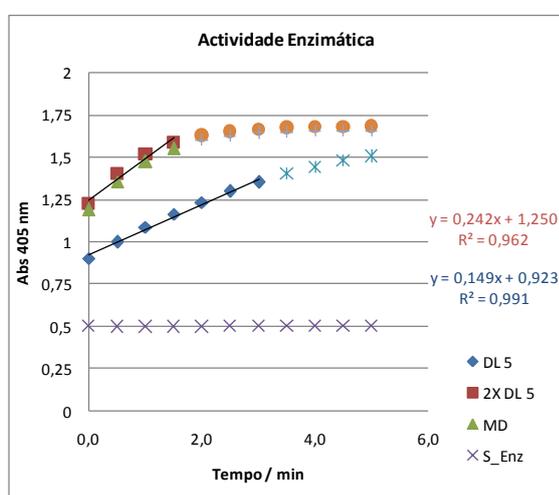


**Figura 22: Perfil de pH.** Representação da variação da actividade enzimática da solução de AChE DL 5 preparada com solução tampão com diferentes pHs. Foi testada uma gama de pH entre 6 e 10.

## 4.3 Ensaios de estabilidade

### 4.3.1 Do enzima livre congelado

Tendo como objectivo verificar a estabilidade do enzima armazenado em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0 a -20°C, foram realizados vários ensaios de actividade ao longo de todo o estágio. Estes ensaios tinham como intuito confirmar que o enzima se mantinha activo quando armazenado. As soluções de AChED foram preparadas logo no início do estágio, sendo considerada a solução stock. Partindo desta foi preparada a solução MD e depois as restantes diluições. Estas soluções mais diluídas permaneceram armazenadas a -20°C, em média, um período máximo de 2 semanas, variando consoante o número de ensaios realizados por semana.



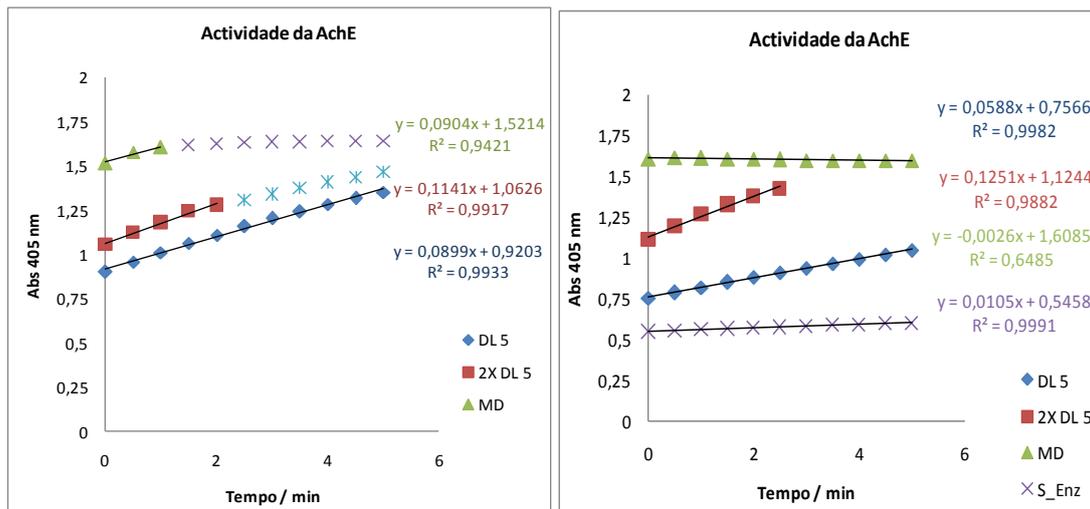
**Figura 23: 1º Ensaio de estabilidade do enzima livre congelado.** Representação da actividade enzimática da AChE (em UA/min) quando armazenada em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0 numa fase inicial do estágio.

Este primeiro ensaio foi efectuado durante os primeiros ensaios de imobilização, utilizando as soluções de enzima previamente preparadas e armazenadas.

Os resultados apresentados a seguir na Figura 23 podem ser comparados com os resultados iniciais aquando da selecção do ensaio de actividade mais apropriado para as microplacas, e podemos verificar que as actividades são equivalentes, provando-se que o enzima tem a capacidade de manter a sua actividade intacta, mesmo quando armazenado em solução tampão HEPES 50 mM, pH 8,0, a -20°C.

O mesmo ensaio anterior foi repetido em fases mais avançadas do estágio de modo a comprovar que o enzima armazenado sob a forma de solução stock e as respectivas diluições se mantinha activo.

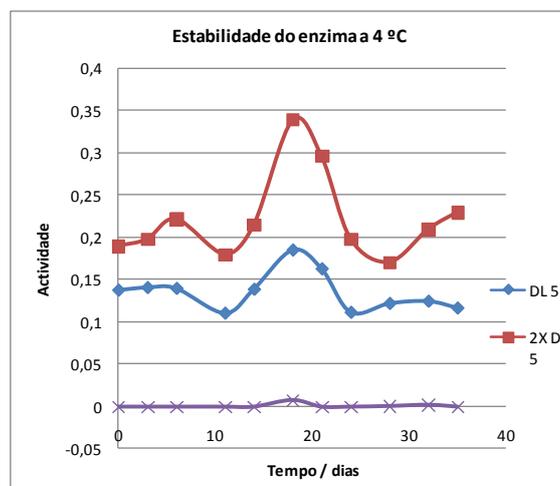
De acordo com os resultados anteriores podemos observar que as soluções enzimáticas são estáveis e mantêm a sua actividade. No entanto, verifica-se uma ligeira perda de actividade após algum tempo de armazenamento, sendo mais acentuada para a solução mais diluída, DL 5 (Figura 24).



**Figura 24: Ensaio de estabilidade do enzima livre congelado (2º e 3º ensaios).** Representação da actividade enzimática da AChE (em UA/min) quando armazenada em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0, a -20°C. (A) Numa fase intermédia do estágio (C) Na fase final do estágio.

### 4.3.2 Do enzima livre a 4°C

Este ensaio foi efectuado de modo a verificar o comportamento da solução de enzima quando armazenada a 4°C, em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0. Os resultados deste ensaio são importantes, uma vez que para a realização dos ensaios de estabilidade do enzima imobilizado, as microplacas são conservadas sob estas mesmas condições. E como se pode verificar pela Figura 25, as soluções enzimáticas mantiveram a sua actividade estável durante os 35 dias do ensaio. O pico verificado ao dia 18 poderá tratar-se de erro humano, tendo sido aplicado maior concentração de enzima ou substrato, mas também se poderá tratar de má calibração dos aparelhos em uso, podendo deste modo ser considerado um outlier.



**Figura 25: Ensaio de estabilidade do enzima livre a 4°C.** Representação da actividade enzimática da AChE (em UA/min) quando armazenada em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0, a 4°C.

## 4.4 1º Método de imobilização – imobilização com GA

### 4.4.1 1º ensaio de Imobilização com GA

Analisando os resultados apresentados na Figura 26, verificam-se valores de actividade muito baixos. De referir que o ensaio de actividade foi efectuado com volumes de substrato e corante proporcionalmente adaptados à escala das microplacas, directamente do ensaio de actividade em cuvettes (conversão de volumes parciais de um volume total de 1,025 mL para um volume total de 102,5 µL). Uma vez que os volumes usados não foram os mais adequados, justifica-se, em parte, que os resultados tenham sido pouco satisfatórios.

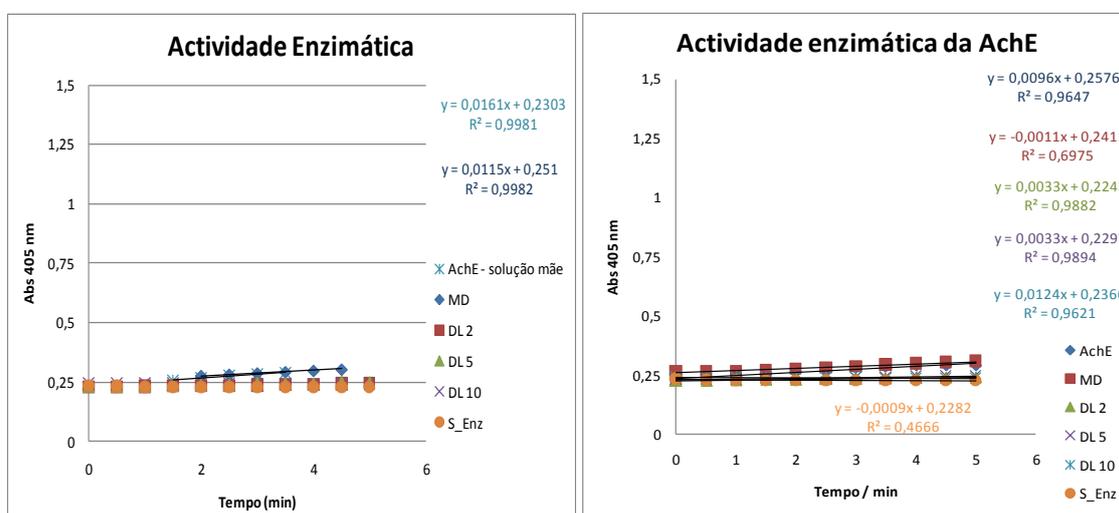


Figura 26: Actividade enzimática da AChE imobilizada com GA (1º ensaio), em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada em microplacas pelo método com GA.

### 4.4.2 Doseamento pelo método do BCA

Com o objectivo de avaliar o procedimento de imobilização realizado anteriormente, procedeu-se ao doseamento proteico dos sobrenadantes das soluções de enzima, recolhidos após o respectivo tempo de incubação. Para o efeito seleccionou-se o método do BCA. Este método recorre a um kit comercialmente disponível e o procedimento foi já anteriormente descrito em 3.2.5.2.

Tendo em conta o declive e a ordenada na origem obtidos ( $y = 0,0012x + 0,0649$ ;  $R^2 = 0,9896$  - Figura 55) através da regressão linear da curva padrão (Anexo I) é possível determinar a concentração proteica das soluções enzimáticas iniciais (Quadro 4) assim como dos sobrenadantes recolhidos das soluções enzimáticas imobilizadas (Quadro 3) pelo método de imobilização com GA.

**Quadro 3: Doseamento proteico dos sobrenadantes das soluções enzimáticas imobilizadas, pelo método de BCA.** Absorvência a 562 nm e respectiva concentração proteica.

<b>Solução</b>	<b>Mediana de Abs</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
AChE	0,6001	446,0000
MD	0,3006	196,3750
DL 2	0,1690	86,7083
DL 5	0,1617	80,6667
DL 10	0,3001	196,0000

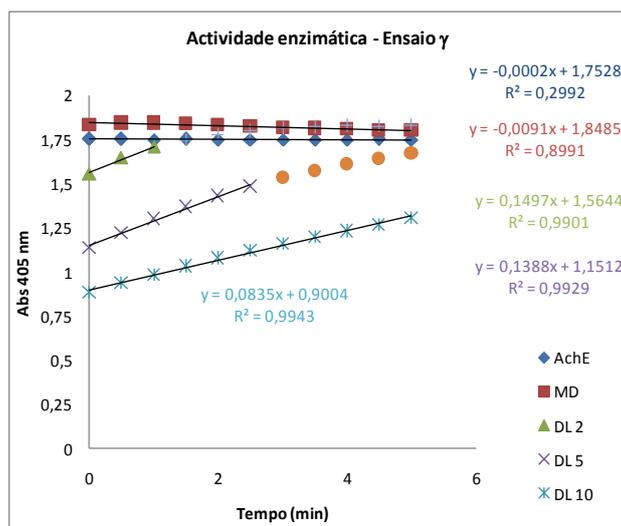
**Quadro 4: Doseamento proteico das Soluções enzimáticas originais, pelo método de BCA.** Absorvência a 562 nm e respectiva concentração proteica

<b>Solução</b>	<b>Mediana de Abs</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
AChED	0,4444	316,2500
MD	0,1898	104,0833
DL2	0,1685	86,3333
DL5	0,1451	66,8333
DL 10	0,1374	60,4167

Com os resultados apresentados anteriormente (Quadros 3 e 4), confirma-se a baixa taxa de imobilização obtida com este primeiro método de imobilização testado, pois os valores de concentração proteica obtidos para os sobrenadantes das soluções enzimáticas são semelhantes ou mesmo superiores aos obtidos para as soluções enzimáticas originais. Tal resultado, também nos possibilita deferir que o método de doseamento em causa, deverá de algum modo, estar a sofrer interferências por algum dos reagentes usados no processo de imobilização, cujo pouco que ainda permaneça na placa após a respectiva lavagem, seja suficiente para ser detectado a quando do doseamento proteico. O reagente suspeito é o GA, o qual se sabe que poderá interferir com este método de doseamento.

### 4.4.3 Adaptação do Ensaio de Actividade a microplacas

Como mencionado anteriormente, o ensaio de actividade foi realizado com volumes de substrato e corante proporcionalmente adaptados à escala das microplacas directamente do ensaio de actividade em cuvettes, não sendo esses os volumes mais adequados. Por este motivo, existiu a necessidade de testar novos ensaios de actividade de modo a encontrar um que seja o mais adequado à escala das microplacas. Foram testados 4 ensaios diferentes (ver capítulo 3.2.1.3). O método seleccionado foi o ensaio  $\gamma$  que consiste na adição a cada poço da microplaca de 150  $\mu\text{L}$  de tampão, 15  $\mu\text{L}$  de enzima (AChE), 30  $\mu\text{L}$  de substrato (AChI) e 150  $\mu\text{L}$  de DTNB, respectivamente por esta ordem. Na Figura 27 é apresentado o resultado obtido por este ensaio para as diluições testadas.

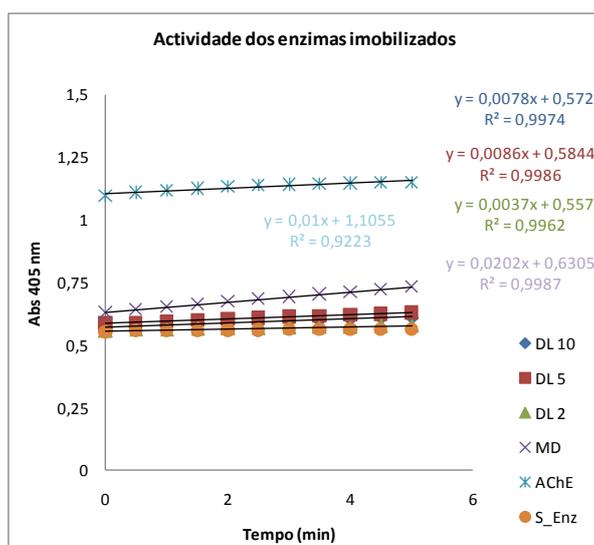


**Figura 27:** Actividade enzimática da AChE segundo o ensaio  $\gamma$ , em UA/min. Representação da actividade enzimática das soluções de AChE segundo o melhor ensaio de actividade adaptado à escala das MTS

Este foi o ensaio seleccionado, pois é aquele com o qual se obtém os valores de actividade desejados (0,1497 UA/min e 0,1388 UA/min, respectivamente para as diluições DL 2 e DL 5,) e equivalentes aos obtidos com o ensaio de actividade realizado em cuvettes.

#### 4.4.4 2º ensaio de Imobilização com GA

O ensaio de imobilização directa com GA foi repetido, sob as mesmas condições anteriores, com alteração única no ensaio de actividade, tendo sido realizado com base no ensaio  $\gamma$ .



**Figura 28:** Actividade enzimática da AChE imobilizada directamente com GA (2º ensaio), em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada em microplacas pelo método directo com GA.

Com este 2º ensaio obtiveram-se resultados relativamente mais satisfatórios (Figura 28) do que com o 1º ensaio, no entanto, os valores de actividade obtidos continuam a ser muito baixos, em relação ao pretendido (DL 5 – 0,0086 UA/min e DL 2 – 0,0037 UA/min, em vez de 0,1 UA/min).

O doseamento proteico dos sobrenadantes deste ensaio foi efectuado pelo método do BCA. A recta de calibração obtida (dados não mostrados) apresentava a seguinte equação referente à regressão  $Y = 0,0010x + 0,0780$ ;  $R^2 = 0,9897$ .

Neste ensaio também se testaram soluções enzimáticas originais sujeitas ao processo de imobilização, soluções de GA originais e soluções de GA sujeitas ao processo de imobilização (dados apresentados em anexo II).

**Quadro 5: Doseamento proteico dos sobrenadantes das soluções enzimáticas imobilizadas, pelo método de BCA.**  
Absorvência a 562 nm e respectiva concentração proteica

<b>Solução</b>	<b>Mediana de Abs</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>
DL 10	0,1736	95,6000
DL 5	0,1651	87,1000
DL 2	0,1789	100,9000
MD	0,1826	104,6000
AChE	0,4372	359,2000

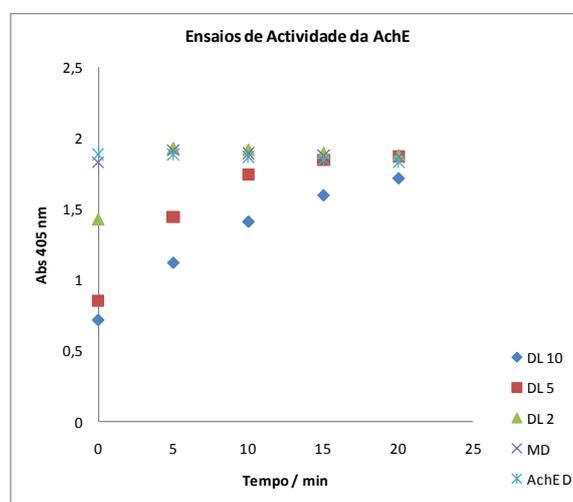
As soluções de GA foram testadas porque no 1º ensaio, verificou-se que o GA deveria ter interferências no método de doseamento. Tendo em conta a gama de valores obtidos (Quadro 5) pode concluir-se que o método de imobilização não deverá ter funcionado pois os valores de concentração proteica obtidos para as soluções dos foram equivalentes aos obtidos para as soluções enzimáticas e para as soluções enzimáticas originais livres. Por outro lado, os valores deste método não são muito fidedignos pois para as soluções de GA foram obtidos valores de concentração proteica tão ou mais elevados do que os obtidos para as soluções enzimáticas originais livres, demonstrando assim a interferência deste reagente com o método de doseamento.

Este ensaio de doseamento proteico foi repetido para as mesmas amostras (dados não mostrados) mas os resultados obtidos foram semelhantes aos do 1º doseamento. Verificou-se novamente as interferências do GA, não sendo possível tirar conclusões.

## 4.5 2º Método de imobilização – Imobilização com APTES

### 4.5.1 1º ensaio de Imobilização com APTES

Este ensaio de imobilização foi realizado de acordo com as condições descritas em 3.2.3.2, tendo sido utilizadas soluções de APTES 5% e GA 5%. Devido a um problema logístico não foi possível efectuar a leitura de absorvência imediatamente após a aplicação das soluções para o ensaio de actividade, no entanto procedeu-se ao ensaio com tempos de leitura distintos (0, 5, 10, 15 e 20 min).



**Figura 29: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (1º ensaio), em UA/min.** Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada em microplacas pelo método com APTES.

Embora não seja possível determinar o valor de actividade para as soluções em estudo correspondentes aos primeiros 5 minutos de reacção, verifica-se um comportamento linear conforme pretendido para as duas soluções mais diluídas – DL 10 e DL 5 (Figura 29).

### 4.5.2 Doseamento proteico pelo método do BCA

Pelos mesmos motivos mencionados na secção 4.2.2 procedeu-se ao doseamento proteico dos sobrenadantes do 1º ensaio de imobilização com APTES. A curva padrão é apresentada no anexo II.

**Quadro 6: Doseamento proteico dos sobrenadantes das soluções enzimáticas imobilizadas com APTES, pelo método de BCA. Absorvência a 562 nm e respectiva concentração proteica**

<b>Condição</b>	<b>Solução</b>	<b>Mediana de Abs</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>
APTES 5% + GA 5%	DL 10	0,1483	63,6364
	DL5	0,1506	65,7273
	DL2	0,2155	124,7273
	MD	0,1568	71,3636
	AChED	0,3852	279,0000

Comparando os resultados obtidos, apresentados no Quadro 6, com os obtidos anteriormente para as soluções de enzima originais livres, podemos verificar que ocorreu imobilização, já que os valores de concentração proteica são inferiores. Porém estes valores podem não ser muito fiáveis devido às interferências do GA com o método de doseamento.

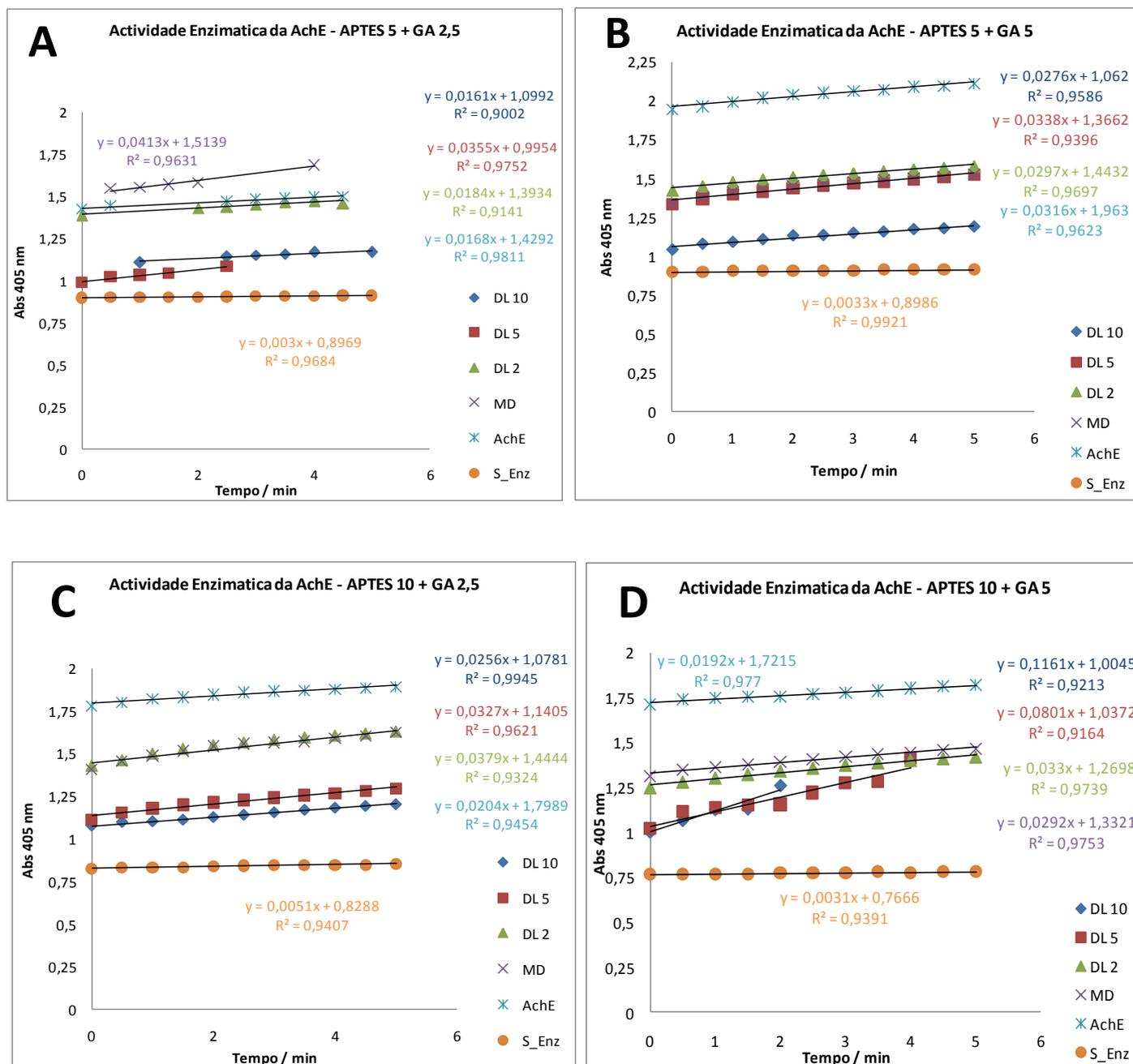
### 4.5.3 2º Ensaio de Imobilização com APTES

De modo a otimizar os valores de actividade, foram testadas 4 combinações de concentrações distintas de APTES e GA. Usaram-se soluções de APTES 5% e 10% e soluções de GA 2,5% e 5%.

Analisando os resultados obtidos (Figura 30) e apresentados sucintamente no Quadro 7, verifica-se a existência de valores de actividade relativamente melhores comparando com o método de imobilização directa com GA, não sendo porém possível verificar a existência de qualquer padrão relativo às concentrações dos reagentes. Este ensaio foi então repetido com o intuito de verificar qual o comportamento das soluções enzimáticas face às variações das concentrações de APTES e GA.

**Quadro 7: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (2º ensaio), em UA/min. Imobilização efectuada sob quatro condições distintas. Valores de actividade calculados directamente pelo declive da absorvência a 405 nm em função do tempo.**

<b>Condição</b>	<b>AChE D</b>	<b>MD</b>	<b>DL 2</b>	<b>DL 5</b>	<b>DL 10</b>	<b>S_Enz</b>
<b>APTES 5 + GA 2,5</b>	0,0168	0,0413	0,0184	0,0355	0,0161	0,003
<b>APTES 5 + GA 5</b>	0,0316	0,0338	0,0297	0,0338	0,0276	0,0033
<b>APTES 10 + GA 2,5</b>	0,0204	0,0379	0,0379	0,0327	0,0256	0,0051
<b>APTES 10 + GA 5</b>	0,0192	0,0292	0,033	0,0801	0,1161	0,0031



**Figura 30: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (2º ensaio), em UA/min.** Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada em microplacas pelo método com APTES. Foram testadas quatro condições diferentes, A, APTES 5% e GA 2,5%; B, APTES 5% e GA 5%; C, APTES 10% e GA 2,5%; D, APTES 10% e GA 5%

### 4.5.4 3º Ensaio de Imobilização com APTES

Este 3º ensaio de imobilização com APTES foi efectuado com o objectivo de validar os resultados anteriores e determinar um comportamento face às variações de concentração do APTES e do GA. As condições do ensaio são as mesmas do 2º ensaio de imobilização com APTES.

**Quadro 8: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (3º ensaio), em UA/min.** Imobilização efectuada sob quatro condições distintas. Valores de actividade calculados directamente pelo declive da absorvência a 405 nm em função do tempo.

Condição	AChE D	MD	DL 2	DL 5	DL 10	S_Enz
<b>APTES 5 + GA 2,5</b>	0,026	0,0536	0,044	0,0364	0,0163	0,0062
<b>APTES 5 + GA 5</b>	0,0284	0,0353	0,0293	0,0317	0,0166	0,0115
<b>APTES 10 + GA 2,5</b>	0,0531	0,0342	0,0342	0,0205	0,0232	0,0073
<b>APTES 10 + GA 5</b>	0,0856	0,0376	0,0309	0,0258	0,0209	0,0061

Tal como sucedido no 2º ensaio de imobilização com a APTES, também desta vez, não foi possível estabelecer um comportamento padrão da actividade enzimática face às variações de concentração de APTES e GA (Quadro 8). No entanto, pode verificar-se que não existe nenhuma melhoria significativa associada ao aumento da concentração de GA, relativamente à concentração original de 2,5%, sendo inclusive os resultados ligeiramente melhores para esta percentagem.

### 4.5.5 4º Ensaio de Imobilização com APTES

Este ensaio foi realizado com a intenção de testar soluções de GA de menor concentração, uma vez que este composto interfere com o método de doseamento, e também porque nos ensaios anteriores foram obtidos melhores resultados nos ensaios cuja concentração de GA é mais baixa.

A partir deste ensaio começou a ser testada a solução 2X DL5 (cuja diluição é de 2,5x, como descrito nos métodos).

De acordo com o Quadro 9, são obtidos melhores valores de actividade enzimática com a utilização de soluções de GA menos concentradas, como é o caso das soluções de GA 1% e 2,5%.

**Quadro 9: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (4º ensaio, em UA/min.** Imobilização efectuada sob seis condições distintas. Valores de actividade calculados directamente pelo declive da absorvência a 405 nm em função do tempo.

Condição	DL 2	2X DL 5	DL 5	S_Enz
<b>APTES 5 + GA 1</b>	0,042	0,0466	0,0312	0,0014
<b>APTES 5 + GA 2,5</b>	0,0176	0,0166	0,0218	0,0045
<b>APTES 5 + GA 5</b>	0,0189	0,0113	0,0096	0,0111
<b>APTES 10 + GA 1</b>	0,0298	0,0298	0,0298	0,009
<b>APTES 10 + GA 2,5</b>	0,0185	0,0182	0,0056	0,0039
<b>APTES 10 + GA 5</b>	0,0107	0,0136	0,0157	0,0104

#### 4.5.6 5º Ensaio de Imobilização com APTES

Tendo em conta os resultados do ensaio anterior, testaram-se ainda soluções de GA com concentrações mais reduzidas, não se tendo todavia verificado variações significativas entre as actividades obtidas (Quadro 10).

**Quadro 10: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (5º ensaio), em UA/min.** Imobilização efectuada sob quatro condições distintas. Valores de actividade calculados directamente pelo declive da absorvência a 405 nm em função do tempo.

Condição	DL 2	2X DL 5	DL 5	S_Enz
<b>APTES 5 + GA 0,5</b>	0,0305	0,0515	0,0194	0,0057
<b>APTES 5 + GA 1</b>	0,0342	0,0214	0,0123	0,0092
<b>APTES 5 + GA 2</b>	0,0261	0,0697	0,008	0,0026
<b>APTES 5 + GA 2,5</b>	0,0361	0,0134	0,0117	0,0054

#### 4.5.7 Ensaio de Actividade dos sobrenadantes do 5º ensaio de Imobilização com APTES

Com o intuito de quantificar o enzima restante nos sobrenadantes após o tempo de imobilização, e tendo em conta o facto de o GA interferir com o método de doseamento com BCA, as soluções de sobrenadante foram analisadas através de um ensaio de actividade e os resultados obtidos são apresentados no Quadro 11.

**Quadro 11: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada com APTES (5º ensaio), em UA/min.** Imobilização efectuada sob quatro condições distintas. Valores de actividade calculados directamente pelo declive da absorvência a 405 nm em função do tempo.

Condição	DL 2	2X DL 5	DL 5
APTES 5 + GA 0,5	0,0012	0,0105	0,0012
APTES 5 + GA 1	0,00001	0,0037	0,0038
APTES 5 + GA 2	0,0013	0,0034	0,0045
APTES 5 + GA 2,5	0,0008	0,0028	0,0081

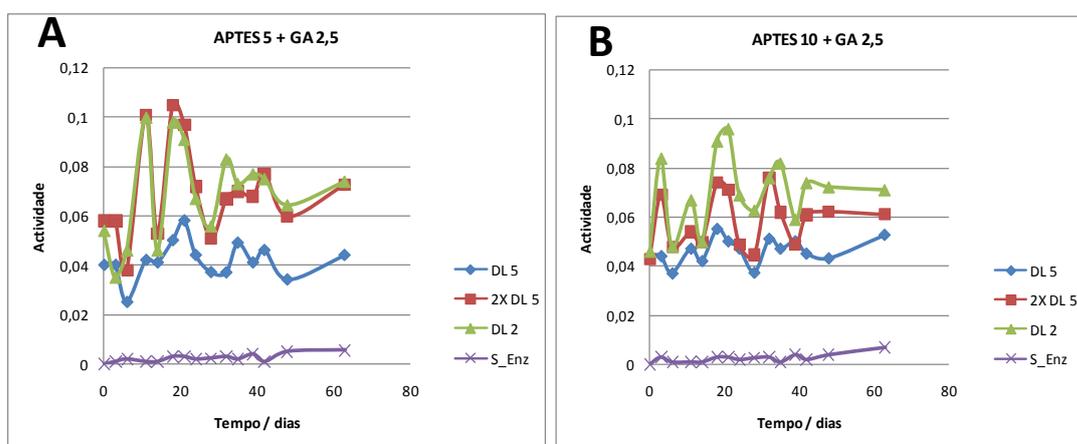
## 4.5.8 6º Ensaio de Imobilização com APTES

Este ensaio foi realizado com o intuito de estudar a estabilidade do enzima imobilizado sob as condições deste método, quando armazenado a 4º C, com tampão HEPES 50 mM, pH 8,0. As actividades enzimáticas iniciais são apresentadas no Quadro 12.

**Quadro 12: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (6º ensaio), em UA/min.** Imobilização efectuada sob duas condições distintas. Valores de actividade calculados directamente pelo declive da absorvência a 405 nm em função do tempo.

Condição	DL 5	2X DL 5	DL 2	S_Enz
APTES 5 + GA 2,5	0,04	0,058	0,054	0
APTES 10 + GA 2,5	0,044	0,043	0,046	0

## 4.5.9 Estabilidade do 6º Ensaio de Imobilização com APTES

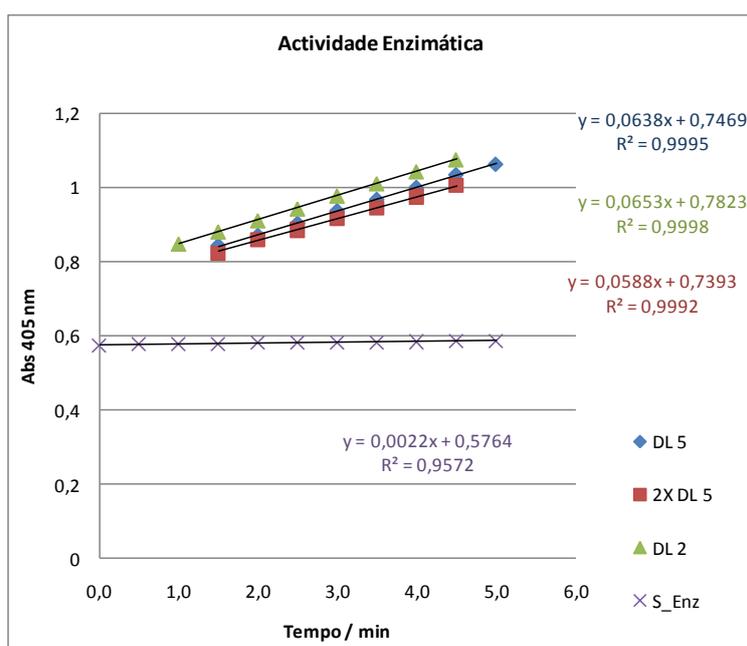


**Figura 31: Estabilidade da actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES.** Representação gráfica da actividade da AChE (em UA/min) quando imobilizada em microplacas pelo método com APTES em função do tempo quando armazenada em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0 a 4º C. Ensaio de duas condições diferentes, A, APTES 5% e GA 2,5%; B, APTES 10% e GA 2,5%.

Como se pode verificar pelos gráficos apresentados na Figura 31, o enzima imobilizado varia ligeiramente a sua actividade durante os primeiros 15 dias de armazenamento, acabando por estabilizar num valor de actividade semelhante ao original e mantendo-se assim durante toda a duração do ensaio, de 62 dias.

### 4.5.10 7º Ensaio de Imobilização com APTES

O ensaio de imobilização com APTES demonstrou ser um bom método, no entanto, encontrava-se em falta um doseamento proteico dos sobrenadantes eficaz. Foi então necessária a realização de um novo ensaio de imobilização com APTES, de modo a obter sobrenadantes para o doseamento proteico pelo método de Bradford apresentado em seguida. As condições seleccionadas para este ensaio foram as originais do método, APTES 5% e GA 2,5%. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 32 e resumidos no Quadro 13. Os valores de actividade obtidos são equivalentes aos obtidos nos ensaios anteriores.



**Figura 32:** Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES (7º ensaio), em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada em microplacas pelo método com APTES.

**Quadro 13:** Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada com APTES (7º ensaio), em UA/min. Valores de actividade calculados directamente pelo declive da absorvência a 405 nm em função do tempo.

Condição	DL 5	2X DL 5	DL 2	S_Enz
APTES 5 + GA 2,5	0,0638	0,0588	0,0653	0,0022

### 4.5.11 Doseamento proteico dos sobrenadantes do 7º Ensaio de Imobilização com APTES pelo método de Bradford

Analisando os valores de concentração proteica (Quadro 14) das soluções originais e o obtido para os sobrenadantes é possível verificar uma percentagem de imobilização para as soluções de 2X DL 5 e DL 2, de aproximadamente 50%. No caso da solução DL 5 existiu claramente uma interferência com o método de doseamento pois de acordo com o valor de actividade obtido (Quadro 13) não se deveria ter obtido um valor de concentração proteica para o sobrenadante semelhante ao da solução original.

Quadro 14: Concentrações proteicas dos sobrenadantes do 7º ensaio de imobilização com APTES doseados pelo método de Bradford.

Ensaio 7 - APTES 5% + GA 2,5%					
Sol Enzima	Concentração (g/L)				
	Sol Original	Sobrenadante	Lav Enz	DTNB	Lav D
DL 5	0,0038	0,0038	0,0027	0,0396	0,0132
2X DL 5	0,0076	0,0035	0,0029	0,0346	0,0933
DL 2	0,0095	0,0050	0,0030	0,0334	0,0092
S_Enz		0,0025	0,0027	0,0347	0,0131

## 4.6 3º Método de imobilização – Imobilização em Ion Jelly®

Este método de imobilização recorreu ao uso de um líquido iónica em conjunto com uma gelatina de modo a formar um polímero, o Ion Jelly®, para imobilização do enzima (procedimento indicado em 3.2.4.3).

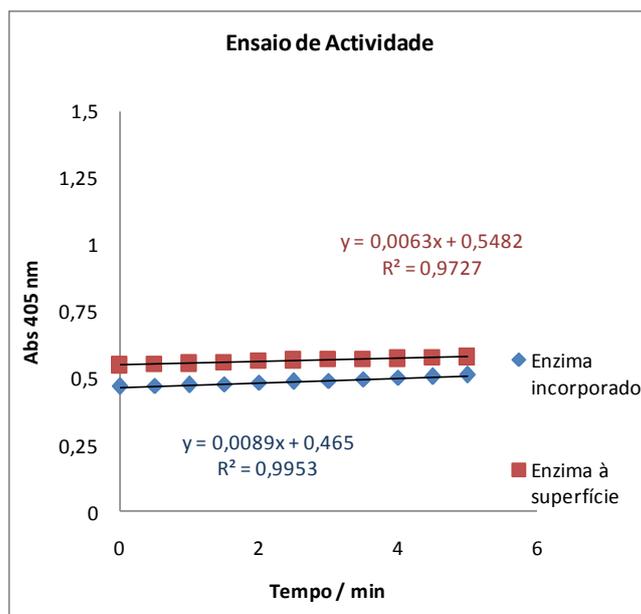


Figura 33: Actividade enzimática da AChE imobilizada em Ion Jelly®, em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada em microplacas pelo método em Ion Jelly®.

Os resultados obtidos para este método e apresentados na Figura 33 mostraram que o mesmo não foi eficiente, uma vez que os valores de actividade enzimática obtidos para as duas condições testadas, enzima incorporado no Ion Jelly® e enzima aplicada à superfície, são muito baixos. Este ensaio foi repetido (dados não mostrados) obtendo-se resultados equivalentes. Deste modo, este método foi excluído não voltando a ser testado.

## 4.7 4º Método de imobilização – Imobilização em Placas Aminadas

### 4.7.1 1º Ensaio de Imobilização em Placas aminadas

Este ensaio recorre ao uso de microplacas iNUNC com a superfície aminada, não sendo por isso necessário o tratamento inicial para gerar grupos  $\text{NH}_2$  à superfície para a ligação com o GA. Inicialmente foi usada a concentração de GA 2,5%. Os resultados obtidos (Figura 34) demonstram que o método é eficiente para a solução mais diluída tendo-se obtido um valor de activada conforme pretendido (0,1173 UA/min).

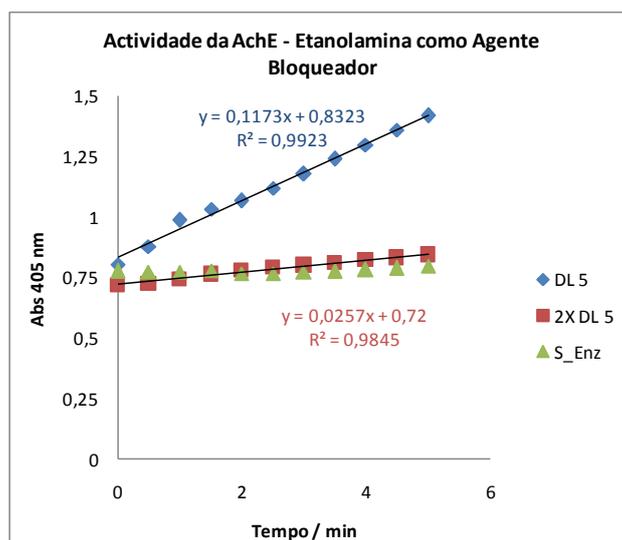
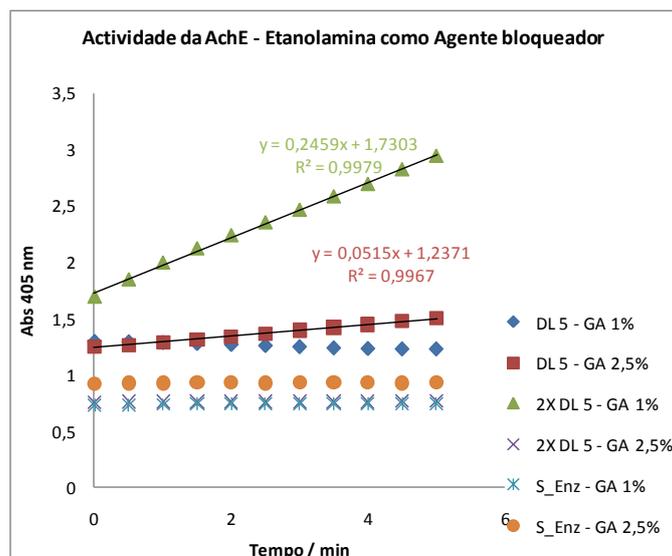


Figura 34: Actividade enzimática da AChE imobilizada em Placas aminadas (1º ensaio), em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada em microplacas iNUNC aminadas, usando GA 2,5% como agente de crosslinking.

### 4.7.2 2º Ensaio de Imobilização em Placas aminadas

Seguindo o protocolo original para este método (secção 3.2.3.4) foi testada uma concentração de GA mais baixa, de 1% (Figura 35). Essa concentração demonstrou ser mais eficaz para a solução de enzima mais concentrada (2X DL 5), tendo-se obtido melhores resultados com a solução de GA 2,5% para a solução enzimática mais diluída (DL 5).

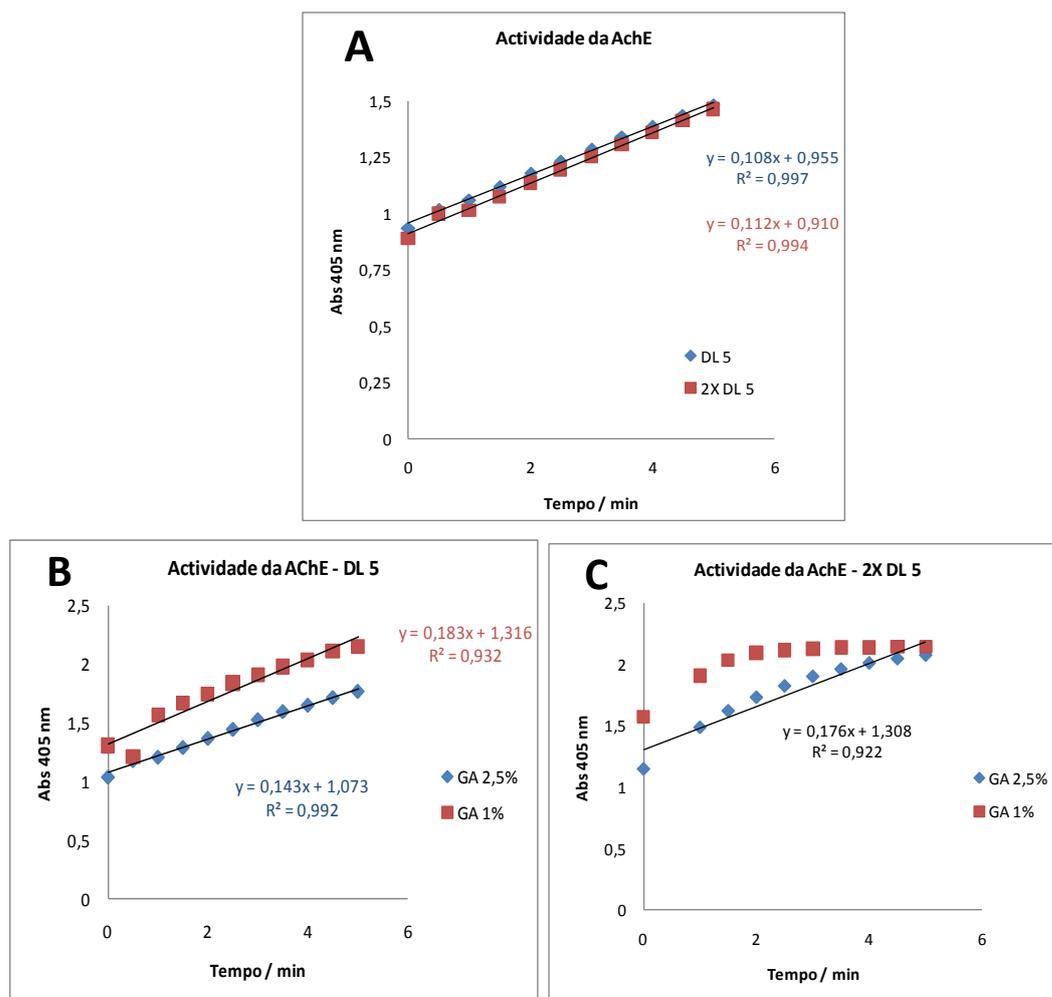


**Figura 35: Actividade enzimática da AchE imobilizada em placas aminadas (2º ensaio), em UA/min.** Representação gráfica da actividade da AchE quando imobilizada em microplacas iNUNC com grupos amina à superfície. Foram testadas duas condições diferentes, GA 1% e GA 2,5%.

### 4.7.3 Ensaio de Actividade dos sobrenadantes dos ensaios de Imobilização em Placas Aminadas

Os sobrenadantes dos 1º e 2º ensaios de imobilização com placas iNUNC aminadas foram analisados através de um ensaio de actividade.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 36 pode-se verificar que embora tenham sido obtidos bons valores de actividade para o enzima imobilizado, uma elevada quantidade de proteína deverá ter permanecido livre nas soluções de sobrenadante. Esta conclusão provém dos altos valores de actividade enzimática observados com as soluções de sobrenadante.



**Figura 36: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada em placas aminadas, em UA/min.** Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada em microplacas iNUNC com grupos amina à superfície, A – Sobrenadantes do 1º ensaio, B – Sobrenadantes da solução enzimática DL 5 do 2º ensaio, C – Sobrenadantes da solução enzimática 2X DL 5 do 2º ensaio

#### 4.7.4 3º Ensaio de Imobilização em Placas aminadas

Neste ensaio pretendeu-se estudar o papel do agente bloqueador, a etanolamina. Foram realizados ensaios na presença de solução pura e diluída de etanolamina. Também foi realizado um ensaio sem agente bloqueador.

Os resultados de actividade das soluções enzimáticas imobilizadas neste ensaio são apresentados no Quadro 15.

**Quadro 15: Actividade enzimática da AChE imobilizada em placas iNUNC (3º ensaio), em UA/min.** Valores de actividade calculados directamente do declive da absorvência a 405 nm em função do tempo.

<b>Condição</b>	<b>Agente Bloqueador</b>	<b>2X DL 5</b>	<b>DL 5</b>
<b>GA 1%</b>	<b>Puro</b>	0,0209	0,0432
	<b>Diluído</b>	0,0242	-0,0122
	<b>Ausente</b>	0,0064	-0,0188
<b>GA 2,5%</b>	<b>Puro</b>	0,0425	0,0219
	<b>Diluído</b>	0,0228	0,0232
	<b>Ausente</b>	0,0046	0,0041

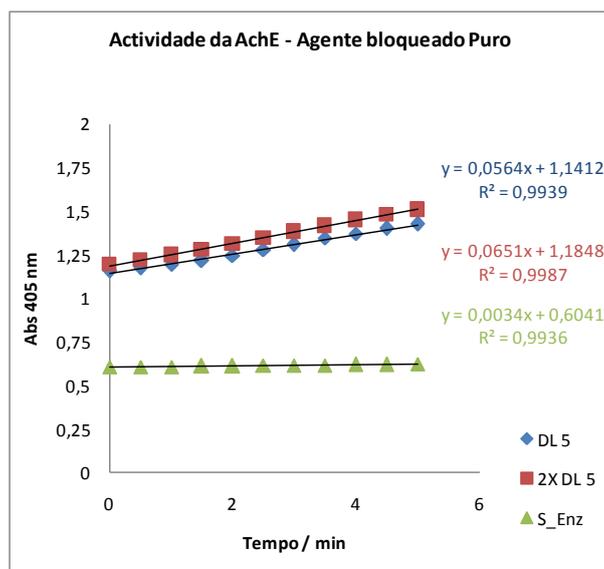
De acordo com os resultados observados a actividade enzimática fica aquém da pretendida quando utilizada uma solução de agente bloqueador diluída. Juntamente com os baixos valores (quase nulos) de actividade obtidos na ausência de etanolamina, fica provado que o passo de incubação com este agente é fundamental para este método de imobilização.

Os valores de actividade obtidos foram equivalentes aos do 2º ensaio, embora se tenha observado um comportamento distinto face à variação da concentração de GA. Para a solução enzimática mais diluída, DL 5, o melhor valor de actividade foi alcançado com a solução de GA 1%, enquanto a solução 2X DL 5 apresentou melhores valores com a solução de GA 2,5%.

O ensaio anterior foi várias vezes repetido, tendo-se obtido resultados semelhantes em todos os ensaios (dados não mostrados) e não sendo possível estabelecer um comportamento padrão face à variação da concentração do agente de reticulação. Deste modo, optou-se pela realização de um ensaio final só com a solução de GA 2,5 %, que é a concentração indicada na literatura [74] como ideal para a maioria dos métodos de imobilização.

### 4.7.5 4º Ensaio de imobilização com Placas Aminadas

No 4º ensaio de imobilização segundo este método somente foi usada a solução de GA 2,5%, e os valores de actividade enzimática obtidos apresentados na Figura 37 foram equivalentes aos dos ensaios anteriores, sendo obtidos valores de actividade de cerca de 50% do pretendido.



**Figura 37: Actividade enzimática da AChE imobilizada em placas aminadas (4º ensaio), em UA/min.** Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada em microplacas iUNC com grupos amina à superfície. Foi utilizada a solução de GA 2,5% como agente de crosslinking.

Os sobrenadantes deste ensaio foram testados, tendo sido obtidos resultados pouco lineares, não sendo possível determinar a sua actividade.

Tendo em conta os resultados verificados para este ensaio pode-se concluir que o método é relativamente eficaz, pois obtêm-se valores de actividade por volta de 0,05 UA/min. No entanto, estes valores são equivalentes aos obtidos com o método anterior que usa placas simples de PS. Além disso, os valores são pouco reprodutivos, pois como já foi mencionado anteriormente não foi possível observar um comportamento padrão face às condições testadas.

## 4.8 5º Método de imobilização – Imobilização em superfícies fotoactivadas

Este método recorre ao uso de FNAB para activação da microplaca de PS. O FNAB é usado para fotoactivação da microplaca por exposição à luz UV.

Embora se tenham obtido bons resultados com este ensaio (Figura 38), o mesmo foi pouco experimentado pois o reagente base para o processo, o FNAB, é demasiado dispendioso. E assim enveredou-se por métodos mais económicos.

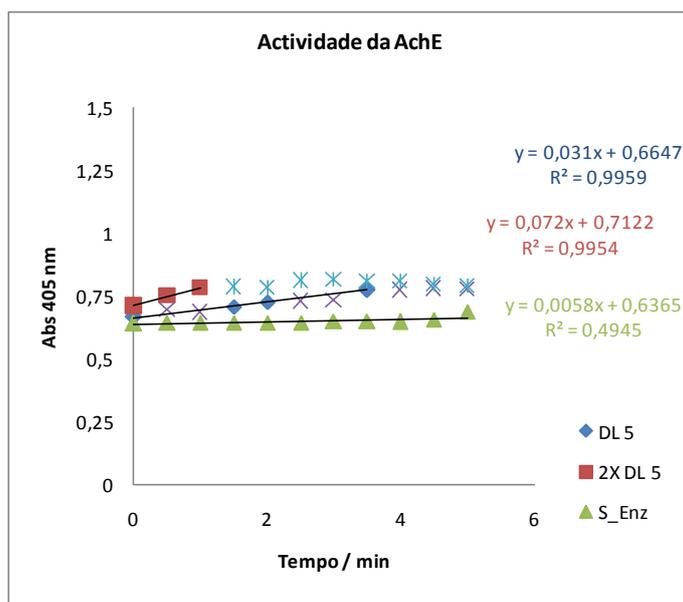


Figura 38: Actividade enzimática da AChE imobilizada em superfícies fotoactivadas, em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada em microplacas de PS activadas com FNAB.

## 4.9 6º Método de imobilização – Imobilização com Quitosano

Este método foi testado com microplacas iNUNC de 96 poços modificadas, com grupos amina à superfície, como indicado no protocolo original [77], mas também com microplacas simples de PS de 96 poços.

### 4.9.1 1º Ensaio de Imobilização com Quitosano

Este primeiro ensaio de imobilização de acordo com este método respeitou as condições originais do protocolo de GA 2,5 % e quitosano 1% em HAC (ácido acético) (1 vol conc HAC+99 vol H<sub>2</sub>O).

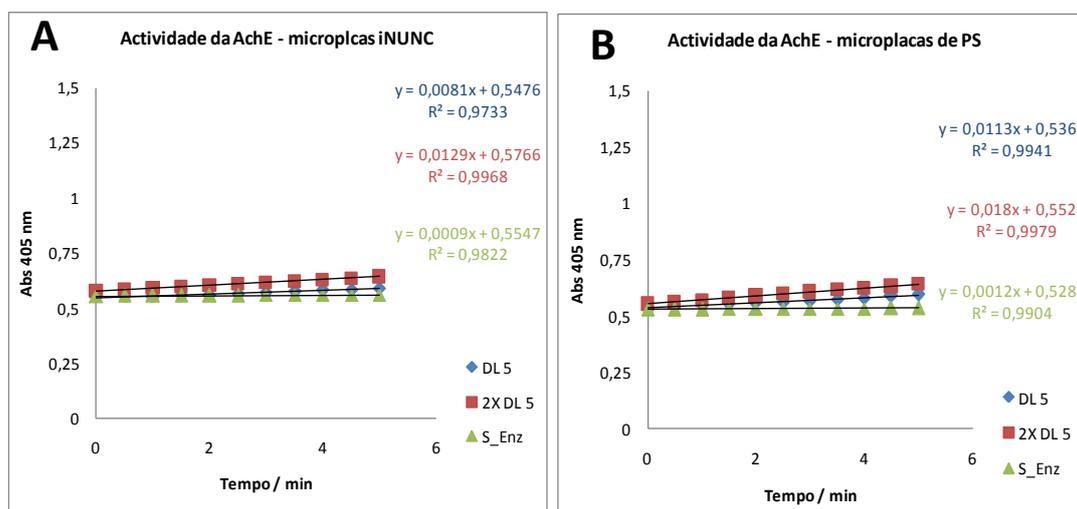


Figura 39: Actividade enzimática da AChE imobilizada na presença de quitosano (1º ensaio), em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada na presença de GA e quitosano. A – imobilização em microplacas iNUNC aminadas; B – imobilização em microplacas de PS.

Os resultados iniciais foram um pouco baixos relativamente ao pretendido como se pode verificar pela Figura 39. No entanto, de acordo com a literatura, este método deveria ser eficaz para o enzima em questão [77].

Este mesmo ensaio foi repetido (dados não mostrados), obtendo-se resultados pouco satisfatórios como no 1º ensaio.

Apesar de tudo, os sobrenadantes foram testados. Primeiramente foram testados pelo método com BCA (dados não mostrados), o qual mais uma vez mostrou sofrer interferências pela parte do GA. Numa segunda tentativa, os sobrenadantes foram analisados por ensaios de actividade enzimática, tendo-se obtido os seguintes valores de actividade relativamente baixos (Placas simples de PS: DL 5 –  $0,0161 \pm 0,00043$ ; 2X DL 5 –  $0,0282 \pm 0,000248$ ; Placas iNUNC: DL 5 –  $0,0123 \pm 0,000154$ ; 2X DL 5 –  $0,0177 \pm 0,000161$ ), o que prova que grande parte do enzima

devera ter realmente sido imobilizado mas de algum modo não se encontra activo ou disponível para reagir com o substrato durante a reacção de actividade.

## 4.9.2 2º Ensaio de Imobilização com Quitosano

O procedimento de imobilização com quitosano foi repetido com as placas modificadas iNUNC e com as placas simples de PS, sendo os resultados apresentados na Figura 40. Tal como sucedido no primeiro ensaio os valores de actividade enzimática ficaram aquém do esperado.

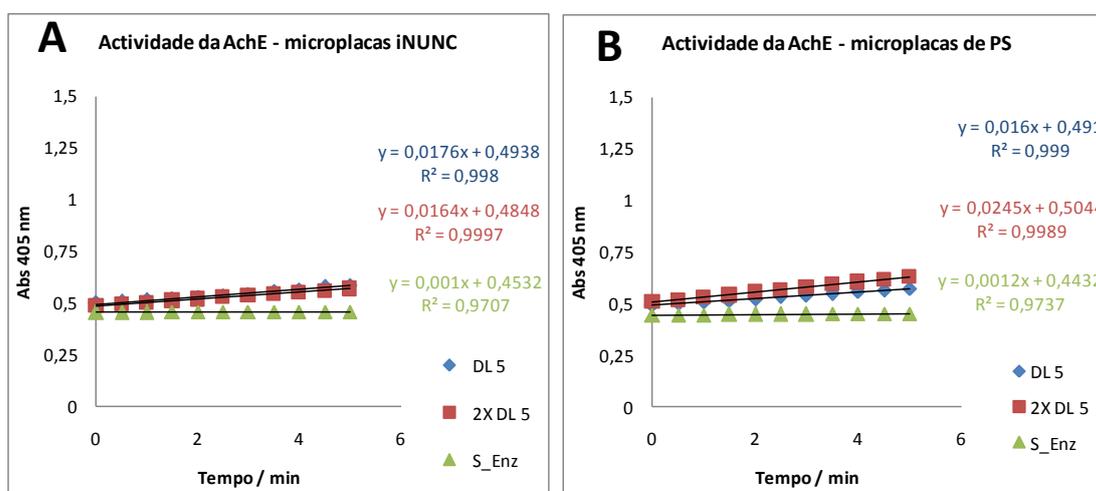
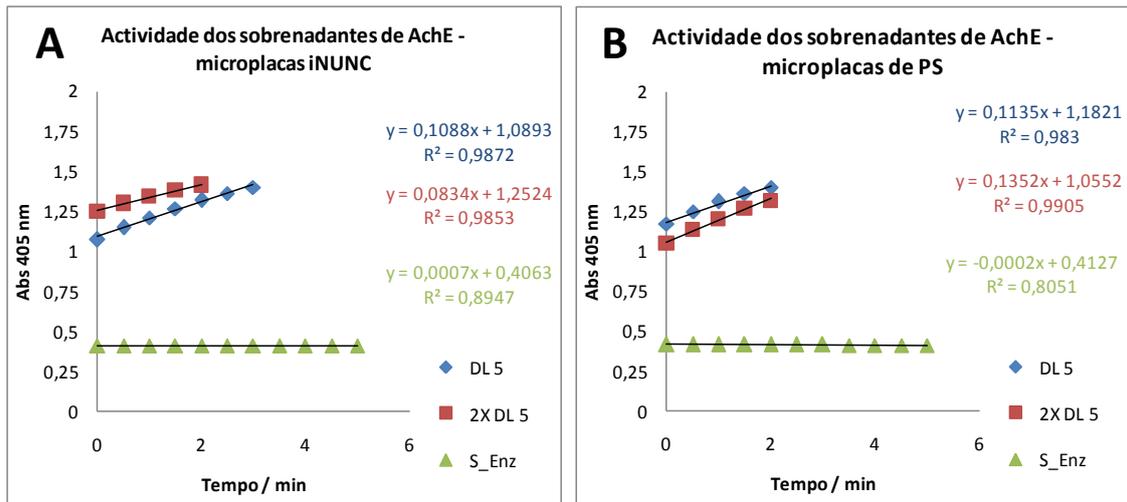


Figura 40: Actividade enzimática da AChE imobilizada na presença de quitosano (2º ensaio), em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada na presença de GA e quitosano. A – imobilização em microplacas iNUNC aminadas; B – imobilização em microplacas de PS.

Uma vez que os resultados foram equivalentes, ou mesmo até ligeiramente melhores com as placas simples de PS, decidiu-se pela utilização futura destas placas, já que as placas modificadas iNUNC são mais dispendiosas. No entanto, estes resultados são no geral muito fracos, não sendo possíveis grandes conclusões.

## 4.9.3 Ensaio de Actividade dos sobrenadantes do 2º ensaio de Imobilização com Quitosano

Os sobrenadantes deste ensaio foram testados através de ensaio de actividade. Os altos valores de actividade obtidos nestes ensaios de actividade dos sobrenadantes (Figura 41) indicam uma fraca imobilização do enzima, tendo grande parte da proteína permanecido livre na solução de sobrenadante.



**Figura 41: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada na presença de quitosano (2º ensaio), em UA/min.** Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada na presença de GA e quitosano. A – sobrenadantes da imobilização em microplacas iNUNC aminadas; B – sobrenadantes da imobilização em microplacas de PS.

## 4.10 7º Método de imobilização – Imobilização com APTES, GA e Quitosano

Como referido anteriormente no capítulo dos métodos 3.2.3.7 foram testadas duas versões deste ensaio de imobilização, métodos 7.1 (imobilização com APTES, GA e Quitosano) e 7.2 (imobilização com APTES, GA e Quitosano com adição do agente  $\text{NaBH}_4$ ).

### 4.10.1 Validação do Ensaio de imobilização com APTES

Este ensaio foi executado com o intuito de validar os bons resultados obtidos anteriormente com este método de imobilização com APTES (método 2). Foram seleccionadas as condições originais, APTES 5% e GA 2,5%, uma vez que de acordo com os resultados anteriores (secção 4.2), nenhuma das outras condições se revelaram mais apropriadas. De facto, foi possível reproduzir os resultados anteriores e obter valores de actividade enzimática aceitáveis e relativamente próximos do valor 0,1 pretendido (Figura 42).

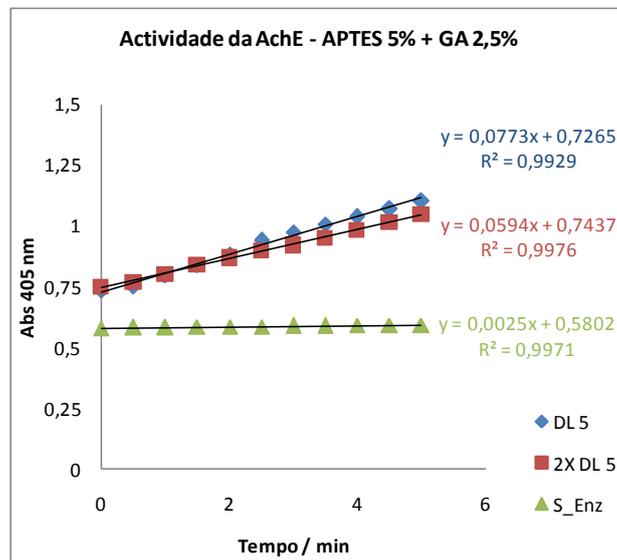


Figura 42: Actividade enzimática da AChE imobilizada com APTES, em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada com APTES.

## 4.10.2 Ensaio de Actividade dos sobrenadantes do ensaio de Imobilização com APTES

Os sobrenadantes do ensaio de imobilização anterior foram analisados através da realização de um ensaio de actividade. Os baixos valores de actividade verificados para as soluções de sobrenadantes apresentados na Figura 43 são indicativos da existência de pouca proteína em solução, o que sugere que a maioria do enzima tenha sido imobilizado, o que valida os elevados valores de actividade obtidos no ensaio anterior (Figura 42).

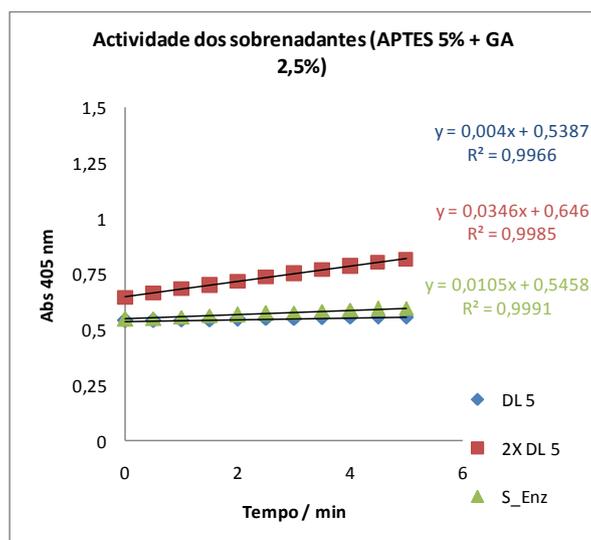


Figura 43: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada com APTES, em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada com APTES.

## 4.10.3 Método 7.1 – Imobilização com APTES, GA e Quitosano

### 4.10.3.1 1º Ensaio de imobilização pelo método 7.1

Para este ensaio foram testadas várias soluções de enzimas (DL 5, 2X DL 5 e DL 2) e diferentes condições experimentais (GA 1% e 2,5% e APTES 5% e 10%). A solução de quitosano usada foi a indicada no protocolo original [77] de 1% em HAc (ácido acético) (1 vol conc HAc+99 vol H<sub>2</sub>O).

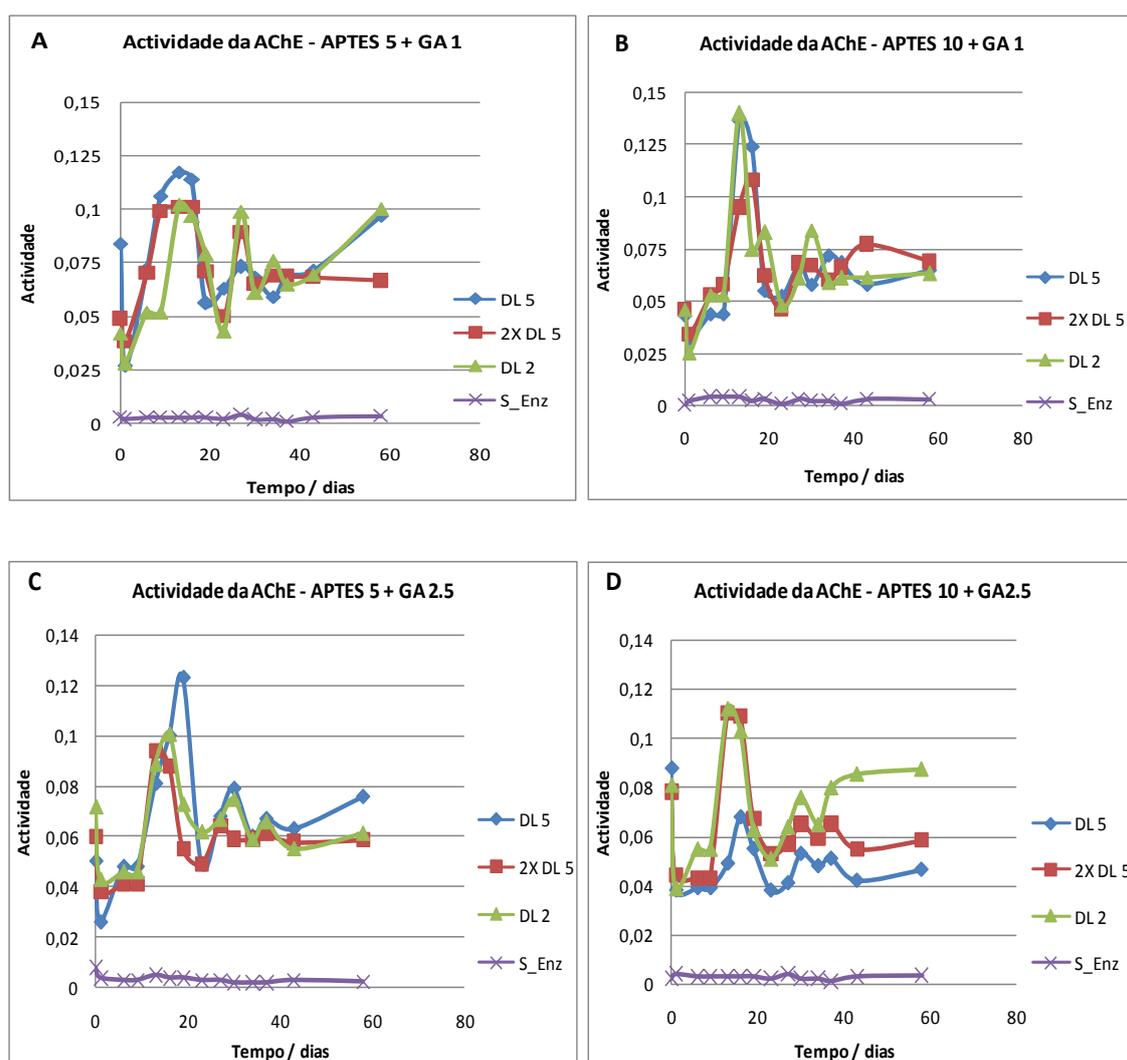
**Quadro 16: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.1, com APTES, GA e quitosano em placas de PS (1º ensaio), em UA/min.** Valores de actividade calculados directamente do declive da absorvência a 405 nm em função do tempo. Em todos os ensaios a percentagem de quitosano usada foi de 1%.

Condição	DL 5	2X DL 5	DL 2	S_Enz
APTES 5 + GA 1	0,084	0,049	0,042	0,003
APTES 10 + GA 1	0,0432	0,046	0,046	0
APTES 5 + GA 2,5	0,0502	0,06	0,072	0,008
APTES 10 + GA 2,5	0,0879	0,078	0,081	0,002

Este método mostrou ser bastante eficiente, tendo-se obtido para a maioria das soluções testadas, actividades enzimáticas superiores a 0,05 UA/min (Quadro 16). Deste modo, efectuou-se um estudo de estabilidade deste ensaio. A microplaca foi conservada em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0, a 4º C e ensaios de actividade foram efectuados à mesma, ao longo do tempo de armazenamento.

### 4.10.3.2 Estabilidade do 1º ensaio de imobilização pelo método 7.1

De acordo com os resultados observados conclui-se que o método 7.1. de imobilização é estável, uma vez que os valores de actividade se mantiveram constantes ao longo dos 60 dias do ensaio (Figura 44). Tendo em conta que os resultados foram semelhantes para todas as condições testadas foram seleccionadas as condições originais de GA 2,5 % e APTES 5% para os ensaios seguintes.



**Figura 44: Estabilidade da actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.1 (1º ensaio), em UA/min.** Representação gráfica da actividade da AChE ao longo do tempo, quando imobilizada em microplacas com APTES, GA e quitosano, e armazenada em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0 a 4°C. Ensaio de estabilidade das quatro condições testadas, A, APTES 5% e GA 1%; B, APTES 10% e GA 1%; C, APTES 5% e GA 2,5%; D, APTES 10% e GA 2,5%.

### 4.10.3.3 Repetição do ensaio de imobilização pelo método 7.1

O método 7.1. foi repetido por mais duas vezes e os resultados são apresentados na Figura 45 e resumidos no Quadro 17. Os valores obtidos mostraram que o método é realmente eficaz e que se conseguem obter valores de actividade muito próximos do 0,1 UA/min pretendido.

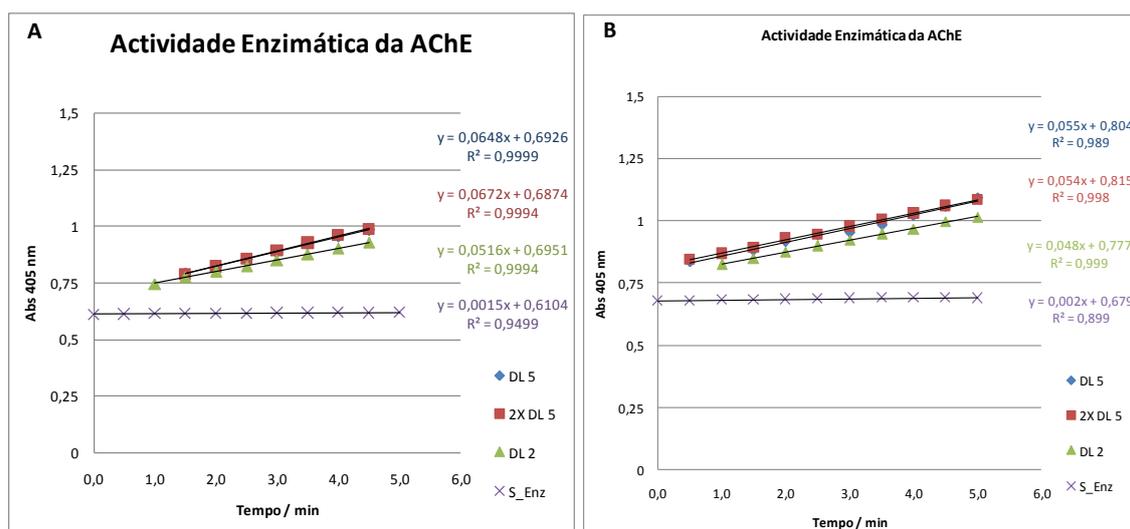


Figura 45: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.1 (2º e 3º ensaios), em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada com APTES, GA e quitosano. A – 2º ensaio; B – 3º ensaio.

Quadro 17: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.1, com APTES, GA e quitosano em placas de PS (2º e 3º ensaios), em UA/min. Valores de actividade calculados directamente do declive da absorbência a 405 nm em função do tempo.

Condição	Ensaio	DL 5	2X DL 5	DL 2	S_Enz
APTES 5 + GA 2,5 + Quitosano 1	Ensaio 2	0,0648	0,0672	0,0516	0,0015
	Ensaio 3	0,055	0,054	0,048	0,002

## 4.10.4 Método 7.2 – Imobilização com APTES e Quitosano e com o agente NaBH<sub>4</sub>

Este ensaio é equivalente ao método 7.1., no entanto, após a recolha dos sobrenadantes e antes do ensaio de actividade, realizou-se um passo de incubação com uma solução de NaBH<sub>4</sub>.

### 4.10.4.1 1º Ensaio de imobilização pelo método 7.2

Para este ensaio, foram usadas as condições originais do método, APTES 5%, GA 2,5% e quitosano 1% em HAC (ácido acético) (1 vol conc HAC+99 vol H<sub>2</sub>O).

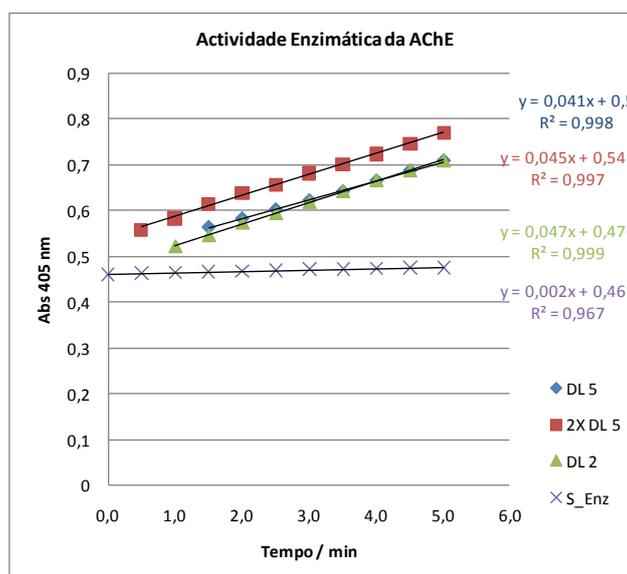


Figura 46: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.2 (1º ensaio), em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada com APTES, GA, quitosano e NaBH<sub>4</sub>.

Quadro 18: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.2, com APTES, GA, quitosano e NaBH<sub>4</sub> em placas de PS (1º ensaio), em UA/min. Valores de actividade calculados directamente do declive da absorvência a 405 nm em função do tempo.

Condição	DL 5	2X DL 5	DL 2	S_Enz
APTES 5 + GA 2,5 + quitosano 1	0,041	0,045	0,047	0,002

De acordo com os resultados obtidos (Figura 46), verifica-se que são obtidos valores de actividade de cerca de 50% do pretendido. A placa correspondente a este ensaio foi armazenada e a estabilidade da mesma testada como anteriormente indicado no ensaio de estabilidade do método 7.1 (secção 4.8.3.2).

### 4.10.4.2 Estabilidade do 1º ensaio de imobilização pelo método 7.2

Embora a actividade alcançada por este método não seja a pretendida, verifica-se pela Figura 47, que os valores de actividade alcançados se mantêm estáveis pelos menos durante 45 dias.

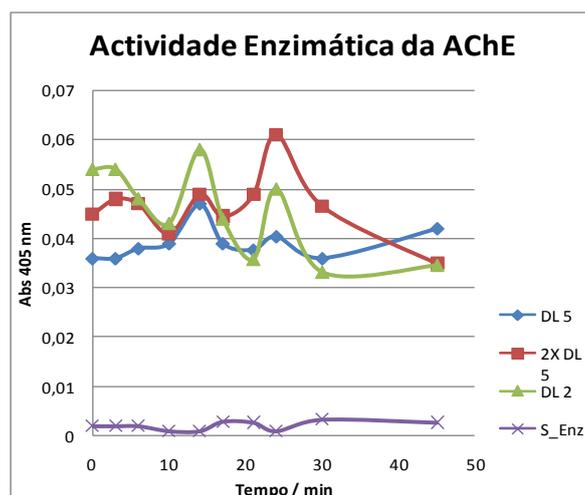


Figura 47: Estabilidade da actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.2 (1º ensaio), em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE ao longo do tempo, quando imobilizada em microplacas com APTES, GA, quitosano e NaBH<sub>4</sub>, e armazenada em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0 a 4°C.

### 4.10.4.3 Ensaio de Actividade dos sobrenadantes do 1º ensaio de Imobilização pelo método 7.2

Mais uma vez, com o intuito de validar o método de imobilização, os sobrenadantes do primeiro ensaio do método 7.2 foram sujeitos a um ensaio de actividade. Os resultados são apresentados de forma resumida no Quadro 19.

Quadro 19: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada pelo método 7.2, com APTES, GA, quitosano e NaBH<sub>4</sub> em placas de PS (1º ensaio), em UA/min. Valores de actividade calculados directamente do declive da absorvência a 405 nm em função do tempo.

Condição	Sobrenadante	DL 5	2X DL 5	DL 2	S_Enz
APTES 5 + GA 2,5 + quitosano 1 + NaBH <sub>4</sub>	Enzima	0,006	0,046	0,061	0
	NaBH <sub>4</sub>	0	0	0	0,001

#### 4.10.4.4 Repetição do Ensaio de imobilização pelo método 7.2

Os segundo e terceiro ensaios de imobilização por este método revelam valores de actividade muito interessantes, sendo os melhores obtidos até então (Figura 48 e Quadro 20). Inclusive obtiveram-se valores superiores ao pretendido. Os sobrenadantes destes ensaios foram analisados e as placas correspondentes sujeitas a ensaios de estabilidade.

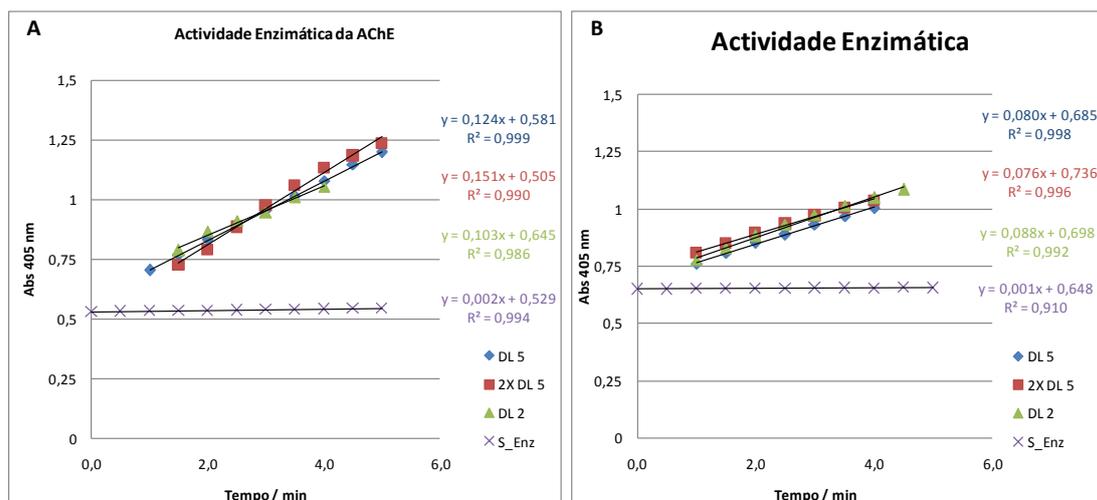


Figura 48: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.2 (2º e 3º ensaios), em UA/min. Representação gráfica da actividade da AChE quando imobilizada com APTES, GA, quitosano e NaBH<sub>4</sub>. A – 2º ensaio; B – 3º ensaio.

Quadro 20: Actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.2, com APTES, GA, quitosano e NaBH<sub>4</sub> em placas de PS (2º e 3º ensaios), em UA/min. Valores de actividade calculados directamente do declive da absorbência a 405 nm em função do tempo.

Condição	Ensaio	DL 5	2X DL 5	DL 2	S_Enz
APTES 5 + GA 2,5 + Quitosano 1 + NaBH <sub>4</sub>	Ensaio 2	0,124	0,151	0,103	0,002
	Ensaio 3	0,08	0,076	0,088	0,001

#### 4.10.4.5 Estabilidade dos 2º e 3º ensaios de imobilização pelo método 7.2

Mais uma vez ficou demonstrado que este método de imobilização permite que o enzima imobilizado permaneça estável. Tal pode verificar-se pela Figura 49, em que o enzima mantém a sua actividade próxima da inicial durante 44 e 31 dias, respectivamente para os ensaios 2 e 3.

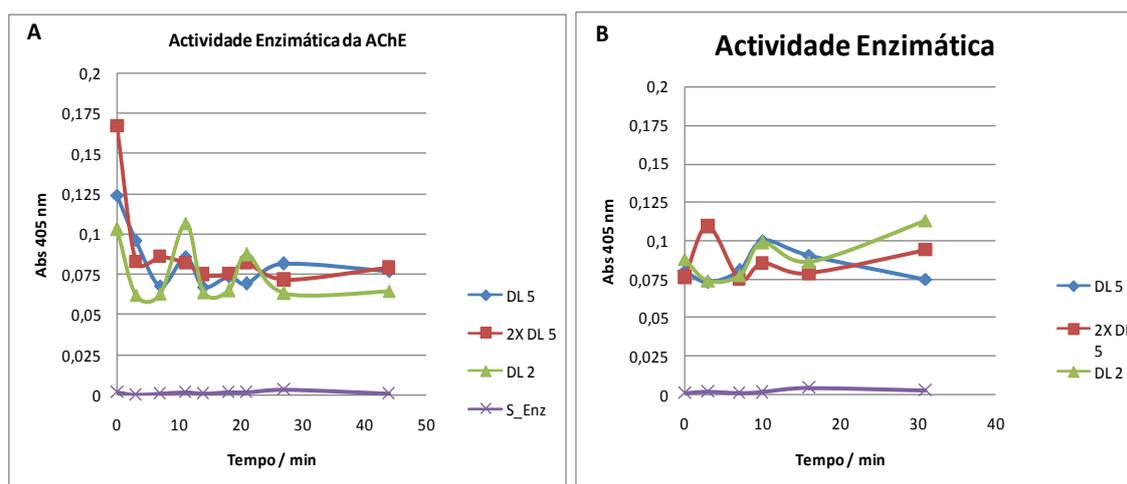


Figura 49: Estabilidade da actividade enzimática da AChE imobilizada pelo método 7.2 (2º e 3º ensaios). Representação gráfica da actividade da AChE ao longo do tempo, quando imobilizada em microplacas com APTES, GA, quitosano e  $\text{NaBH}_4$ , e armazenada em tampão HEPES 50 mM, pH 8,0 a 4°C. A – 2º ensaio; B – 3º ensaio.

#### 4.10.4.6 Ensaio de Actividade dos sobrenadantes do 2º ensaio de Imobilização pelo método 7.2

Os sobrenadantes do ensaio anterior foram analisados através de um ensaio de actividade e os resultados obtidos são apresentados no Quadro 21.

Quadro 21: Actividade enzimática dos sobrenadantes de AChE imobilizada pelo método 7.2, com APTES, GA, quitosano e  $\text{NaBH}_4$  em placas de PS (sobrenadantes do 2º ensaios), em UA/min. Valores de actividade calculados directamente do declive da absorvência a 405 nm em função do tempo.

Condição	Ensaio	Sobrenadante	DL 5	2X DL 5	DL 2	S_Enz	Água
APTES 10 + GA 2,5 + Quitosano 1 + $\text{NaBH}_4$	Ensaio 2	Enzima	0,011	0,001	0,026	0,001	0
		$\text{NaBH}_4$	0,001	0,006	0,018	0	0,001
	Ensaio 3	Enzima	0,027	0,059	0,191	0,001	---

Os baixos valores de actividade enzimática obtidos para os sobrenadantes (Quadro 21), indicam que a quantidade de proteína nestas soluções é reduzida, sinal se que a maioria do enzima ficou imobilizado na microplaca. Isto comprova os bons resultados dos ensaios de imobilização verificados anteriormente na Figura 49.

O método 7.2 foi testado uma quarta vez (dados não mostrados) tendo sido obtidos resultados de actividade semelhantes aos dos três ensaios anteriores.

## **5.DISSCUSSÃO E CONCLUSÕES**

Ao longo deste projecto estudaram-se diversos métodos de imobilização, procurando o mais eficaz e estável. Na maioria dos métodos testados recorreu-se ao uso de soluções químicas para a ligação do enzima à microplaca, pois a imobilização por adsorção passiva é pouco eficaz e o enzima perde a sua actividade e sofre desnaturação considerável. As superfícies de PS das microplacas podem ser modificadas para introduzir grupos funcionais específicos. Em geral, são incorporados à superfície grupos hidroxilo, carbonilo e carboxilo [77]. De referir que se utilizaram microplacas de PS, pois para além de serem economicamente acessíveis são preferíveis às de polipropileno pois tendem a libertar compostos tóxicos [80].

Na grande maioria dos métodos utilizados, o grupo amina é introduzido à superfície das MTPs para possibilitar a ligação covalente a proteínas. Assim, maioritariamente as MTPs são tratadas com/por fenilalanina-lisina, nitração-redução, irradiação gama, tratamentos com plasma (plasma de nitrogénio ou amónio) e carbodiimidas. A este passo por norma segue-se uma activação da superfície aminada, sendo posteriormente possível o acoplamento covalente a grupos funcionais (aminas primárias, tióis e carboxilos) de biomoléculas através de crosslinkers bifuncionais (ex. glutaraldeído e carbodiimida) [77].

O primeiro método de imobilização efectuado baseia-se no princípio geral de imobilização com GA [67, 71, 77]. De todos os agentes existentes, com capacidade de estabelecer ligações cruzadas, o GA é o mais utilizado pois a reacção de imobilização ocorre por norma em solução tampão aquosa sob condições de pH, força iónica e temperatura suaves próximas das fisiológicas.

O GA é um dialdeído solúvel em todas as proporções de água e álcool, assim como em solventes orgânicos. O seu grande sucesso advém também do seu baixo custo e da sua elevada reactividade [67].

Numa solução aquosa de GA podem encontrar-se pelo menos 13 formas diferentes dependendo das condições de solução, tais como pH, temperatura, concentração, etc. Por este motivo a estrutura do glutaraldeído em solução aquosa tem sido objecto de estudo. A sua estrutura pode variar desde o GA monomérico a formas poliméricas. Isto em parte sucede porque a polimerização ocorre espontaneamente em soluções aquosas, à temperatura ambiente [67].

Assim, estabeleceu-se que soluções aquosas de glutaraldeído consistem em glutaraldeído livre (estrutura I, Figura 50), o hemiacetal cíclico do seu hidratado (estrutura IV, Figura 50), e oligómeros deste (estrutura V Figura 50), tudo em equilíbrio e em proporções diferentes em função da temperatura (Figura 50). O GA comercialmente disponível é uma mistura de multicomponentes das possíveis formas de GA em solução aquosa [67].

Existe muita literatura sobre a utilização de GA como agente de crosslinking com proteínas, havendo indicação de que pode reagir por vários mecanismos de reacção, tais como a condensação aldólica ou a adição de Michael. Apesar das diversas tentativas de compreender estes mecanismos os procedimentos de crosslinking com glutaraldeído são em grande parte desenvolvidos através de observação empírica [67].

A reacção do GA com proteínas pode ocorrer com vários grupos funcionais, tais como amina, tiol, fenol e imidazol, pois o aminoácido mais reactivo das cadeias laterais actua como um nucleófilo [67].

O GA reage reversivelmente com grupos amina ao longo de uma ampla faixa de pH ( $\geq$ pH3,0), excepto entre pH 7,0-9,0, onde apenas um pouco de reversibilidade é observada [67].

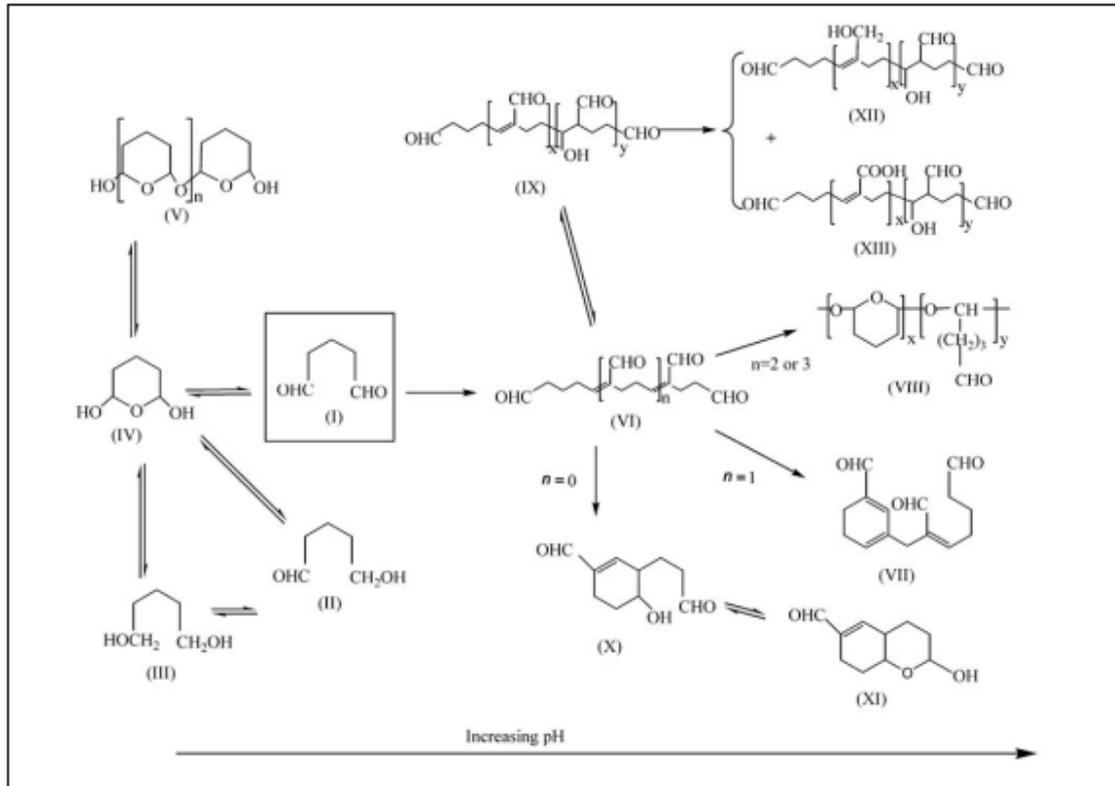


Figura 50: Resumo das possíveis formas do GA em solução aquosa (adaptado da referência 67)

O crosslinking com proteínas ocorre geralmente com os grupos amina dos resíduos de lisina, que funcionam como bons agentes nucleofílicos. A maioria das proteínas contém muitos resíduos de lisina, normalmente localizados na superfície da proteína, os quais não estão envolvidos no centro catalítico, o que permite ao crosslinking moderado preservar a conformação das proteínas e, assim, a sua actividade biológica [67].

De entre todos os mecanismos de reacção possíveis destacam-se a adição de Michael (reacção 2, Figura 51) e a formação de bases de Schiff (reacção 1, Figura 51). Na adição de Michael a reacção envolve a adição conjugada dos grupos amina da proteína a ligações duplas etilénicas dos oligómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados encontrados nas soluções aquosas comerciais de glutaraldeído. No segundo caso, a adição ocorre por parte do aldeído dos polímeros  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados (e poliglutaraldeídos) para dar uma base de Schiff (imina) estabilizada por conjugação [67].

De acordo com a literatura, neste primeiro método de imobilização, o GA é utilizado para activar a microplaca ficando grupos aldeído à superfície disponíveis para interaccionar com os grupos amina das moléculas de enzima. Esta reacção conduz à formação de bases de Schiff [67].

Os baixos valores de actividade obtidos poderão estar relacionados com a baixa disponibilidade de grupos aldeído, devido à polimerização descontrolada deste reagente. Porém, o problema deverá estar relacionado maioritariamente com o enzima, cuja

conformação adquirida impediu a disponibilidade dos grupos amina para o acoplamento com os poços activados com GA [71].

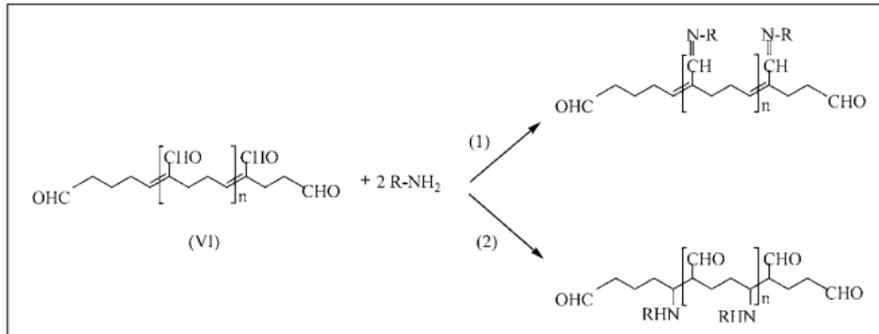


Figura 51: Reacções do GA com proteínas. (1) Formação de bases de Schiff; (2) Adição de Michael (imagem adaptada da referência 67)

O segundo método de imobilização difere ligeiramente do anterior, pois previamente à incubação com GA, a superfície de PS da microplaca foi funcionalizada com grupos amina usando o reagente APTES [72].

A funcionalização do PS ocorre através de um passo de silanização com APTES. Previamente a placa foi incubada com uma mistura de ácidos para gerar grupos NO<sub>2</sub> na superfície de PS. A solução de APTES gera grupos NH<sub>2</sub> na superfície da MTP. Um passo fundamental neste método é a cura das microplacas a 62°C para melhorar a ligação do APTES à superfície de PS, e também permitir a formação de uma monocamada de grupos NH<sub>2</sub> na superfície [72].

Neste método o electrão retirado dos grupos nitro na superfície de PS dirige um ataque eletrofílico ao grupo silano na sua posição meta permitindo a ligação das moléculas de APTES à superfície de PS (Figura 52) [72].

A ligação do GA dá-se por condensação aldólica e a ligação dos grupos aldeído do GA aos grupos amina do enzima conduz à formação de bases de Schiff (iminas) [67].

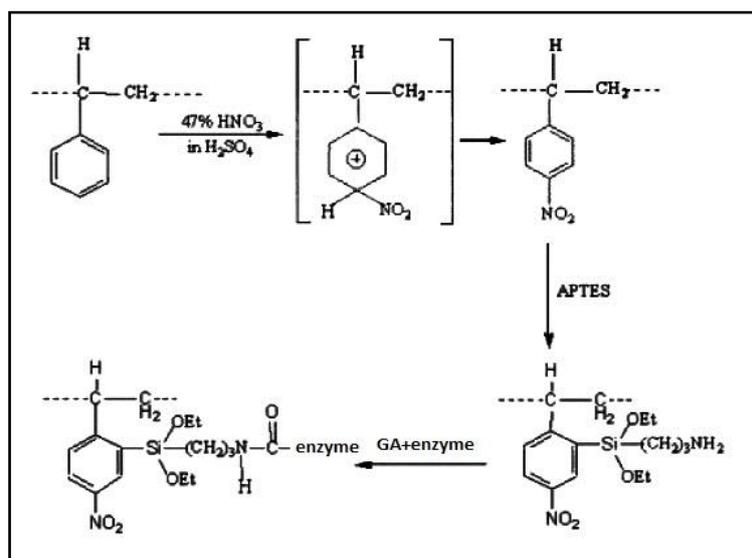


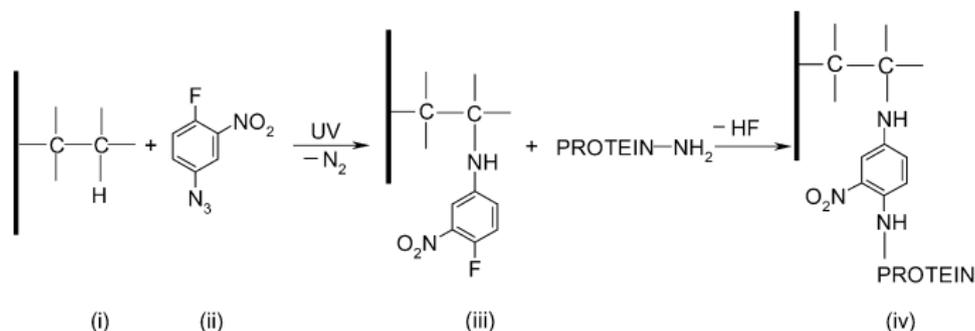
Figura 52: Mecanismo de reacção do método de imobilização com APTES. Geração de grupos NO<sub>2</sub> por incubação com solução de ácido, silanização com APTES e formação de bases de Schiff entre o GA e o enzima. (imagem adaptada da referência 72)

No terceiro método de imobilização, o enzima foi imobilizado sob duas condições distintas. Sob a primeira condição foi aprisionado sob um polímero designado Ion Jelly® e possivelmente ficou impedido de interactuar com o substrato, devido a problemas difusionais, daí os valores de actividade quase nulos. Sob a segunda condição, o enzima foi aplicado posteriormente à formação do polímero nos poços das microplacas. A imobilização deverá ter ocorrido em pequena quantidade por adsorção e a maioria do enzima foi com certeza eliminado para o sobrenadante aquando da lavagem após a incubação [71, 74].

No método quatro, imobilização em placas aminadas, a imobilização ocorre de modo equivalente ao método dois. Neste caso, a superfície de PS já possui grupos amina inseridos de fábrica que irão reagir com o GA, tal como no método anterior. Os resultados obtidos para este método foram pouco satisfatórios, indicado a não necessidade de recorrer a estas microplacas alteradas, até porque melhores resultados foram alcançados pelo método dois que usa simples microplacas de PS. Por outro lado, isto pode indicar que a reacção de activação com glutaraldeído é independente da estrutura da superfície da placa, e o grupo funcional (como grupo amina) que pode se ligar com o grupo aldeído não seja necessariamente preciso [73].

O quinto método, imobilização em superfícies fotoactivadas, difere dos restantes, pois recorre à activação fotoquímica. Segundo os autores, este é um método simples de um só passo que conduz a uma melhoria da velocidade e sensibilidade da técnica de ELISA [75, 76].

A reacção geral de imobilização covalente de uma proteína numa superfície fotoquimicamente activada é descrita na Figura 53 [75, 76].



**Figura 53: Representação esquemática da activação fotoquímica de uma superfície inerte para imobilização de uma proteína.** Uma superfície sólida com grupos C-H à superfície (i) reage com o 1-fluoro-2-nitro-4-azidobenzeno (ii) sob radiação UV a 365 nm para produzir um suporte activado (iii) com um grupo fluoro lábil. A proteína reage com a superfície activada para produzir uma proteína imobilizada (iv). (imagem adaptada da referência 75)

O grupo azido do FNAB (ii) sob a excitação UV é transformado num nitreno altamente reactivo que é inserido nas ligações C-H do polímero (i) por uma ligação covalente enquanto o grupo fluoro activo do FNAB, agora parte do polímero, permanece intacto. O polímero activado (iii) liga-se à proteína com o deslocamento do seu grupo fluoro pelo grupo amina da proteína produzindo uma proteína imobilizada (iv) [75].

As grandes vantagens deste método residem no facto de ser um método simples, rápido e sensível. O tempo ideal de incubação da solução de enzima é de cerca de 45 min a 37°C e a microplaca fotoactivada apresenta uma elevada sensibilidade mesmo em concentrações baixas de enzima [75, 76].

O sexto método testado, imobilização com quitosano, é um método com múltiplos passos e um pouco demorado, porém é um método simples e eficiente. Além disso, os reagentes usados são relativamente baratos. Este método baseia-se no mesmo princípio que os métodos dois e quatro, recorrendo ao GA como agente de crosslinking, mas utiliza também o quitosano (Figura 54) como molécula espaçadora para derivatização da superfície da MTP [77].

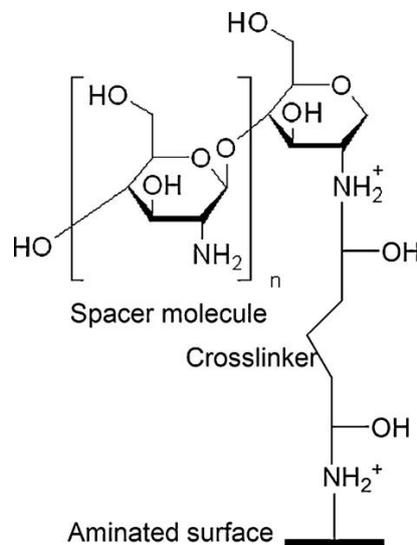


Figura 54: Esquema da estratégia de derivatização com moléculas espaçadoras na superfície de microplacas aminadas para a imobilização de proteínas. Crosslinker: Glutaraldeído; Spacer molecule: quitosano. (imagem adaptada da referência 77)

De acordo com os autores as condições recomendadas incluem GA 2,5% para activar a MTP de reacção, quitosano 1% numa solução de HAc para aumentar a capacidade de ligação, BSA 2% para bloquear os sítios de ligação inespecífica, e NaBH<sub>4</sub> 0,1 M para estabilizar os intermediários das bases de Schiff [77].

Este método realizou-se com placas aminas de modo a existirem grupos amina à superfície que possam reagir com o GA. No entanto, o mesmo método foi testado com placas simples de PS. Os resultados equivalentes mais uma vez provam a não necessidade de usar placas modificadas.

Se a concentração do agente de crosslinking for bem controlada é possível a interacção dos grupos amina da matriz com uma ou duas moléculas de GA. De acordo com os autores deste método, a quantidade de enzima imobilizado é directamente proporcional à concentração de GA, todavia tendo em conta a toxicidade do reagente, é aconselhada a concentração de 2,5% (v/v), a qual foi utilizada na maioria dos ensaios. Após esta activação efectuou-se uma incubação com uma molécula espaçadora, o quitosano 1%, com o intuito de fornecer mais potenciais sítios de ligação para cada grupo NH<sub>2</sub> gerado na superfície de PS e reduzir os efeitos ambientais locais devido aos grupos da matriz e aos impedimentos estéricos.

Uma vez que num poço de uma MTP existe um grande número de moléculas, há também uma grande densidade de grupos amina, a qual é importante para aumentar a capacidade de ligação. A incubação com quitosano é importante para criar uma estrutura tridimensional que gere espaçamento suficiente nas superfícies e evitar obstáculos estéricos laterais.

Após a incubação com quitosano, foi necessária uma segunda activação com GA para fornecer locais para o acoplamento para o enzima que ocorre pelos meios já identificados e descritos anteriormente na explicação do método 1 [71].

Mas este método teve ainda um passo adicional, o qual é necessário porque as bases de Schiff formadas entre os grupos aldeído do GA e os grupos amina do enzima não são tipicamente estáveis o suficiente para formar ligações irreversíveis. Este passo adicional consistiu numa redução com  $\text{NaBH}_4$  0,1 M para estabilizar os intermediários das bases de Schiff [77].

Um outro passo de importância relevante neste método foi a incubação com BSA de modo a bloquear os restantes grupos reactivos inespecíficos, bloqueando ao mesmo tempo os locais de adsorção hidrofílicos e/ou hidrofóbicos não-específicos na microplaca de PS aminada. A inclusão de Tween 20 ao tampão HEPES 50 mM pH 8,0 no último passo de lavagem foi também essencial para a remoção das biomoléculas não ligadas ou fisicamente presas [77].

Com este método de imobilização obtiveram-se elevados valores de actividade enzimática, indicadores de elevada quantidade de enzima imobilizado.

O último método ensaiado consistiu numa fusão dos métodos dois e seis. A grande vantagem deste método é que pode ser usado com placas simples de PS [72, 77].

Inicialmente, tal como no método dois ocorreu a silanização do PS com APTES para gerar grupos amina à superfície, com o tratamento prévio com a mistura de soluções de ácidos. Após a incubação com APTES seguiram-se os passos correspondentes ao método seis, incubações com GA, quitosano e  $\text{NaBH}_4$ . Neste ensaio foi excluída a incubação com BSA pois os resultados obtidos demonstraram não ser necessária. Mais uma vez o acoplamento final com o enzima ocorre por meio de bases de Schiff [72, 77].

As condições de incubação das várias soluções devem ser bem controladas de modo a tornar a imobilização mais eficiente.

De acordo com alguns autores a incubação com GA deve ocorrer a temperaturas mais elevadas, no entanto sob estas condições poderá verificar-se uma polimerização não controlada do agente de crosslinking e a desnaturação do enzima.

A incubação com GA também deve ocorrer a pH controlado, inferior a 10,0, pois para valores superiores de pH começa a ocorrer uma reacção de Cannizzaro em conjunto com a condensação aldólica. A reacção de Cannizzaro leva a dismutação do grupo aldeído a grupos hidroxilo e carboxilo. O aparecimento desses grupos funcionais pode causar uma diminuição da hidrofobicidade do polímero de GA, resultando numa interacção reduzida com a superfície hidrofóbica da MTP. No entanto, para pHs inferiores a 10 a dismutação Cannizzaro procede lentamente, sendo a formação do polímero maioritariamente dependente da condensação aldólica [71].

Também as concentrações dos reagentes de incubação foram testadas. Variaram-se as concentrações de APTES e GA. De modo geral não se verificaram alterações significativas na actividade enzimática devido a estas variações de concentração. Da literatura sabe-se que a

estabilidade do enzima imobilizado é superior com o uso de concentrações de GA mais elevadas [71], mas por motivos de toxicidade concentrações mais baixas são aconselhadas. Portanto, as concentrações de APTES 5% e GA 2,5% foram as seleccionadas para a maioria dos ensaios efectuados.

No que diz respeito ao tempo de incubação com a solução enzimática, este deverá ser prolongado, pois deste modo é possível reduzir a quantidade de enzima em solução e obter valores de imobilização equivalente aos obtidos para tempos de incubação reduzidos com soluções enzimáticas mais concentradas. Por este motivo são aconselhados tempos de incubação de cerca de 18h os quais foram aplicados em todos os ensaios [71].

O ensaio de actividade é efectuado ao pH óptimo do enzima. O pH escolhido para o estudo de um sistema enzimático deve ter um valor suficientemente próximo do óptimo para que a reacção possa ocorrer com uma velocidade considerável. Os enzimas são moléculas que se tornam frágeis quando retirados do seu ambiente natural. Uma mudança na temperatura, pH ou força iónica do meio pode causar desnaturação [45].

Os perfis de temperatura e pH ajudaram a perceber o comportamento do enzima face às variações destes dois parâmetros. O pH da reacção e das soluções deve ser próximo do neutro, com preferência para o valor de 8,0. A escolha deste valor é suportada por inúmera bibliografia que refere o mesmo como o ideal [20, 22, 51, 56]. Sob condições de pH ácido as bases de Schiff são muito instáveis e tendem a quebrar a ligação e a regenerar os grupos aldeído e amina. A pHs muito básicos, essencialmente na fase de armazenamento, devido à água eliminada na formação das bases de Schiff e à exposição prolongada a soluções de tampão, poderá ocorrer o enfraquecimento da ligação e conduzir a uma libertação gradual do enzima [67]. A temperatura de 30°C determinada como a ideal pelo perfil de temperatura é também confirmada pelos vários estudos com este enzima já publicados [20, 22, 51].

De modo geral, os métodos dois, seis e sete apresentaram bons resultados os quais foram comprovados pelos ensaios de estabilidade. Os valores de actividade alcançados de cerca de 50% em relativamente à actividade inicial do enzima livre estão de acordo com o valores encontrados na literatura de para outros métodos de imobilização deste enzima. Para imobilização em membranas de um copolímeros de acrilonitrilo modificados [51] os autores referem actividades relativas entre 50% a 84%. No caso da imobilização da AChE em membranas de nanofibras PVA/BSA por electrospinning [56] a actividade relativa alcançada é de 40%.

O enzima imobilizado pelos métodos dois, seis e sete poderá ser armazenado e reutilizado em vários ensaios tendo a capacidade de manter a sua actividade estável por vários dias. As pequenas perdas de actividade visíveis ao longo dos ensaios de estabilidade, em particular logo no início da maioria destes, deveram-se provavelmente a algum enzima que possa ter sido imobilizado por adsorção. A manutenção da actividade verificada mesmo após grandes tempos de armazenamento como 60 dias, indicam que os métodos de imobilização em questão, relativamente a uma solução de enzima livre, diminuem a desnaturação e aumentam a resistência e a estabilidade do enzima imobilizado.

Conclui-se assim que apesar de os métodos de imobilização para ensaios de actividade por ELISA terem várias falhas, como valores inconsistentes de ELISA em diferentes poços e placas, tempos de incubação longos, resultados não reprodutivos devido ao desprendimento

das biomoléculas durante as lavagens, e menor sensibilidade, a ligação covalente é mais sensível e minimiza a ligação não específica [75].

O objectivo do trabalho foi maioritariamente alcançado, uma vez que dois dos métodos testados apresentaram valores de actividade enzimática bastante satisfatórios os quais se mantiveram ao longo dos ensaios de estabilidade.

Os mesmos ensaios deverão ainda ser optimizados de modo a ser possível atingir o valor de actividade pretendido de 0,1 UA/min. Poderão ser testadas novas condições, diferentes concentrações dos reagentes utilizados e diferentes tempos de incubação. Também será importante aumentar a reprodutibilidade dos resultados, pois para futuros estudos de inibição será crucial ter um comportamento reprodutível ao longo do tempo de vida útil do enzima. Após esta optimização deverá ser então possível efectuar estudos de inibição com fitoconstituintes de plantas tipicamente portuguesas.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- (1) Craig, Laura A., Hong, Nancy S., McDonald, Robert J., *Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease*, Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2011, 35, 1397–1409
- (2) Bell, Karen F. S., Cuello, A. Claudio, *Altered synaptic function in Alzheimer's disease*, European Journal of Pharmacology, 2006, 545, 11–21
- (3) Alloul, K., Sauriol, L., Kennedy, W., Laurier, C., Tessier, G., Novosel, S., Contadriopoulos, A., *Alzheimer's disease: a review of the disease, its epidemiology and economic impact*, Archives of Gerontology and Geriatrics, 1998, 27, 189-221
- (4) Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C., Govoni, S., *Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules*, Pharmacological Research, 2004, 50, 441–451
- (5) McGleenon, B.M, Dynan, K. B., Passmore, A. P., *Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease*, J Clin Pharmacol, 1999, 48, 471-480
- (6) Heinrich, M., Teoh, H. L., *Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge*, Journal of Ethnopharmacology, 2004, 92, 147–162
- (7) Ingkaninan, K., Best, C. M., van der Heijden, R., Hofte, A. J. P., Karabatak, B., Irth, H., Tjaden, U. R., van der Greef, J., Verpoorte, R., *High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products*, Journal of Chromatography A, 2000, 872, 61–73
- (8) Di Giovanni, S., Borloz, A., Urbain, A., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P.A., Reist, M., *In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 33, 109-119
- (9) Williams, B. J., Eriksdotter-Jonhagen, M., Granholm, A.C., *Nerve growth factor in treatment and pathogenesis of Alzheimer's disease*, Progress in Neurobiology, 2006, 80, 114–128
- (10) Racchi, M., Mazzucchelli, M., Lenzken, S. C., Porrello, E., Lanni, C., Govoni, S., *Role of acetylcholinesterase inhibitors in the regulation of amyloid precursor protein (A $\beta$ PP) metabolism*, Chemico-Biological Interactions, 2005, 157–158, 335–338

- 
- (11) Fu, A.L, Zhang, X.M., Sun, M.J., *Antisense inhibition of acetylcholinesterase gene expression for treating cognition deficit in Alzheimer's disease model mice*, Brain Research, 2005, 1066, 10 – 15
- (12) Humpel, C., *Chronic mild cerebrovascular dysfunction as a cause for Alzheimer's disease?*, Experimental Gerontology, 2011, 46, 225–232
- (13) Yang, L., He, H.Y., Zhang, X.J., *Increased expression of intranuclear AChE involved in apoptosis of SK-N-SH cells*, Neuroscience Research, 2002, 42, 261–268
- (14) Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W., *Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies*, Journal of Ethnopharmacology, 2003, 89, 261–264
- (15) Mukherjee, P. K., Kumar, V., Houghton, P. J., *Screening of Indian Medicinal Plants for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity*, Phytother. Res., 2007, 21, 1142–1145
- (16) Senol, F. S., Orhan, I., Celep, F., Kahraman, A., Dogan, M., Yilmaz, G., Sener, B., *Survey of 55 Turkish Salvia taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities*, Food Chemistry, 2010, 120, 34–43
- (17) Adewusi, E. A., Moodley, N., Steenkamp, V., *Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants*, South African Journal of Botany, 2011, 77, 638-644
- (18) García-Ayllón, M.S., Silveyra, M.X., Sáez-Valero, J., *Association between acetylcholinesterase and  $\beta$ -amyloid peptide in Alzheimer's cerebrospinal fluid*, Chemo-Biological Interactions, 2008, 175, 209–215
- (19) Contestabile, A., *The history of the cholinergic hypothesis*, Behavioural Brain Research, 2011, 221, 334–340
- (20) Tümtürk, H., Şahin, F., Demirel, G., *A new method for immobilization of acetylcholinesterase*, Bioprocess Biosyst Eng, 2007, 30, 141–145
- (21) Kamal, M. A., Greig, N. H., Alhomida, A. S., Al-Jafari, A. A., *Kinetics of Human Acetylcholinesterase Inhibition by the Novel Experimental Alzheimer Therapeutic Agent, Tolserine*, Biochemical Pharmacology, 2000, 60, 561-570
- (22) Şahin, F., Demirel, G., Tümtürk, H., *A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase*, International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 37, 148–153

- 
- (23) Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M.L.M., Araújo, M.E.M., *The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal*, Journal of Ethnopharmacology, 2006, 108, 31–37
- (24) Gil-Bea, F. J., García-Alloza, M., Domínguez, J., Marcos, B., Ramírez, M. J., *Evaluation of cholinergic markers in Alzheimer's disease and in a model of cholinergic deficit*, Neuroscience Letters, 2005, 375, 37–41
- (25) Bohnen, N. I., Kaufer, D. I., Hendrickson, R., Ivanco, L. S., Lopresti, B., Davis, J. G., Constantine, G., Mathis, C. A., Moore, R. Y., DeKosky, S. T., *Cognitive correlates of alterations in acetylcholinesterase in Alzheimer's disease*, Neuroscience Letters, 2005, 380, 127–132
- (26) Liston, D. R., Nielsen, J. A., Villalobos, A., Chapin, D., Jones, S. B., Hubbard, S. T., Shalaby, I. A., Ramirez, A., Nason, D., White, W. F., *Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease*, European Journal of Pharmacology, 2004, 486, 9–17
- (27) Terry Jr., A. V., BUCCAFUSCO, J. J., *The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development*, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2003, 306, 821–827
- (28) Mimori, Y., Nakamura, S., Yukawa, M., *Abnormalities of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease with special reference to effect of acetylcholinesterase inhibitor*, Behavioural Brain Research, 1997, 83, 25-30
- (29) Herholz, K., Weisenbach, S., Kalbe, E., *Deficits of the cholinergic system in early AD*, Neuropsychologia, 2008, 46, 1642–1647
- (30) Keverne, J., Ray, M., *Neurochemistry of Alzheimer's disease*, The Medicine Publishing Company Ltd PSYCHIATRY, 2005, 4:1, 40–42
- (31) Sáez-Valero, J., Fodero, L. R., White, A. R., Barrow, C. J., Small, D. H., *Acetylcholinesterase is increased in mouse neuronal and astrocyte cultures after treatment with b-amyloid peptides*, Brain Research, 2003, 965, 283–286
- (32) Kurz, A., Pernecky, R., *Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease*, Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 2011, 35, 373–379
- (33) Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P. J., *Acetylcholinesterase inhibitors from plants*, Phytomedicine, 2007, 14, 289–300

- 
- (34) Fisher, T. C., Crane, M., Callaghan, A., *An optimized microtiterplate assay to detect acetylcholinesterase activity in individual chironomus riparius meigen*, Environmental Toxicology and Chemistry, 2000, 19:7, 1749–1752
- (35) Kovarik, Z., Radić, Z., Berman, H.A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., Taylor, P., *Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates*, Biochem. J., 2003, 373, 33–40
- (36) Ordentlich, A., Baraks, D., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M., Segalls, Y., Ariel, N., Cohen, S., Velan, B., Shafferman, A., *Dissection of the Human Acetylcholinesterase Active Center, Determinants of Substrate Specificity, Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket*, The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268, 17083-17095
- (37) Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Ariel, N., Segall, Y., Velan, B., Shafferman, A., *The Architecture of Human Acetylcholinesterase Active Center, Probed by Interactions with Selected Organophosphate Inhibitors*, The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271, 11953–11962
- (38) Bourne, Y., Taylor, P., Radić, Z., Marchot, P., *Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site*, The EMBO Journal, 2003, 22:1–12
- (39) Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K., *The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress*, Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999, 66, 137-147
- (40) Perry, N.S.L., Bollen, C., Perry, E.K., Ballard, C., *Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial*, Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2003, 75, 651–659
- (41) Cummings, J. L., Mackell, J., Kaufer, D., *Behavioral effects of current Alzheimer's disease treatments: A descriptive review*, Alzheimer's & Dementia, 2008, 4, 49 – 60
- (42) Camejo-Rodrigues, J., Ascensão, L., Bonet, M. À., Vallès, J., *An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of "Serra de São Mamede" (Portugal)*, Journal of Ethnopharmacology, 2003, 89, 199–209
- (43) Novais, M.H., Santos, I., Mendes, S., Pinto-Gomes, C., *Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal)*, Journal of Ethnopharmacology, 2004, 93, 183–195
- (44) Dalby, P.A., *Engineering Enzymes for Biocatalysis*, Recent Patents on Biotechnology, 2007, 1, 1-9

- (45) Erginer, R., Toppare, L., Alkan, S., Bakir, U., *Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices*, *Reactive & Functional Polymers*, 2000, 45, 227–233
- (46) Li, X., Wang, X., Ye, G., Xia, W., Wang, X., *Polystyrene-based diazonium salt as adhesive: A new approach for enzyme immobilization on polymeric supports*, *Polymer*, 2010, 51, 860–867
- (47) Rozzell, J.D., *Commercial Scale Biocatalysis: Myths and Realities*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1999, 7, 2253–2261
- (48) Luetz, S., Giver, L., Lalonde, J., *Engineered Enzymes for Chemical Production*, *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 101:4, 647–653
- (49) Brandt, B., Hidalgo, A., Bornscheuer, U. T., *Immobilization of enzymes in microtiter plate scale*, *Biotechnol. J.*, 2006, 1, 582–587
- (50) Stoilova, O., Ignatova, M., Manolova, N., Godjevargova, T., Mita, D.G., Rashkov, I., *Functionalized electrospun mats from styrene–maleic anhydride copolymers for immobilization of acetylcholinesterase*, *European Polymer Journal*, 2010, 46, 1966–1974
- (51) Gabrovska, K., Nedelcheva, T., Godjevargova, T., Stoilova, O., Manolova, N., Rashkov, I., *Immobilization of acetylcholinesterase on new modified acrylonitrile copolymer membranes*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2008, 55, 169–176
- (52) Tufvesson, P., Lima-Ramos, J., Nordblad, M., Woodley, J.M., *Guidelines and Cost Analysis for Catalyst Production in Biocatalytic Processes*, *Organic Process Research & Development*, 2011, 15, 266–274
- (53) Tufvesson, P., Fu, W., Jensen, J.S., Woodley, J.M., *Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis*, *food and bioproducts processing*, 2010, 88, 3–11
- (54) Bornscheuer, U. T., *Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42, 3336–3337
- (55) Sheldon, R. A., *Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance*, *Adv. Synth. Catal.*, 2007, 349, 1289–1307
- (56) Moradzadegan, A., Ranaei-Siadat, S.O., Ebrahim-Habibi, A., Barshan-Tashnizi, M., Jalili, R., Torabi, S.F., Khajeh, K., *Immobilization of acetylcholinesterase in*

- 
- nanofibrous PVA/BSA membranes by electrospinning*, Eng. Life Sci., 2010, 10:1, 57–64
- (57) Brady, D., Jordaan, J., *Advances in enzyme immobilisation*, Biotechnol Lett, 2009, 31, 1639–1650
- (58) Bhatia, S.K., Cooney, M.J., Shriver-Lake, L.C., Fare, T.L., Ligler, F.S., *Immobilization of acetylcholinesterase on solid surfaces: chemistry and activity studies*, Sensors and Actuators B, 1991, 3, 311-317
- (59) Tischer, W., Kasche, V., *Immobilized enzymes: crystals or carriers?*, Trends in Biotechnology, 1999, 17, 326–335
- (60) Qian, W., Yao, D., Yu, F., Xu, B., Zhou, R., Bao, X., Lu, Z., *Immobilization of Antibodies on Ultraflat Polystyrene Surfaces*, Clinical Chemistry, 2000, 46:9, 1456–1463
- (61) Bucura, B., Danet, A.F., Marty, J.L., *Cholinesterase immobilisation on the surface of screen-printed electrodes based on concanavalin A affinity*, Analytica Chimica Acta, 2005, 530, 1–6
- (62) Bartolini, M., Cavrini, V., Andrisano, V., *Choosing the right chromatographic support in making a new acetylcholinesterase-micro-immobilised enzyme reactor for drug discovery*, Journal of Chromatography A, 2005, 1065, 135–144
- (63) Sotiropoulou, S., Chaniotakis, N.A., *Tuning the sol–gel microenvironment for acetylcholinesterase encapsulation*, Biomaterials, 2005, 26, 6771–6779
- (64) Sheldon, R.A., *Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)*, Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 92, 467–477
- (65) López-Serrano, P., Cao, L., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., *Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases*, Biotechnology Letters, 2002, 24, 1379–1383
- (66) Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., *Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions*, Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39, 877–882
- (67) Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., Waldron, K.C., *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*, BioTechniques, 2004, 37, 790-802

- (68) Vakurov, A., Simpson, C.E., Daly, C.L., Gibson, T.D., Millner, P.A., *Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection I. Modification of carbon surface for immobilization of acetylcholinesterase*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 20, 1118–1125
- (69) Vakurov, A., Simpson, C.E., Daly, C.L., Gibson, T.D., Millner, P.A., *Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection II. Immobilization and stabilization of acetylcholinesterase*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20, 2324–2329
- (70) Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres JR. V., Featherstone, R., *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7, 88-95
- (71) Ukeda, H., Fujita, Y., Ohira, M., Sawamura, M., *Immobilized Enzyme-Based Microtiter Plate Assay for Glucose in Foods*, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 3858–3863
- (72) Kaur, J., Boro, R.C., Wangoo, N., Singh, K.R., Suri, R.S., *Direct hapten coated immunoassay format for the detection of atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides*, *Analytica Chimica Acta*, 2008, 607, 92–99
- (73) Vidinha, P., Lourenço, N.M.T., Pinheiro, C., Brás, A.R., Carvalho, T., Silva, T.S., Mukhopadhyay, A., Romão, M.J., Parola, J., Dionisio, M., Cabral, J.M.S., Afonso, C.A.M., Barreiros, S., *Ion Jelly: a tailor-made conducting material for smart electrochemical devices*, *Chem Commun.*, 2008
- (74) Matsui, T., Shimada, M., Saito, N., Matsumoto, K.,  *$\alpha$ -Glucosidase Inhibition Assay in an Enzyme-immobilized Amino-microplate*, *Analytical Sciences*, 2009, 25, 559–562
- (75) Bora, U., Chugh, L., Nahar, P., *Covalent immobilization of proteins onto photoactivated polystyrene microtiter plates for enzyme-linked immunosorbent assay procedures*, *Journal of Immunological Methods*, 2002, 268, 171–177
- (76) Nahar, P., Moza, N., Gandhi, R.P., *Light-Induced Activation of an Inert Surface for Covalent Immobilization of a Protein Ligand*, *Analytical Biochemistry*, 2001, 294, 148–153
- (77) Zhang, Y., Zhang, Y., Jiang, J., Li, L., Yu, C., Hei, T., *Surface derivatization with spacer molecules on glutaraldehyde-activated amino-microplates for covalent immobilization of  $\beta$ -glucosidase*, *Applied Surface Science*, 2011, 257, 2712–2716
- (78) Bradford, M.M., *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, 248-254
- (79) Fernandes, P., *Miniaturization in Biocatalysis*, *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 858-879

# **ANEXOS**

# ANEXO I

## Doseamento proteico pelo método do BCA dos sobrenadantes do 1º ensaio de imobilização com GA

O doseamento dos sobrenadantes foi efectuado através do método com BCA. Este método recorre a um kit comercialmente disponível e o procedimento foi descrito em 3.2.5.2.

Inicialmente procedeu-se à preparação das soluções padrão de proteína BSA de acordo com o Quadro 22, como indicado no protocolo fornecido pela empresa que comercializa o kit. As mesmas foram posteriormente analisadas de modo a se obter uma recta de calibração (Figura 55).

Quadro 22: Valores de absorvência a 562 nm das soluções padrão para o doseamento proteico pelo método do BCA

Solução	Concentração (µg/mL)	Mediana de Abs	Med Abs corrigida
A	2000	2,0015	1,8853
B	1500	1,7833	1,6671
C	1000	1,3535	1,2373
D	750	1,111	0,9948
E	500	0,8565	0,7403
F	250	0,5107	0,3945
G	125	0,3756	0,2594
H	25	0,1871	0,0709
I (branco)	0	0,1162	0

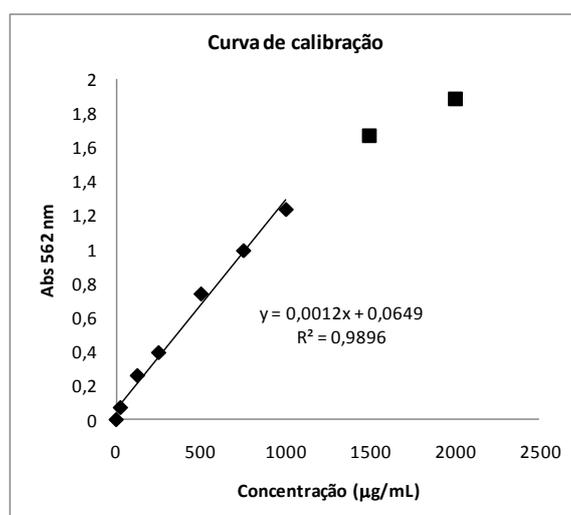


Figura 55: Curva de calibração obtida através da representação gráfica da absorvência a 562 nm das soluções padrão em função da concentração proteica da proteína padrão, BSA

## ANEXO II

### Doseamento proteico pelo método do BCA dos sobrenadantes do 2º ensaio de imobilização com GA

Tendo em conta o valor obtido para a recta de calibração traçada para este ensaio,  $Y=0,0010x+0,0780$ ;  $R^2=0,9897$  foi possível determinar a concentração proteicas das várias soluções analisadas. Os resultados obtidos para as soluções enzimáticas originais sujeitas ao processo de imobilização, soluções de GA originais e soluções de GA sujeitas ao processo de imobilização são apresentados nos Quadros 23, 24, 25 e 26. Foram testadas soluções de GA 1%, 2%, 2,5% e 5%.

**Quadro 23: Doseamento proteico das soluções enzimáticas originais livres, pelo método de BCA.** Absorvência a 562 nm e respectiva concentração proteica

Solução	Mediana de Abs	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
D	0,1731	95,1000
DL5	0,3236	245,6000
DL2	0,9413	863,3000
MD	0,3685	290,5000
AChED	0,1864	108,4000

**Quadro 24: Doseamento proteico das soluções enzimáticas livres sujeitas ao processo de imobilização, pelo método de BCA.** Absorvência a 562 nm e respectiva concentração proteica

Solução	Mediana de Abs	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
DL 10 L	0,7528	674,8000
DL 5 L	1,0983	1020,3000
DL 2 L	0,6284	550,4000
MD L	0,4488	370,8000
AChE L	0,7099	631,9000

**Quadro 25: Doseamento proteico das soluções de GA originais, pelo método de BCA.** Absorvência a 562 nm e respectiva concentração proteica

Solução	Mediana de Abs	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
GA1	0,1693	91,3000
GA2	0,1746	96,6000
GA3	0,1724	94,4000
GA4	0,1811	103,1000

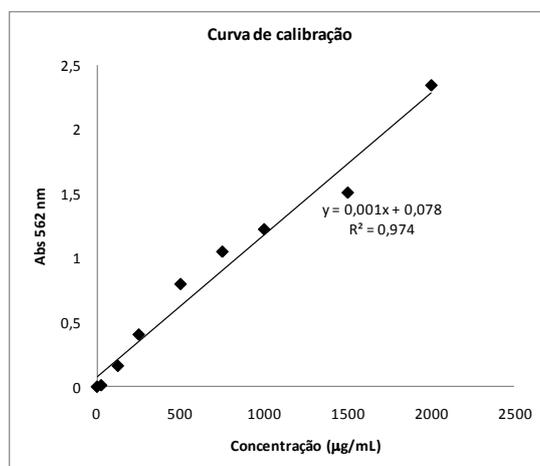
**Quadro 26:** Doseamento proteico das soluções de GA sujeitas ao processo de imobilização, pelo método de BCA. Absorvência a 562 nm e respectiva concentração proteica

Solução	Mediana de Abs	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
GA1 I	1,0468	968,8000
GA2 I	0,6644	586,4000
GA3 I	0,5060	427,9500
GA4 I	0,9172	839,1500

## ANEXO III

### Doseamento proteico pelo método do BCA dos sobrenadantes do 1º ensaio de imobilização com APTES

De seguida é apresentada a curva padrão determinada para o doseamento proteico dos sobrenadantes do 1º ensaio de imobilização com APTES (Figura 56).



**Figura 56:** Curva de calibração obtida através da representação gráfica da absorvência a 562 nm das soluções padrão em função da concentração proteica da proteína padrão, BSA

