

Diogo Alexandre Siebert

**MICROANÁLISE MEDIADA POR ELETROFORESE CAPILAR
(EMMA) E MICRORREATOR DE ENZIMA IMOBILIZADA
(IMER) COMO MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA
DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo A. Micke.

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Siebert, Diogo Alexandre

Microanálise Mediada por Eletroforese Capilar
(EMMA) e Microrreator de Enzima Imobilizada (IMER)
como Métodos Alternativos para Determinação de
Atividade Enzimática / Diogo Alexandre Siebert ;
orientador, Gustavo Amadeu Micke, 2019.

128 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

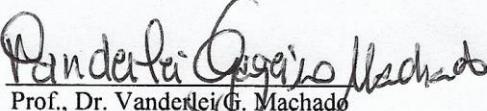
1. Química. 2. Eletroforese Capilar. 3.
Microanálise Mediada por Eletroforese Capilar. 4.
Enzimologia. I. Micke, Gustavo Amadeu. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Química. III. Título.

Diogo Alexandre Siebert

**MICROANÁLISE MEDIADA POR ELETROFORESE
CAPILAR (EMMA) E MICRORREATOR DE ENZIMA
IMOBILIZADA (IMER) COMO MÉTODOS
ALTERNATIVOS PARA DETERMINAÇÃO DE
ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

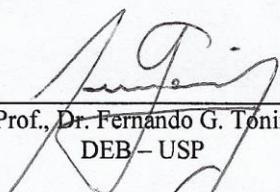
Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

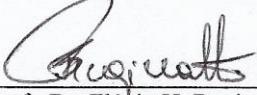
Florianópolis, 05 de abril de 2019.

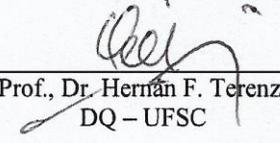

Prof., Dr. Vanderlei G. Machado
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:


Prof., Dr. Gustavo A. Micke
Orientador
DQ – UFSC


Prof., Dr. Fernando G. Tonin
DEB – USP


Prof., Dr. Flávio H. Reginatto
DCF – UFSC


Prof., Dr. Hernán F. Terenzi
DQ – UFSC

Prof.^a, Dr.^a Alessandra V. Jager
Suplente
DFQ – USP

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo agradeço aos meus queridos pais Marcel Siebert e Sandra Patrícia Siebert pelo dom da vida, pelo amor, pelo apoio e incentivo e, acima de tudo, por me guiarem no caminho da vida; à minha querida irmã Ariane Luiza Siebert por todo o amor, parceria e companheirismo; e a toda minha família, por sempre me apoiarem e incentivarem em todas as etapas da minha vida.

À minha querida esposa Michele Debiasi Alberton, obrigado pelas amostras de produtos naturais utilizadas neste estudo. Além de ser minha companheira de todas as aventuras, amiga e parceira de trabalho, não mede esforços em me apoiar e ajudar em todas as minhas jornadas. Obrigado pelo nosso sincero e lindo amor!

Ao meu mestre, querido e sempre alegre orientador Professor Dr. Gustavo Amadeu Micke, por me guiar no caminho da química analítica; e por todos os ensinamentos, por muitas vezes não apenas de cunho acadêmico. Obrigado por aceitar embarcar e me orientar nessa jornada, e por todos os divertidos e bons momentos vividos!

Ao Professor Dr. Luciano Vitali, por todo o apoio no estudo de microrreator de enzima imobilizada, este caminho não teria nem sido trilhado se não fosse a sua apurada percepção da oportunidade que estava bem a nossa frente. E também por todo o suporte, ajuda e orientação nas análises de compostos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS. Obrigado pelos bons momentos compartilhados!

Aos meus queridos amigos, Samantha Gonçalves, Victor Alves, Daniel Spudeit e Juliana Bastos por todo o auxílio no laboratório e os ótimos momentos que vivemos juntos. O convívio do dia-a-dia dentro e fora da Universidade fez surgir uma sincera e bonita amizade. Que minha saúde e o universo me permitam desfrutar da companhia de vocês por muito tempo!

A todos os meus queridos colegas de laboratório, em especial, Juliana Campos, que topou embarcar nessa jornada e fazer de parte de meus estudos seu TCC; Ana Paula Ruani, Alysson Sako, Carolina Cardoso, Lizandra Bretanha, Joana Sardá, Kheytyany Lopes, Vitor Debatin Vieira, Roberta Sulzbacher, Giuliana Nardini, Riani Salvio, Bruno Cavagnoli, Vinícius Haddad, Mayara Silva e Roberta Ramos.

À doutoranda Natália Bruzamarello Caon e ao Professor Dr. Alexandre Luis Parize do Laboratório de Estudo em Materiais Poliméricos da UFSC por toda a parceria, ajuda e orientação no estudo de

microrreator de enzima imobilizada. Desejo sucesso na conclusão de seu doutorado e espero podermos manter as parcerias e contribuições.

Ao Professor Dr. Fabricio Luiz Fanta do Instituto de Física da UFRGS pela parceria na realização das análises de difração de raios-x e magnetometria de amostra vibrante.

À mestranda Flávia de Mello pelas análises de fenólicos e flavonoides totais.

A todos os meus amigos de fora da Universidade, em especial Everton e Jéssica, Yago, André, Leonardo dos Santos, Leonardo Haut, Bruno e Cintia, Douglas, Diego, Maurício, Emanuel, Henrique, Fabrício, Anderson, Bill, Osmar, Ricardo e Alexandre por toda a amizade e parceria de mais de 15 anos!

Aos membros da banca Fernando Gustavo Tonin, Flávio Henrique Reginatto, Hernán Francisco Terenzi e Alessandra Vincenzi Jager por toda contribuição.

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Departamento de Química e o INCT-Catálise pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa; e ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

A todos aqueles que, mesmo de longe, direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

*Na vida, não existe nada a temer,
mas a entender.*

Marie Curie,

RESUMO

Para se fazer a avaliação de atividades biológicas são utilizadas várias técnicas, desde as mais simples até as mais sofisticadas. Ensaios *in vitro* podem ser realizados na própria bancada do laboratório de química, uma vez que apresentam resultados rápidos e eficazes. Como exemplo, podemos citar ensaios de avaliação da atividade de amostras sobre uma enzima alvo relacionada à algum tipo de condição fisiopatológica. Dentre as técnicas analíticas hoje difundidas pelo meio científico, a eletroforese capilar vem crescendo nas últimas décadas e pode ser empregada para o desenvolvimento de métodos para avaliação de atividades enzimáticas, através de métodos de microanálise mediada por eletroforese capilar (EMMA). Dentre as enzimas importantes em processos fisiopatológicos, destacam-se aqui a acetilcolinesterase (AChE), importante no tratamento da doença de Alzheimer e a α -glicosidase, com participação crítica no diabetes. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver métodos de EMMA e de microrreator de enzima imobilizada (IMER) aplicados no rastreio de novos agentes terapêuticos aplicados a estas enzimas. Foram desenvolvidas três modalidades de métodos para avaliação de atividade enzimática. Na primeira, foram desenvolvidos dois métodos, um para AChE e outro para α -glicosidase, por injeções múltiplas, para a obtenção de dois resultados em um mesmo experimento. Os métodos tiveram seus parâmetros cinéticos enzimáticos avaliados, com valores de IC_{50} para neostigmina (inibidor padrão da AChE) e acarbose (inibidor padrão da α -glicosidase) de $14,19 \pm 0,028 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,17 \pm 0,002 \text{mmol L}^{-1}$, respectivamente, sendo estes valores condizentes com a literatura ($22,2 \pm 3,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,201 \pm 0,019 \text{mmol L}^{-1}$, respectivamente). Este método foi aplicado em sucos de frutas, destacando-se os de jaboticaba (*Plinia cauliflora*, que apresentou inibição de $85,90 \pm 1,73 \%$ da AChE à 5mg mL^{-1}) e pitanga (*Eugenia uniflora*, inibição de $69,47 \pm 2,89 \%$ da α -glicosidase à 1mg mL^{-1}). Vários compostos fenólicos foram identificados nos sucos por HPLC-ESI-MS/MS. Na segunda modalidade, foi desenvolvido um método duplo simultâneo para as mesmas enzimas, que apresentou valor de IC_{50} de $5,35 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,57 \text{mmol L}^{-1}$, para os inibidores neostigmina e acarbose, respectivamente. Este método foi aplicado a compostos fenólicos isolados presentes nos sucos de frutas estudados anteriormente, dos quais destacam-se o ácido *p*-cumárico (inibição de $40,14 \pm 4,7 \%$ da AChE à 10mg L^{-1}) e a quercetina (inibição de $46,53 \pm 4,9 \%$ da α -glicosidase à 10mg L^{-1}). No último estudo, a AChE foi ancorada em nanopartículas

magnéticas de ferrita de manganês, que foram utilizadas para o desenvolvimento de um microrreator de enzima imobilizada (IMER). Esse microrreator demonstrou boa estabilidade, podendo ser utilizado por aproximadamente até 25 experimentos consecutivos. Por meio deste microrreator, obteve-se uma IC_{50} para a neostigmina de $29,42 \pm 3,88 \mu\text{mol L}^{-1}$, demonstrando uma maior atividade da enzima na forma imobilizada. Este método por IMER foi aplicado a extratos vegetais de espécies da família Myrtaceae, das quais destacou-se novamente a jaboticaba (*P. cauliflora*) que inibiu a atividade da AChE em $42,31 \pm 6,81 \%$ em uma concentração de 100 mg L^{-1} . Os métodos de EMMA, propostos pela abordagem de injeções múltiplas, e o de IMER, provaram ser ferramentas poderosas para a triagem de atividade inibitória enzimática, por meio das vantagens inerentes a técnica de eletroforese capilar, como a rápida análise e o baixo consumo de amostras e reagentes. Além disso, algumas das amostras aqui estudadas podem ser consideradas para o estudo de seu uso em terapia anti-Alzheimer e anti-diabetes. Estudos futuros podem revelar que estas podem ser utilizadas como alimentos funcionais, ou em tratamentos adjuvantes para as duas doenças aqui mencionadas e possivelmente para outras.

Palavras-chave: eletroforese capilar. EMMA. IMER. Acetilcolinesterase. α -glicosidase.

ABSTRACT

In order to evaluate biological activities, several techniques are used, from the simplest to the most sophisticated. *In vitro* assays can be performed on the chemistry laboratory bench, as they present fast and effective results. As an example, we can cite assays evaluating the activity of a sample on a target enzyme related to some type of pathophysiological condition. Capillary electrophoresis has been growing in the last decades and can be used to develop methods for the evaluation of enzymatic activities through electrophoretically mediated microanalysis (EMMA). Among the important enzymes in pathophysiological processes, acetylcholinesterase (AChE), important in the treatment of Alzheimer's disease; and α -glucosidase, with a critical participation in diabetes, are highlighted here. Therefore, the objective of the present work was to develop EMMA and immobilized enzyme microreactor (IMER) methods applied in the screening of new therapeutic agents. Three modalities of methods for evaluating enzymatic activity were developed. In the first, two methods were developed, one for AChE and one for α -glucosidase, by multiple injections, to obtain two results in the same experiment. The methods had their enzymatic kinetic parameters evaluated, with IC_{50} values for neostigmine (standard AChE inhibitor) and acarbose (standard α -glucosidase inhibitor) of $14.19 \pm 0.028 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $0.17 \pm 0.002 \text{mmol L}^{-1}$, respectively. These values are consistent with the literature ($22.2 \pm 3.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $0.201 \pm 0.019 \text{mmol L}^{-1}$, respectively). This method was applied to fruit juices, especially jaboticaba (*Plinia cauliflora*, which showed inhibition of $85.90 \pm 1.73 \%$ of AChE at 5mg mL^{-1}) and pitanga (*Eugenia uniflora*, inhibition of $69, 47 \pm 2.89 \%$ of α -glucosidase at 1mg mL^{-1}). Several phenolic compounds were identified in the juice by HPLC-ESI-MS/MS. In the second modality, a double simultaneous method was developed for the same enzymes, which presented IC_{50} value of $5.35 \mu\text{mol L}^{-1}$ and 0.57mmol L^{-1} , respectively, for neostigmine and acarbose inhibitors. This method was applied to isolated phenolic compounds previously identified in the studied fruit juices, such as *p*-coumaric acid (inhibition of $40.14 \pm 4.7 \%$ of AChE at 10mg L^{-1}) and quercetin ($46.53 \pm 4.9 \%$ inhibition of α -glycosidase at 10mg L^{-1}). In the last study, AChE was anchored in magnetic nanoparticles of manganese ferrite, which were used for the development of an IMER. This microreactor showed good stability and can be used for up to 25 consecutive experiments. By means of this microreactor, an IC_{50} for neostigmine of $29.42 \pm 3.88 \mu\text{mol L}^{-1}$ was obtained, demonstrating a

greater activity of the enzyme in the immobilized form. This method by IMER was applied to plant extracts of the Myrtaceae family, of which jaboticaba (*P. cauliflora*) was more prominent, which inhibited AChE activity in 42.31 ± 6.81 % in a concentration of 100 mg L^{-1} . The EMMA methods, proposed by the multiple injection approach, and the IMER, have proven to be powerful tools for the screening of enzymatic inhibitory activity, through the inherent advantages of the capillary electrophoresis technique, such as rapid analysis and low sample and reagents consumption. In addition, some of the samples studied here may be considered for the study of their use in anti-Alzheimer's and anti-diabetes therapy. Further studies may reveal that they may be used as functional foods, or in adjuvant treatments for the two diseases mentioned herein and possibly for others.

Keywords: capillary electrophoresis. EMMA. IMER. Acetylcholinesterase. α -glucosidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico da mobilidade do fluxo eletrosmótico em função do pH.....	28
Figura 2 - Tipos de experimentos de injeções múltiplas.	30
Figura 3 - Diferentes abordagens para o estudo de reações enzimáticas por CE.	31
Figura 4 - Número de publicações na base de dados “ <i>Web of Science</i> ”, utilizando como palavra-chave o termo “ <i>electrophoretically mediated microanalysis</i> ”.	33
Figura 5 - Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima.	35
Figura 6 - Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk.	36
Figura 7 - Tipos de inibidores reversíveis e forma como afetam a equação de Michaelis-Menten.....	37
Figura 8 - Gráfico alternativo de dados obtidos a partir de gráficos de Lineweaver-Burk para determinar os valores de K_i	38
Figura 9 - Exemplos de fármacos inibidores da AChE.	40
Figura 10 - Número absoluto (milhões) de idosos no mundo em 2015 (A) e projeção para 2050 (B); no Brasil em 2015 (C) e projeção para 2050 (D).	41
Figura 11 - Reação de Ellman.	42
Figura 12 - Exemplos de fármacos inibidores da α -glicosidase.	48
Figura 13 - Reação do p-NPG com a enzima α -glicosidase.....	48
Figura 14 - Frutas utilizadas para a produção dos sucos.....	55
Figura 15 - Imagens da montagem do microrreator de enzima imobilizada.....	64
Figura 16 - Representação esquemática da injeção múltipla em EMMA dentro do capilar.....	68
Figura 17 - Comparação de eletroferogramas de EMMA de AChE em injeção simples (superior) e injeção múltipla (inferior).	68

Figura 18 - Gráfico de Michaelis-Menten (à esquerda) e seu correspondente gráfico de Lineweaver-Burk (à direita) para a reação de AChE.	69
Figura 19 - Gráfico para determinação de K_i de neostigmina.	70
Figura 20 - Gráfico de inibição da AChE na presença de neostigmina.	71
Figura 21 - Representação esquemática da injeção múltipla em EMMA dentro do capilar.	72
Figura 22 - Comparação de eletroferogramas de EMMA de α -glicosidase em injeção simples (superior) e injeção múltipla (inferior).	73
Figura 23 - Gráfico de Michaelis-Menten (à esquerda) e seu correspondente gráfico de Lineweaver-Burk (à direita) para a reação de α -glicosidase.	74
Figura 24 - Gráfico para determinação de K_i de acarbose.....	74
Figura 25 - Gráfico de inibição da α -glicosidase na presença de acarbose.	75
Figura 26 - Resultados de atividade inibitória de acetilcolinesterase e α -glucosidase e fenólicos totais dos sucos de frutas.....	77
Figura 27 - Representação esquemática da injeção múltipla em EMMA dentro do capilar.	82
Figura 28 - Exemplo de eletroferograma de EMMA duplo simultâneo para os ensaios de AChE e α -glicosidase.....	83
Figura 29 - Michaelis-Menten (à esquerda) e seu correspondente gráfico de Lineweaver-Burk (à direita) para a reação de AChE.	84
Figura 30 - Gráfico para determinação de K_i de neostigmina.	84
Figura 31 - Michaelis-Menten (à esquerda) e seu correspondente gráfico de Lineweaver-Burk (à direita) para a reação de α -glicosidase.	85
Figura 32 - Gráfico para determinação de K_i de acarbose.....	85
Figura 33 - Gráficos de inibição da AChE na presença de neostigmina (à esquerda) e inibição da α -glicosidase na presença de acarbose (à direita).	86
Figura 34 - Espectros de FTIR de $MnFe_2O_4$ (A), $MnFe_2O_4@QTS$ -enzima (B), $MnFe_2O_4@QTS$ (C) e QTS (D).....	90

Figura 35 - Curvas de aquecimento para $MnFe_2O_4$, $MnFe_2O_4@QTS$ e QTS.	92
Figura 36 - (A) Imagem de TEM da ferrita de manganês, (B) histograma da distribuição de tamanhos e (C) imagem de TEM do compósito $MnFe_2O_4@QTS$	93
Figura 37 - Difratogramas de raios-X da ferrita de manganês, com os principais planos de reflexão assinalados, e do compósito $MnFe_2O_4@QTS$	94
Figura 38 - Curvas de magnetização em função do campo aplicado para ferrita de manganês e do compósito $MnFe_2O_4@QTS$	95
Figura 39 - Bloco de ímãs de neodímio montados em arranjo Halbach, face lateral (à esquerda) e face superior (à direita), onde é afixado o capilar.	96
Figura 40 - Simulação do campo magnético dos ímãs em arranjo de Halbach.	97
Figura 41 - Imagem obtida com microscópio óptico em aumento de 100x (à esquerda) e com lupa de aumento de 5x (à direita) da região com os ímãs em arranjo de Halbach após a introdução das MNPs funcionalizadas.	97
Figura 42 - Esquema de acondicionamento dos ímãs em arranjo de Halbach dentro do cartucho do equipamento de eletroforese capilar, juntamente com o capilar utilizado.	98
Figura 43 - Exemplo de eletroferograma obtido através de IMER de AChE.	99
Figura 44 - Influência do tempo de incubação na formação de produto da reação em IMER.	100
Figura 45 - Estabilidade do microrreator de enzima imobilizada ao longo de 50 ensaios.	100
Figura 46 - Gráfico de Michaelis-Menten (à esquerda) e seu correspondente gráfico de Lineweaver-Burk (à direita) para a reação de AChE em IMER.	101
Figura 47 - Gráfico de inibição da AChE em IMER na presença de neostigmina.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de indivíduos com diabetes tipo 1 em crianças (0-14 anos), com diabetes em adultos (20-79 anos) e com hiperglicemia (tipo 2 ou diabetes gestacional) na gravidez (20-49 anos).....	47
Tabela 2 - Resultados de atividade inibitória de acetilcolinesterase e α -glucosidase e fenólicos totais dos sucos de frutas.....	76
Tabela 3 - Resultados da quantificação de compostos fenólicos nos sucos de frutas por HPLC-ESI-MS/MS.....	80
Tabela 4 - Resultados de atividade inibitória de acetilcolinesterase e α -glucosidase de compostos fenólicos selecionados.....	87
Tabela 5 - Parâmetros cinéticos e de inibição enzimática obtidos pelos três métodos propostos.....	103
Tabela 6 - Resultados de atividade inibitória de acetilcolinesterase de extratos hidroalcoólicos de espécies da família Myrtaceae.....	104

LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES E ABREVIATURAS

- %** – Por cento
[I] – Concentração de inibidor
[S] – Concentração de substrato
°C – Graus Celsius
µm – Micrômetro
µmol L⁻¹ – Micromol litro⁻¹
ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
ADA – Associação Americana de Diabetes
AThCh - Acetiltiocolina
BGE – Eletrólito de corrida, do inglês *Background Electrolyte*
CE – Eletroforese capilar, do inglês *Capillary Electrophoresis*
CEC – Cromatografia eletrocinética capilar
cm – Centímetro
DAD – Detector de arranjo de diodos
DL₅₀ – Dose letal para 50 %
DTNB – ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EMMA – Microanálise mediada por eletroforese capilar, do inglês *Electrophoretically mediated microanalysis*
EOF – Fluxo eletrosmótico, do inglês *Electroosmotic Flow*
FSCE – eletroforese capilar em solução livre
FTIR - Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
FURB – Universidade Regional de Blumenau
g – Grama
GA – Glutaraldeído
GC – Cromatografia gasosa
h – Hora
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-ESI-MS/MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por “*electrospray*”, do inglês *High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with electrospray ionization*
IC₅₀ – Concentração inibitória para 50 %
K – Kelvin
K_i – Constante de inibição
K_m – Constante de Michaelis-Menten
kV – Quilovolt
LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

LMCMM – Laboratório Multiusuário de Caracterização Magnética de Materiais

mbar – milibar

MEEKC – Cromatografia eletrocinética em micromulsão

MEKC – Cromatografia eletrocinética micelar

MeOH – Metanol

mg L⁻¹ – miligrama litro⁻¹

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

min – Minutos

MISER – Injeção múltipla em um único experimento de separação

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mmol L⁻¹ – Milimol litro⁻¹

MNPs – Nanopartículas magnéticas

MRM – Monitoramento de reações múltiplas

nm – Nanômetro

nmol L⁻¹ – Nanomol litro⁻¹

pH – Potencial hidrogeniônico

PI – Padrão Interno

p-NP – *p*-nitrofenol

p-NPG – *p*-nitrofenil α -D-glicopiranosídeo

QTS – Quitosana

s – Segundo

TCh – Tiocolina

TDLFP – Difusão transversal de perfis de fluxo laminar

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

TGA – Análise Termogravimétrica

TPP – Tripolifosfato

tR – Tempo de retenção

TRIS - tris(hidroximetil)aminometano

U mL⁻¹ – Unidades de enzima por mililitro

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

US\$ - Dólares americanos

UV-Vis – Ultravioleta-visível

V₀ – Velocidade inicial de reação

V_{máx} – Velocidade máxima de reação

VSM – Magnetometria de Amostra Vibrante

XRD – Difração de Raios-X

$\lambda_{máx}$ – Comprimento de onda máximo de absorção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	Eletroforese Capilar	27
2.1.1	Injeções múltiplas	29
2.2	Microanálise Mediada por Eletroforese Capilar	30
2.3	Enzimas	34
2.3.1	Patologias relacionadas	38
2.3.1.1	Doença de Alzheimer	38
2.3.1.1.1	<i>Métodos para a determinação da atividade da AChE</i>	42
2.3.1.2	<i>Diabetes mellitus</i>	44
2.3.1.2.1	<i>Métodos para a determinação da atividade da α-glicosidase</i>	48
3	OBJETIVOS	51
3.1	OBJETIVO GERAL	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	INSTRUMENTAÇÃO	53
4.2	REAGENTES	53
4.3	PROCEDIMENTOS GERAIS	54
4.4	ESTUDO 1 – DESENVOLVIMENTO DE EMMA MÚLTIPLO PARA AChE E α -GLICOSIDASE APLICADO A SUCOS DE FRUTAS	55
4.4.1	Preparo das amostras de sucos	55
4.4.2	Soluções	56
4.4.3	Condições eletroforéticas	56
4.4.4	Análise de capacidade redutora de Folin-Ciocalteu	57
4.4.5	Análise de compostos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS .	58

4.5	ESTUDO 2 – DESENVOLVIMENTO DE EMMA DUPLO SIMULTÂNEO PARA AChE E α -GLICOSIDASE APLICADO A COMPOSTOS FENÓLICOS SELECIONADOS	59
4.5.1	Amostras de compostos fenólicos	59
4.5.2	Soluções.....	59
4.5.3	Condições eletroforéticas.....	60
4.6	ESTUDO 3 – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE IMER PELO ANCORAMENTO DA AChE EM MNPs APLICADO A EXTRATOS VEGETAIS DE ESPÉCIES DE MYRTACEAE.....	60
4.6.1	Preparo das nanopartículas magnéticas	60
4.6.1.1	Incorporação de AChE às MNPs	60
4.6.2	Caracterização das MNPs	61
4.6.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	61
4.6.2.2	Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	62
4.6.2.3	Potencial zeta	62
4.6.2.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	62
4.6.2.5	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	62
4.6.2.6	Difração de raios-X (XRD).....	63
4.6.2.7	Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM)	63
4.6.3	Montagem externa do microrreator de enzima imobilizada	63
4.6.4	Experimento de atividade enzimática com IMER	64
4.6.4.1	Preparo dos extratos vegetais.....	64
4.6.4.2	Soluções.....	65
4.6.4.3	Condições eletroforéticas.....	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	ESTUDO 1 – DESENVOLVIMENTO DE EMMA MÚLTIPLO PARA AChE E α -GLICOSIDASE APLICADO A SUCOS DE FRUTAS	67

5.2	ESTUDO 2 – DESENVOLVIMENTO DE EMMA DUPLO SIMULTÂNEO PARA AChE E α -GLICOSIDASE APLICADO A COMPOSTOS FENÓLICOS SELECIONADOS	82
5.3	ESTUDO 3 – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE IMER PELO ANCORAMENTO DA AChE EM MNPs APLICADO A EXTRATOS VEGETAIS DE ESPÉCIES DE MYRTACEAE.....	89
5.3.1	Caracterizações das nanopartículas magnéticas	89
5.3.1.1	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	89
5.3.1.2	Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	91
5.3.1.3	Potencial zeta	91
5.3.1.4	Análise termogravimétrica	92
5.3.1.5	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	92
5.3.1.6	Difração de raios-X.....	94
5.3.1.7	Magnetometria de amostra vibrante.....	95
5.3.2	Método eletroforético.....	96
6	CONCLUSÕES	105
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
	REFERÊNCIAS.....	109
	ANEXO A – Trabalho apresentado no 11º Simpósio Brasileiro de Farmacognosia.....	121
	ANEXO B – Trabalho apresentado no 24º Encontro de Química da Região Sul.....	124
	ANEXO C – Trabalho apresentado no 24th LACE	126
	ANEXO D – Artigo publicado no periódico <i>Natural Product Research</i>	128

1 INTRODUÇÃO

Durante os milênios de sua existência, o homem sempre travou uma batalha incansável pela vida contra doenças das mais variadas. Utilizando os recursos disponíveis em seu ambiente, o ser humano buscava tratar aquilo que tanto lhe fazia mal. Primeiramente, testou os recursos a sua volta de forma empírica, baseando-se na tentativa e erro, experimentando em si próprio aquilo que lhe trazia esperança de alívio e remediação. Ao longo dos anos o homem evoluiu assim como a ciência e as técnicas de experimentação, cuja caminhada lado a lado contribui para a formação do saber pelo homem. O método científico foi primordial nessa caminhada e ele tomou forma nas mais variadas técnicas de avaliação de atividades biológicas por parte dos elementos que nos cercam.

A avaliação da atividade biológica se utiliza de várias técnicas, desde as mais simples até as mais sofisticadas. Ensaios *in vivo* são utilizados após a existência de informação prévia sobre o potencial terapêutico de uma amostra. São utilizados camundongos, ratos, cobaias, dentre outras, com o objetivo de criar uma determinada condição fisiopatológica no animal e tentar amenizá-la, ou revertê-la com o objeto de estudo. Entre os principais modelos, são utilizadas a pesquisa de atividade analgésica (modelo de dor induzido com placa quente, ácido acético, formalina, etc.), atividade anti-inflamatória (modelo de edema de pata, inflamação em cavidades, etc.), atividade sobre o sistema nervoso central (modelo do nado forçado, suspensão pela cauda, Parkinson, etc.), entre outros. É importante ressaltar que todos os testes realizados devem respeitar os códigos de conduta ética específicos, além de uma aprovação prévia em comitê estabelecido na instituição (MCGONIGLE; RUGGERI, 2014). Polêmicas envolvendo o uso de experimentação animal, somadas aos custos da realização deste tipo de ensaio tem levado à busca por métodos alternativos de avaliação da atividade de substâncias.

Neste contexto, é possível utilizar não um organismo vivo por completo, mas apenas uma pequena porção, como uma célula, para se avaliar por exemplo o efeito de uma determinada amostra. Com esse objetivo, existem inúmeros modelos descritos na literatura, que muitas vezes tem como parâmetro de avaliação o valor da DL_{50} ou IC_{50} , ou seja, a dose do produto necessária para causar a morte ou curar/minimizar 50 % das células utilizados no teste, respectivamente (TRALAU; LUCH, 2012).

Além disso, outros ensaios biológicos simples, rápidos e baratos podem ser utilizados com a finalidade de triagem. Ensaios *in vitro* podem

ser realizados na própria bancada do laboratório, uma vez que muitas vezes apresentam resultados rápidos e eficazes. Podem ser citados testes utilizados para a avaliação da atividade antioxidante, anti-inflamatória, dentre outros (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; LIU, 2010).

Outra possibilidade dos ensaios *in vitro* é a avaliação da atividade de uma amostra sobre uma enzima alvo relacionada à algum tipo de condição fisiopatológica. Esse tipo de ensaio verifica a possibilidade de inibição ou ativação enzimática, dando indícios da potencialidade do desenvolvimento de um novo tratamento para a doença estudada. Como exemplo podem ser citadas a atividade sobre a acetilcolinesterase, enzima que está estreitamente relacionada com o mal de Alzheimer (KÁSA; RAKONCZAY; GULYA, 1997); a α -glicosidase, enzima cuja inibição leva a uma significativa melhora do quadro clínico em pacientes com diabetes tipo II (INZUCCHI, 2002) e ainda as ciclooxigenases-1 e 2, que pode avaliar o potencial anti-inflamatório de uma amostra, uma vez que estas enzimas são um dos mais importantes alvos no tratamento da inflamação (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998).

Dentre as técnicas analíticas hoje difundidas pelo meio científico, a eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) vem crescendo nas últimas décadas e possui muitas vantagens atrativas. É extremamente versátil, o custo analítico é baixo, a operação é simples, a eficiência de separação é alta, o tempo de execução das análises é relativamente curto, o volume de amostra e de reagente é reduzido (ordem de nanolitros), resultando em uma metodologia que satisfaz alguns dos princípios da química verde (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Assim, aliando as possibilidades dos ensaios *in vitro* enzimáticos com a rapidez, a eficácia e a versatilidade da CE, podem ser desenvolvidos métodos para a avaliação de atividades biológicas cada vez mais rápidas e com quantidades cada vez menores de amostra, características essenciais na sociedade moderna atual.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

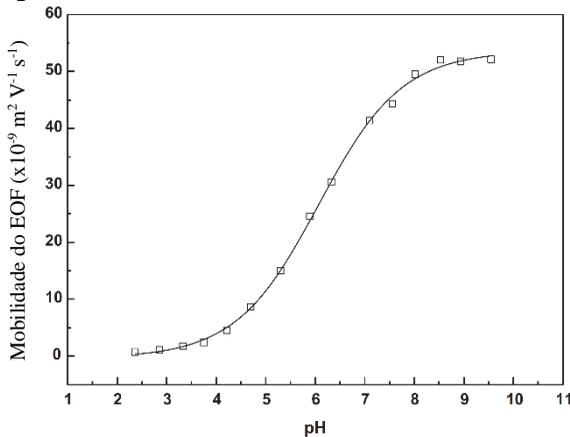
2.1 ELETROFORESE CAPILAR

A CE consiste, essencialmente, em uma técnica de separação de compostos iônicos, ionizáveis ou neutros contidos em um tubo oco, fundamentado em sua migração diferencial na presença de um campo elétrico, que é obtido por meio da aplicação de uma diferença de potencial nas extremidades. Pode-se dizer que o ponto de origem da eletroforese se deu com os trabalhos de Ferdinand Frédéric Reuss que descobriu o fenômeno da eletroosmose. O que Reuss fez foi encher um tubo em U com areia coletada na costa de um rio, ou seja, pó de sílica, e ligar à fonte de energia, uma pilha voltaica. Entretanto, a primeira aparição da eletroforese foi em trabalho de Arne Tiselius, que em sua tese de 1930, e em seu artigo de 1937, apresentou uma técnica capaz de separar as proteínas do plasma (RIGHETTI, 2005).

A técnica sofria de uma limitação bastante importante, a dissipação de calor, gerado pelo efeito joule, e que acarretava em baixa resolução, pouca eficiência e rapidez. Isso porque, o calor gerado pelo condutor não se dissipava de maneira uniforme, gerando um gradiente de temperatura e consequentemente uma diferença de migração por parte dos compostos. Através das décadas a técnica evoluiu, até que em 1967, contornando esse problema, Hjertén realizou as primeiras separações com altas voltagens, utilizando tubos com diâmetro interno reduzido, de 300 μm (TAVARES, 1996).

Com o advento do uso de capilares de sílica fundida, acontece então a formação de um fenômeno bastante importante em experimentos por CE, o fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *Electroosmotic Flow*). A parede interna do capilar de sílica é constituída por grupos silanol, que se ionizam gradativamente de acordo com o pH, deixando-a negativamente carregada, e para contrabalancear as cargas da parede há, na região próxima à parede, o excesso de cargas positivas, provenientes dos cátions da solução. Quando um campo elétrico é aplicado, é gerado um movimento das cargas positivas, que se movem em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante esse movimento, os íons carregam moléculas de água, induzindo um fluxo na direção do polo negativo, gerando então o fluxo eletrosmótico (figura 1). Esse fluxo é responsável por arrastar os analitos até o detector, sem distinção de carga (SILVA et al., 2007).

Figura 1 - Gráfico da mobilidade do fluxo eletrosmótico em função do pH.



Fonte: Adaptado de VITALI et al. (2014).

A partir da década de 80, a CE evoluiu para uma técnica de separação extremamente versátil, aumentando suas possibilidades e aplicações representativamente ao longo dos anos. As grandes vantagens da CE incluem o baixo custo analítico (destacando-se o baixo custo das colunas capilares), o simples manuseio e operação, a alta eficiência de separação, tempo de execução das análises, baixo consumo de amostra e solvente (o mais utilizado é água em volumes muito reduzidos, gerando quantidade mínima de resíduo), e o rápido desenvolvimento de método (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012; VAZ; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015).

É possível escolher dentre vários modos de separação, dependendo do composto e das amostras que devem ser analisadas. Para analitos polares, solúveis em água, eletroforese capilar em solução livre (FSCE) pode ser adotada; já para compostos menos solúveis em água, usam-se sistemas tampão não-aquosos. Para ambos, a carga dos compostos é alcançada através do ajuste do pH apropriado do eletrólito de corrida. A separação dos compostos não-ionizáveis é possível em tampões com fases pseudoestacionárias formadas por micelas (cromatografia eletrocinética micelar, MEKC) ou microemulsão (cromatografia eletrocinética em microemulsão, MEEKC). Fases estacionárias sólidas são utilizadas na cromatografia eletrocinética capilar (CEC), o que pode ser considerado como um verdadeiro híbrido de CE e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (BARCELÓ-BARRACHINA et al., 2007).

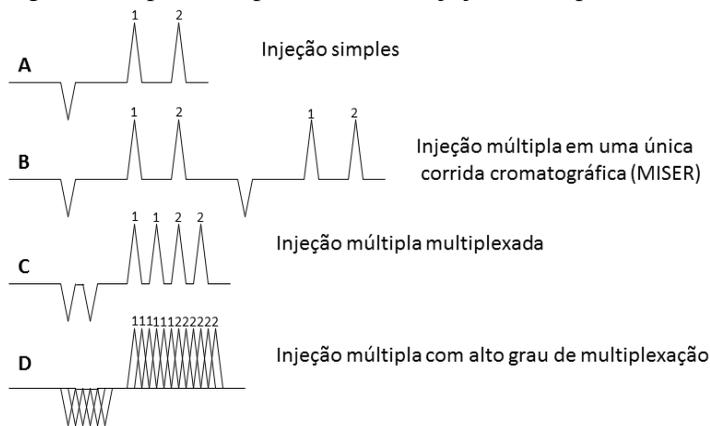
A versatilidade instrumental da CE começa com o próprio capilar. Podem ser utilizados capilares de sílica com diâmetros internos diferentes, capilares retos, com percurso de luz ampliada ou capilares revestidos. A composição do eletrólito de corrida (aquoso, não-aquoso ou líquido iônico) depende dos analitos e do modo de separação selecionado. Além dos detectores mais comuns de UV-Vis e de arranjo de diodos (DAD), outras opções descritas para CE incluem fluorescência, amperométricos e eletroquimioluminescência. Por último, mas não menos importante, o acoplamento a um espectrômetro de massas tornou-se uma opção interessante, como destacado por vários relatos interessantes (GANZERA, 2008). Devido a essa sua versatilidade, a CE tem sido empregada em diversos estudos de cinética enzimática (SCRIBA; BELAL, 2015).

2.1.1 Injeções múltiplas

As estratégias de injeção múltipla em eletroforese capilar são realizadas objetivando o aumento da frequência analítica, podendo ser divididas em injeção múltipla em um único experimento de separação, MISER, do inglês *Multiple Injection in a Single Experimental Run* e metodologias multiplexadas onde ocorre a intercalação dos picos. Na figura 2 são apresentados quatro modos de injeção: injeção simples (A); injeção múltipla em um único experimento de separação (B), que consiste na injeção de uma nova amostra após a primeira eluir ou migrar por completo; injeção múltipla multiplexada (C), caracterizada pela injeção de uma nova amostra antes de a anterior eluir ou migrar por completo, sem a mistura de analitos; e a injeção múltipla com alto grau de multiplexação (D) (WELCH et al., 2010).

Pode-se observar que o uso do modo MISER, em relação a duas injeções simples não traz um grande aumento da frequência analítica, enquanto que a multiplexação da separação aumenta muito a frequência analítica. Para o uso do modo com alto grau de multiplexação (D) se faz necessário o uso de transformadas matemáticas como, por exemplo, a transformada de Hadamard. Já o uso do modo multiplexado (C) não exige nenhum tratamento matemático avançado, apenas a atribuição dos picos deve ser feita de maneira cautelosa (VITALI; FÁVERE; MICKE, 2011).

Figura 2 - Tipos de experimentos de injeções múltiplas.



Fonte: O autor.

O desenvolvimento de métodos utilizando estratégias de injeção múltipla é mais vantajosa em eletroforese quando comparado à cromatografia. As técnicas múltiplas de injeção cromatográfica implicam na utilização do modo isocrático (HPLC) ou isotérmico (GC, cromatografia gasosa), e já em eletroforese capilar, como normalmente a separação é realizada num eletrólito contínuo, a aplicação se torna muito mais versátil.

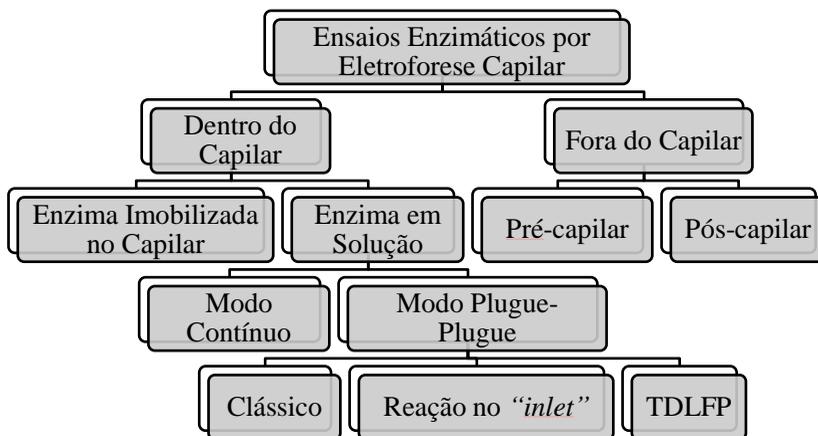
Além do aumento da frequência analítica, outras aplicações são possíveis, como estudar reações *in situ*, tais como atividade enzimática, interação entre analito e macromoléculas, como, por exemplo, proteínas ou supra macromoléculas como micelas. Estas técnicas poderiam ser chamadas de injeção sequencial, pois são injetados plugues contendo diferentes composições.

2.2 MICROANÁLISE MEDIADA POR ELETROFORESE CAPILAR

Ensaio enzimáticos podem ser realizados por CE basicamente de duas formas: fora ou dentro do tubo capilar (figura 3). No primeiro caso, a técnica pode ser realizada por modo pré- ou pós-capilar, onde os reagentes são misturados fora do equipamento e após certo tempo de incubação a reação enzimática é parada e a mistura reacional analisada por CE, com o objetivo de se separar e detectar o produto formado e o substrato remanescente. A diferença dos dois modos se deve a possibilidade de se utilizar como amostra na mistura reacional uma

mistura complexa (pré-capilar) ou uma substância previamente separada e isolada por CE (pós-capilar). A atividade enzimática é monitorada em função das áreas sob a curva dos picos de produtos ou substratos (BANKE; HANSEN; DIERS, 1991; LIU; SHI; CHEN, 2015).

Figura 3 - Diferentes abordagens para o estudo de reações enzimáticas por CE.



Fonte: O autor.

Por outro lado, o capilar pode servir não apenas como um meio de separação, mas também como um microrreator para a reação enzimática. Esse modo apresenta grandes vantagens, como por exemplo: a escala de nanolitros é utilizada, o que reduz o consumo de reagentes e consequentemente o custo dos experimentos; a amostragem, a mistura, a reação, a separação e a detecção são realizadas em um só capilar, o que melhora a eficiência da análise, além de favorecer a automatização e miniaturização dos ensaios (FAN; SCRIBA, 2010).

Os métodos para se conduzir a reação dentro do capilar (*"in-capillary"*) também são vários. No chamado modo contínuo (modo de contato longo) o capilar é completamente preenchido com substrato ou enzima e o segundo reagente é injetado após como um plugue ou em fluxo contínuo. Os reagentes são misturados sob campo elétrico e depois, substrato e produto são separados como plugues independentes para detecção. No modo plugue-plugue (modo de contato curto), enzima e substrato são introduzidos como plugues consecutivos (SCRIBA; BELAL, 2015).

Uma parte crítica do desenvolvimento desse último tipo de ensaio é conseguir uma mistura eficaz dos plugues de enzima e substrato dentro

do capilar. Duas estratégias principais foram propostas para este fim: por aplicação de um campo elétrico ou por difusão. No primeiro caso (clássico), com a aplicação de um campo elétrico, as duas seções se misturam devido a diferenças de suas mobilidades eletroforéticas, e a reação enzimática acontece e o produto resultante e o substrato não reagido são transportados em direção ao detector, onde são detectados individualmente. A mistura por difusão longitudinal através da interface entre os plugues é também chamada de "at-inlet", pois os plugues de enzima e de substrato, injetados normalmente em modo de sanduíche (enzima-substrato-enzima), são incubados sob repouso na entrada ("inlet") do capilar (NOVÁKOVÁ et al., 2004).

Além disso, outra estratégia possível para a mistura dos reagentes no capilar é a "difusão transversal de perfis de fluxo laminar" (TDLFP, do inglês *Transverse Diffusion of Laminar Flow Profiles*), onde a pressão e o tempo utilizados para a injeção dos reagentes deve ser suficientemente alta e curta, respectivamente, para se obter perfis parabólicos ou laminares com interfaces predominantemente longitudinais entre eles. Dessa forma, teoricamente, os reagentes se misturarão devido à difusão transversal que ocorre axialmente através das zonas de injeção parabólicas (NEHMÉ; MORIN, 2015).

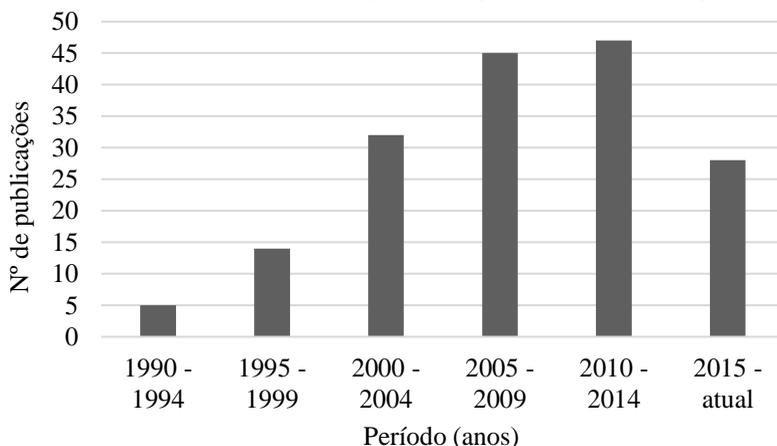
Por fim, uma outra estratégia na promoção da reação enzimática dentro do capilar seria a imobilização da enzima na parede interna do capilar ou sobre um suporte monolítico diretamente ligado à entrada do capilar. Quando imobilizadas sobre um suporte que não é a parede interna do capilar, a reação pode ser realizada também fora do equipamento, utilizando a técnica de eletroforese apenas para separar produto de substrato remanescente. Nos métodos descritos anteriormente, a enzima não é reciclável, e existe a perda deste reagente após a análise. De forma promissora, a enzima quando imobilizada pode ser reutilizada por muitas vezes, o que significa uma economia ainda maior de reagentes utilizados nos ensaios. Os quatro métodos mais comuns para imobilização enzimática são adsorção física, ligação covalente, ligação cruzada e encapsulação (IQBAL; IQBAL; MÜLLER, 2013).

O conceito da microanálise mediada por CE foi inicialmente introduzido por Bao e Regnier em 1992, e foi primeiramente referido como "ensaio ultramicro enzimático em sistema de eletroforese capilar" (*Ultramicro Enzyme Assays in a Capillary Electrophoretic System*), avaliando como modelo a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, através da sua reação com glucose 6-fosfato e fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADP) para produzir 6-fosfogluconato e NADP reduzido (NADPH), que absorve em 340 nm e

serve como indicador da atividade enzimática (BAO; REGNIER, 1992). Logo após, no ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisa trabalhou com o tratamento matemático envolvido no novo método, que recebeu então pela primeira vez o nome de “microanálise mediada por eletroforese capilar” (EMMA, do inglês *Electrophoretically Mediated Microanalysis*.), que é desde então aceito por outros autores (HARMON; PATTERSON; REGNIER, 1993).

Ao longo dos mais de 20 anos desde a sua introdução, devido à sua eficiência e agilidade, grupos de pesquisa espalhados por todo o globo desenvolveram diversos métodos por CE para avaliar a atividade de diferentes enzimas, entre elas a acetilcolinesterase, relacionada à doença de Alzheimer (BAJDA; WIĘCKOWSKA; MALAWSKA, 2009; MARTÍN-BIOSCA et al., 2009; MIN et al., 2012; SCHUCHERT-SHI; HAUSER, 2009; TANG; WANG; KANG, 2007a, 2007b), a α -glicosidase, relacionado ao *diabetes melittus* (GUO et al., 2010; IQBAL et al., 2013; KANIE; KANIE, 2002, 2003; ZHANG et al., 2013), a enzima conversora de angiotensina, relacionada à hipertensão arterial sistêmica (VAN DYCK et al., 2003a, 2003b), entre outras disponíveis na literatura. Assim, o que se observa em buscas na literatura é um aumento crescente no número de publicações relacionadas ao método (figura 4), ressaltando a relevância deste para a comunidade científica.

Figura 4 - Número de publicações na base de dados “*Web of Science*”, utilizando como palavra-chave o termo “*electrophoretically mediated microanalysis*”.



Fonte: O autor.

O presente trabalho se propôs, em determinadas etapas do estudo, aliar as várias possibilidades de ensaios enzimáticos por eletroforese capilar com o sistema de injeções múltiplas, algo não presente na literatura até o momento, e que objetiva a realização dos ensaios de maneira ainda mais rápida, proporcionado pelo aumento da frequência analítica das injeções múltiplas.

2.3 ENZIMAS

Para que a vida continue a existir, os organismos vivos necessitam desempenhar duas funções fundamentais. A primeira é a de se autorreplicarem, e a segunda é a de serem capazes de catalisar uma série de reações químicas de forma eficaz e seletiva. Essa segunda função só é possível graças aos catalisadores de reações biológicas: as enzimas, um grupo de proteínas altamente especializada. As enzimas estão no centro de praticamente todos os processos bioquímicos; atuando em sequências organizadas, elas catalisam cada uma das reações das centenas de etapas dos mais variados processos fisiológicos de organismos vivos (ATKINS; JONES, 2012).

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalítico, todas as enzimas são proteínas, de peso molecular variando de 12.000 a mais de um milhão. A atividade catalítica das enzimas depende da integridade de suas conformações nativas. Se uma enzima for desnaturada ou dissociada nas suas subunidades, geralmente a atividade é perdida, e se for degradada até os aminoácidos que a compõem, a atividade é destruída. Ou seja, as estruturas proteicas, primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para a atividade da mesma. Além disso, algumas necessitam além de seus próprios resíduos de aminoácidos, um componente químico adicional, denominado cofator, que pode se um ou mais íons inorgânicos como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} ou ainda uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa, denominada coenzima (LEHNINGER; COX; NELSON, 2014).

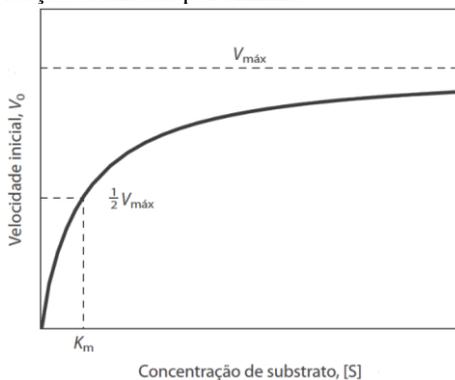
Em condições biológicas relevantes, a maioria das moléculas biológicas é muito estável nas condições internas das células, que apresentam o pH em torno de 7,0, temperaturas amenas e ambiente aquoso. As enzimas contornam esses problemas ao proporcionarem um ambiente específico adequado para que uma dada reação possa ocorrer mais rapidamente. Elas aumentam a velocidade das reações e diminuem a energia de ativação, entretanto não interferem no equilíbrio da reação. Essas reações ocorrem confinadas em um bolsão da enzima denominado

sítio ativo, e a molécula que se liga no sítio ativo e sobre qual a enzima age gerando os produtos da reação é denominada substrato. Ao se ligarem, enzima e substrato formam um complexo denominado enzima-substrato (WEINER, 2010).

Boa parte da energia utilizada no aumento da velocidade das reações proporcionada pelas enzimas provém de interações intermoleculares (ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas e iônicas) entre o substrato e a enzima. A energia dessas ligações é utilizada de diversas maneiras para diminuir a energia de ativação, e também confere uma extraordinária especificidade das enzimas por seus substratos (LEHNINGER; COX; NELSON, 2014).

A maioria das enzimas tem algumas propriedades cinéticas em comum, e a dupla de cientistas Leonor Michaelis e Maud Menten, estudaram extensivamente estes processos. Quando o substrato é adicionado a uma enzima, a reação rapidamente atinge um estado estacionário no qual a velocidade pela qual o complexo enzima-substrato se forma é compensada pela velocidade pela qual ele se decompõe. Em concentração fixa de enzima, à medida que a concentração de substrato aumenta, a formação do estado estacionário aumenta de maneira hiperbólica (figura 5) até se aproximar de uma velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) característica, na qual, essencialmente, toda a enzima está na forma de um complexo com o substrato (JOHNSON; GOODY, 2011).

Figura 5 - Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima.



Fonte: Adaptado de LEHNINGER; COX; NELSON (2014).

A equação de Michaelis-Menten (Eq. 1) descreve esse comportamento, e relaciona a velocidade inicial de reação (V_0) com a

concentração do substrato e $V_{m\acute{a}x}$ através da constante de Michaelis-Menten (K_m), que é definida como a concentração de substrato onde V_0 é exatamente a metade de $V_{m\acute{a}x}$. A constante de Michaelis-Menten pode ser em alguns casos associada com a afinidade da enzima pelo seu substrato.

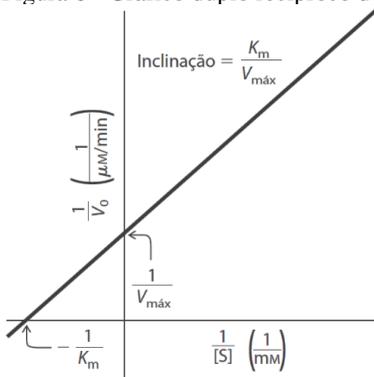
$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

No entanto, para se estimar de maneira mais simples a constante de Michaelis-Menten, a equação pode ser transformada algebricamente em equações mais práticas para fazer gráficos com dados experimentais. Uma transformação muito comum é deduzida simplesmente tomando as recíprocas dos dois lados da equação de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (2)$$

Essa forma da equação de Michaelis-Menten é denominada equação de Lineweaver-Burk. No caso de enzimas que obedecem a relação de Michaelis-Menten, um gráfico de $1/V_0$ versus $1/[S]$ (um duplo-recíproco de um gráfico de V_0 versus $[S]$) produz uma linha reta (figura 6). Essa linha tem uma inclinação de $K_m/V_{m\acute{a}x}$ no eixo $1/V_0$ e uma interseção de $-1/K_m$ no eixo $1/[S]$. Essa representação duplo-recíproca é também denominada de gráfico de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER; BURK, 1934).

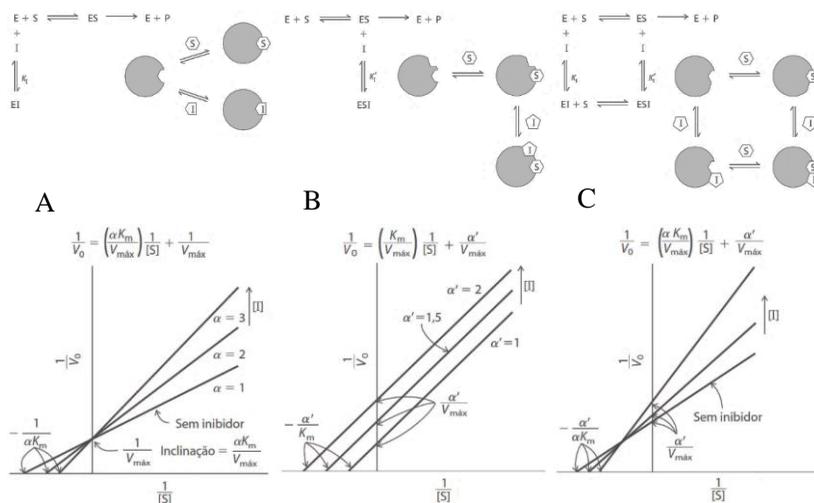
Figura 6 - Gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk.



Fonte: Adaptado de LEHNINGER; COX; NELSON (2014).

Além disso, a atividade de uma enzima pode ser afetada por moléculas inibidoras, que interferem na catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas. Esses inibidores podem ser classificados em reversíveis ou irreversíveis. Os inibidores reversíveis ainda são classificados como competitivos, incompetitivos os mistos (figura 7), dependendo da maneira como interferem na cinética (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

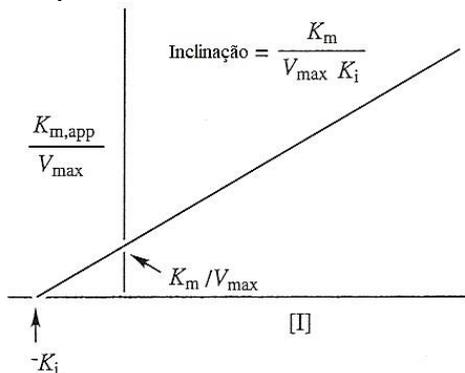
Figura 7 - Tipos de inibidores reversíveis e forma como afetam a equação de Michaelis-Menten. (A) Inibidor competitivo, (B) inibidor incompetitivo e (C) inibidor misto.



Fonte: Adaptado de LEHNINGER; COX; NELSON (2014).

Um parâmetro bastante importante em inibição enzimática é a constante de equilíbrio da ligação do inibidor com a enzima (K_i). Este dado pode ser obtido através de experimentos realizados com diferentes concentrações do inibidor e posterior construção de um gráfico de $K_{m,app}/V_{\max}$ (obtida para cada concentração do inibidor utilizada) *versus* concentração de inibidor. Este gráfico produz uma linha reta (figura 8), cuja interseção no eixo $[I]$ é igual a $-K_i$ (SILVERMAN, 2002). Por fim, uma forma de se avaliar a potência de um inibidor enzimático é se mensurar qual concentração de inibidor é necessária para se inibir em 50 % a atividade de uma enzima (IC_{50} , do inglês *half maximal inhibitory concentration*). Esse dado é facilmente obtido através da construção de um gráfico de % de inibição *versus* o log da concentração de inibidor.

Figura 8 - Gráfico alternativo de dados obtidos a partir de gráficos de Lineweaver-Burk para determinar os valores de K_i .



Fonte: Adaptado de SILVERMAN (2002).

As enzimas catalisam quase todos os processos celulares, e não é incomum que medicamentos interfiram nessas reações. As enzimas são um dos mais buscados alvos para o desenho de fármacos, e um conhecimento detalhado tanto sobre a química como sobre a farmacologia da condição para qual o fármaco será usado, são essenciais. Assim, todos esses parâmetros cinéticos participam, e são de extrema importância, ao se fazer a busca por novos fármacos inibidores enzimáticos (KERR, 2012).

2.3.1 Patologias relacionadas

2.3.1.1 Doença de Alzheimer

A história do termo demência é bastante longa, deriva da palavra do latim “*demens*” (sem a mente), que é composto pelo prefixo “*de*” (sem ou não) e do sufixo “*mens*” (mente). Durante o século XVIII, adquiriu uma conotação médica, embora a condição de declínio cognitivo relacionado à idade fosse uma aflição conhecida desde a antiguidade. Os primeiros passos para a classificação de demência foram dados durante o período greco-romano, Cláudio Galeno (130-201 d.C.) identificou a demência como um transtorno mental da senilidade: ele imaginava que esta doença era devido a uma deficiência cerebral primária ou secundária (BERCHTOLD; COTMAN, 1998).

Observações históricas sobre o envelhecimento e a demência diminuíram muito após o colapso do império greco-romano, e na Idade

Média, a demência não inspirou muito interesse, talvez devido à proeminência de epidemias mortais. Contudo, a utilização do termo demência é por vezes confusa. No século XVIII, a demência descrevia um estado de déficit intelectual adquirido, em qualquer idade e de qualquer causa. Então, um jovem adulto com ferimentos graves na cabeça, por exemplo, poderia ter sido rotulado como tendo demência (BOLLER; FORBES, 1998).

O médico Alois Alzheimer descreveu esta doença após encontrar-se com sua famosa paciente, senhora Auguste Deter, em novembro de 1901. Ela havia sido admitida no hospital mental de Frankfurt no dia anterior, com a idade de 51 anos. De acordo com o marido, o casal tinha um casamento feliz desde 1873, porém recentemente tinha observado um declínio cognitivo gradual na sua esposa. Por 8 meses ela desenvolveu mudanças progressivas em sua personalidade, apresentando inveja em relação a seu marido, rápida piora da perda de memória e comprometimento psicossocial pronunciado; por vezes tinha a sensação de que alguém queria matá-la e começava a gritar descontroladamente. Na clínica, apresentava desorientação em relação ao tempo-espaço e confusão. Com o passar do tempo, suas condições pioraram, sua fala tornou-se ininteligível, e em seu último ano, estava totalmente apática e passou a maior parte de seu tempo na cama com as pernas para cima. Auguste Deter morreu em 8 de abril de 1906 (CIPRIANI et al., 2011).

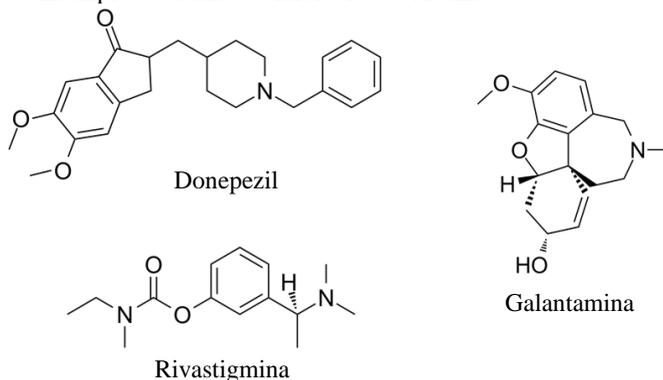
Em 3 de novembro de 1906, na reunião dos Psiquiatras do Sudoeste da Alemanha, realizada em Tübingen, o jovem médico Alois Alzheimer apresenta uma palestra na qual ele descreve os sintomas clínico-psiquiátricos e alterações histopatológicas do cérebro de sua falecida paciente Auguste Deter (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997). O relato foi publicado em um breve artigo resumindo sua palestra, e marcou a primeira publicação do que se tornaria a doença de Alzheimer (ALZHEIMER, 1906). Por quase 50 anos após sua apresentação de 1906, a doença teve um papel menor em psiquiatria e neurologia, sendo considerada extremamente rara e restrita a pessoas jovens, enquanto a demência senil foi considerada várias vezes como um envelhecimento exagerado devido a alterações ateroscleróticas no cérebro (HODGES, 2006).

Atualmente, o diagnóstico de doença de Alzheimer independe da idade, e sim dos marcadores da doença. Compreende-se que as principais alterações histopatológicas observadas na doença de Alzheimer no tecido cerebral são o depósito extracelular de peptídeo β -amiloide em forma de placas difusas e neuríticas; e proteína τ hiperfosforilada, uma proteína de montagem de microtúbulos que se acumula no espaço intracelular em

forma de emaranhados neurofibrilares (REITZ; MAYEUX, 2014). Além disso, existe perda de neurônios colinérgicos nos estágios mais avançados da doença, o que resulta em deficiência de neurotransmissão em áreas do cérebro como o núcleo basal. A resultante desse diminuído nível de neurotransmissão colinérgica é o declínio das funções cognitivas e de memória como testemunhado em pacientes com doença de Alzheimer (FRANCIS et al., 1999).

Baseado na hipótese colinérgica, a principal terapia farmacológica inclui o uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), que realiza a hidrólise da acetilcolina (ACh). Assim, com o aumento dos níveis de ACh cerebral, é verificada uma melhora no quadro clínico geral do paciente. Exemplos de fármacos (figura 9) dessa classe já aprovados e utilizados na terapêutica são o donepezil (Erantz[®]), rivastigmina (Exelon[®]) e galantamina (Reminyl[®]) (KULSHRESHTHA; PIPLANI, 2016).

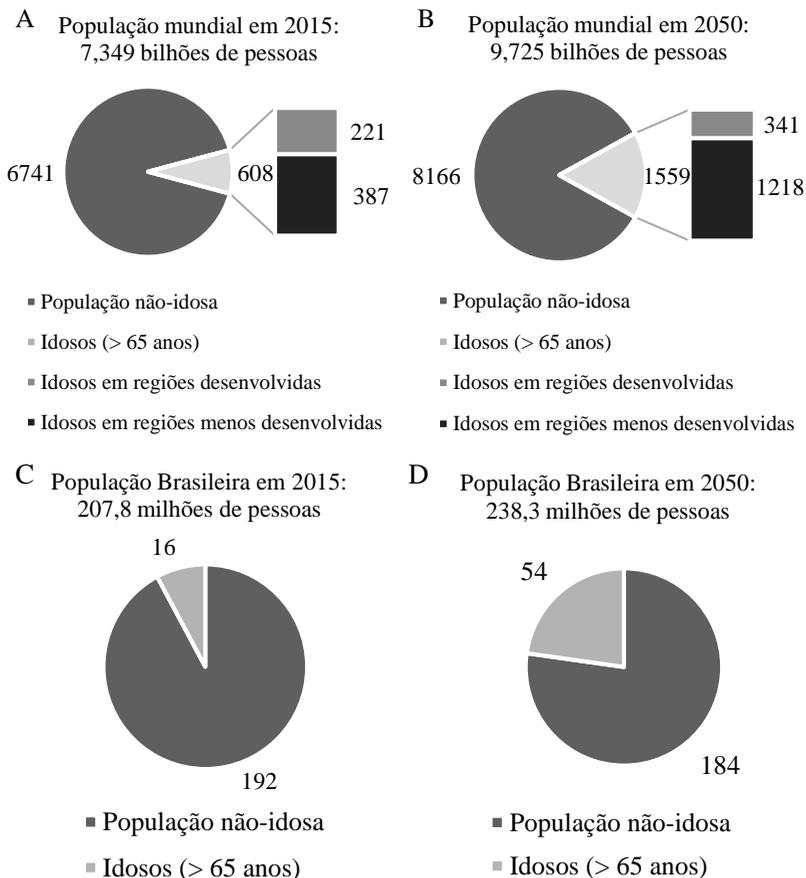
Figura 9 - Exemplos de fármacos inibidores da AChE.



Fonte: O autor.

Por afetar de maneira mais acentuada os idosos (acima de 65 anos), com uma prevalência de aproximadamente 12 % dessa população, caminha-se para dias com cada vez mais pessoas acometidas pela doença de Alzheimer (SCHWARTZ et al., 2013). Em julho de 2015, atingiu-se a marca de 7,349 bilhões de pessoas em todo o mundo, e segundo o relatório das Nações Unidas (UNITED NATIONS, 2015), a população mundial de idosos no mesmo ano era de 608 milhões de pessoas, e em 2050 o relatório estima que será de 1,56 bilhão (figura 10). Com o aumento da população idosa, espera-se um número ainda maior de pacientes acometidos por esta doença.

Figura 10 - Número absoluto (milhões) de idosos no mundo em 2015 (A) e projeção para 2050 (B); no Brasil em 2015 (C) e projeção para 2050 (D).



Fonte: O autor, criado com dados de UNITED NATIONS (2015).

Dentro desta estatística, o Brasil segue o mesmo caminho. Em julho de 2015, havia 207,8 milhões de brasileiros, dos quais 16 milhões eram idosos. Também em 2050, estima-se que esse número aumentará para 54 milhões, um salto de mais de três vezes, que irá trazer custos cada vez maiores para o sistema de saúde. Nos Estados Unidos, por exemplo, já é estimado um custo de US\$ 172 bilhões por ano apenas para o tratamento de pacientes com Alzheimer (REITZ; MAYEUX, 2014).

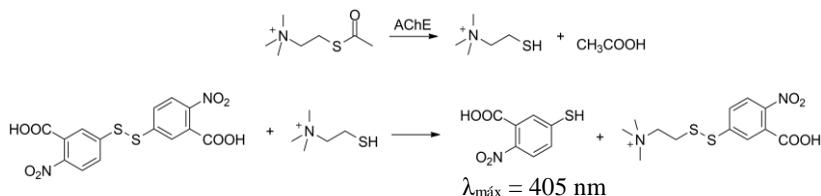
Em vista dessa problemática, torna-se emergente a necessidade da busca por novos agentes inibidores da enzima AChE úteis na terapia

contra a doença de Alzheimer. Existe a necessidade do desenvolvimento de fármacos que tenham cada vez menos efeitos adversos e maior eficácia, proporcionando assim uma melhor qualidade de vida para um número cada vez mais crescente de pessoas acometidas com a doença de Alzheimer.

2.3.1.1.1 Métodos para a determinação da atividade da AChE

O método clássico para a determinação da atividade da enzima AChE foi descrito pela primeira vez por ELLMAN e colaboradores (1961), utilizando o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), também desenvolvido por ELLMAN (1959). O protocolo se baseia na hidrólise de acetiltiocolina (AThCh) em tiocolina (TCh) e acetato pela AChE e posterior reação da tiocolina com o DTNB, formando um produto que pode ser monitorado por espectrofotômetro em comprimento de onda de 405 nm (figura 11). A atividade da enzima, é então determinada em função da absorbância da mistura reacional neste comprimento de onda específico.

Figura 11 - Reação de Ellman.



Fonte: O autor.

Vários trabalhos nas décadas que se seguiram utilizaram esse método para realizar estudos em diferentes aplicações, como determinar a atividade da AChE em pacientes (WOREK et al., 1999), para o desenvolvimento de “kits” portáteis (WOREK et al., 2016), ou também para avaliar o potencial de inibição desta enzima por amostras promissoras *in vitro* (MAGINA et al., 2012; MATA et al., 2007), ou ainda em placas de cromatografia em camada delgada (RHEE et al., 2001). O resultado é geralmente expresso como IC₅₀, que significa a concentração de amostra necessária para proporcionar 50 % de inibição da atividade enzimática.

Em 2007, um grupo de pesquisadores da China publicou dois trabalhos propondo primeiramente um método de EMMA clássico para a

avaliação da atividade desta enzima. Neste método, os reagentes foram misturados por meio da aplicação de um pequeno campo elétrico, que foi validado utilizando tacrina (inibidor da AChE comercialmente disponível) e uma pequena biblioteca química contendo quatro inibidores de AChE e 32 extratos naturais (TANG; WANG; KANG, 2007b). No mesmo ano, este grupo desenvolveu um método por meio de imobilização “camada-por-camada” da enzima no capilar, e o demonstra com uma triagem de uma pequena biblioteca de compostos contendo quatro inibidores conhecidos da AChE e 42 extratos naturais (TANG; WANG; KANG, 2007a). Esses trabalhos estabeleceram alguns parâmetros essenciais para a realização deste ensaio utilizando a CE. Por ser uma enzima dependente de magnésio, foi estabelecido que a concentração de $MgSO_4$ ótima para a reação enzimática neste tipo de método seria de 20 mmol L^{-1} na solução contendo o substrato. Além disso, o eletrólito de corrida (BGE, do inglês *background electrolyte*) adequado para este ensaio foi composto por borato-fosfato à 30 mmol L^{-1} .

Pouco tempo depois, MARTÍN-BIOSCA e colaboradores (2009) propuseram um método através da reação no “inlet” do capilar, utilizando a difusão como modo de mistura das seções de enzima e de substrato. Neste trabalho, os autores obtiveram a máxima produção de TCh, o produto da reação, em um tempo de incubação de dois minutos. Para a aplicabilidade da metodologia proposta e para estimar diferentes parâmetros cinéticos de interesse, tais como as constantes de inibição (K_i), identificação do mecanismo de ação inibitória e IC_{50} , foram utilizados os compostos tacrina, neostigmina e edrofônio, de atividade conhecida. Os resultados obtidos foram comparáveis aos da literatura na época, o que confirmou a eficácia da metodologia proposta.

Mais recentemente, MIN e colaboradores (2012) propuseram método de imobilização da enzima em um capilar de sílica fundida modificada com polietilenimina policatiônica, juntamente com soluções da enzima e quitosana injetadas para imobilizar a enzima por meio de interação eletrostática. Os autores utilizaram o método para realizar a triagem de uma pequena biblioteca de compostos contendo dois inibidores conhecidos de AChE e 30 extratos naturais. Outro trabalho que também utilizou a estratégia de imobilização enzimática, os autores utilizaram poli(cloreto de dialildimetilamônio) para construir um microreator, baseando-se na interação eletrostática da enzima (carregada negativamente) com o polímero (positivo), em uma montagem na estratégia de “camada-por-camada” (TANG; WANG; KANG, 2007a).

Por fim, microesferas magnéticas de sílica foram utilizadas com sucesso para a imobilização de AChE. Essas microesferas

funcionalizadas foram utilizadas para a investigação de inibidores da enzima, ao se fazer a reação com substrato em tubos de ensaio e se separar as microesferas com enzima da solução por meio de um ímã. O sobrenadante foi analisado em equipamento de ESI-MS e a atividade da enzima relacionada com o produto formado, monitorado pela sua razão massa carga (m/z) no espectrômetro de massas (HU et al., 2008).

Diferentemente do método espectrofotométrico clássico para a determinação da atividade da AChE, em um método utilizando a CE, não se faz necessária a segunda etapa do método da Ellman, caracterizada pela reação da tiocolina com o DTNB. Em um equipamento de CE equipado com detectores de UV-Vis, é possível monitorar um comprimento de onda específico para o substrato e o produto, e assim acompanhar a atividade enzimática avaliando a área sob a curva dessas substâncias. Essa inovação, permite que o método seja mais rápido e se diminua o consumo de reagentes em relação ao método clássico.

Dentro deste contexto, em determinada etapa de estudo, o presente trabalho propôs a utilização de um suporte diferente para a enzima AChE, nanopartículas magnéticas, para a realização da reação dentro do capilar, algo que para o melhor de nosso conhecimento ainda não se faz presente na literatura atual. Com isso se visou a economia de enzima utilizada nos ensaios, aliado a uma nova proposta de imobilização da enzima AChE dentro do capilar.

2.3.1.2 *Diabetes mellitus*

O *diabetes mellitus* como doença (um grupo de sintomas), mas não a sua patogênese, é conhecida há cerca de 3.500 anos. O papiro de Ébers, datado de 1.550 a.C. e localizado no Egito antigo, contém descrições de várias doenças, entre elas uma síndrome poliúrica, possivelmente o diabetes. Os tratados ayurvédicos da Índia antiga descreveram em detalhes o diabetes como sendo uma enfermidade de dois tipos: congênita e de início tardio. Além disso, os indianos notaram a relação do diabetes com a hereditariedade, obesidade, vida sedentária e a dieta. A primeira associação de poliúria com o sabor doce foi relatada na literatura indiana do século V-VI d.C. por Sushruta (um notável médico indiano). Areteu da Capadócia (81-138 d.C.) descreveu a condição como uma doença poliúrica, usando a palavra grega διαβήτης (*diabetes*), que significa “sifão”, para descrever a doença. O árabe Avicena (980-1037 d.C.) descreveu com precisão as características clínicas e algumas complicações do diabetes (neuropatia periférica, gangrena e disfunção erétil) e enfatizou a ideia do sabor doce da urina, e pode tê-lo introduzido

aos europeus por meio de seu livro (O Cânone da Medicina), que influenciou a prática médica por diversos séculos (LAKHTAKIA, 2013).

A história moderna do diabetes começa com a redescoberta do sabor doce da urina de pacientes diabéticos por Thomas Willis em 1675. Willis afirmou inequivocamente que a urina de pessoas diabéticas é "interessantemente doce, como se fosse impregnada de mel ou açúcar", acrescentando a palavra latina "*mellitus*", que significa literalmente mel doce, à palavra grega diabetes para descrever a doença. Foi apenas em 1776 que Dobson confirmou pela primeira vez a presença de excesso de açúcar na urina e sangue. Outro marco importante na história do diabetes é o estabelecimento do papel do fígado na glicogênese e o conceito de que o diabetes é devido ao excesso de produção de glicose foi estabelecido por Claude Bernard na França em 1857. O papel do pâncreas na patogênese do diabetes foi descoberto por Mering e Minkowski em 1889, que mais tarde levou ao descobrimento, isolamento e o primeiro uso clínico da insulina em pacientes diabéticos por Fredrick Banting (1891-1941) e Charles Best (1899-1965) em Toronto no Canadá. Em 1923, Banting e seu professor coordenador, John Macleod (1876-1935), receberam o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em decorrência de suas descobertas (AHMED, 2002).

O *diabetes mellitus* como conhecemos hoje é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção de insulina ou da ação da insulina, ou ainda ambos. As anormalidades no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas são resultado da importância da insulina como um hormônio anabólico. Alguns pacientes diabéticos são assintomáticos, especialmente aqueles nos primeiros anos de diabetes tipo 2; outros demonstram hiperglicemia marcada, e especialmente crianças com deficiência absoluta de insulina podem sofrer de poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso e visão turva. Se não controlada, a doença pode levar ao estupor e coma, e se não for tratado pode causar a morte, devido à cetoacidose ou mais raramente a uma síndrome hiperosmolar não-cetótica (CRAIG; HATTERSLEY; DONAGHUE, 2009).

Embora a classificação do diabetes seja importante e tenha implicações para as estratégias de tratamento, esta não é uma tarefa fácil. Muitos pacientes não se encaixam facilmente em uma única classe, especialmente os adultos mais jovens, e 10 % podem exigir revisão após classificados. A classificação clássica do diabetes como proposta pela Associação Americana de Diabetes (ADA, do inglês *American Diabetes Association*) em 1997 como tipo 1, tipo 2, outros tipos e diabetes mellitus gestacional ainda é a classificação mais aceita. O diabetes tipo 1

caracteriza-se pela destruição autoimune das células beta pancreáticas levando a deficiência absoluta de insulina. No diabetes tipo 2 existe a uma predominante resistência à insulina com deficiência relativa de insulina. Já os outros tipos de diabetes incluem, em particular, diabetes monogênica, diabetes secundária e diabetes associados a síndromes genéticas complexas. Por fim, o diabetes gestacional é definida como um defeito de tolerância à glicose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez (GALTIER, 2010).

Em termos de epidemiologia, as regiões do Oriente Médio e Norte da África têm a maior prevalência de diabetes em adultos (10,9 %), enquanto a região do Pacífico Ocidental tem o maior número de adultos diagnosticados com diabetes, e tem países com a maior prevalência de diabetes (37,5 %). De acordo com um relatório publicado em 2013 pela Federação Internacional de Diabetes, de 90 % a 95 % dos pacientes com diabetes pertencem ao tipo 2, e a maioria destes pacientes são adultos (20-79 anos) (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013). A prevalência global da doença é de 8,3 % (382 milhões de pessoas), com 14 milhões a mais de mulheres, a maioria entre as idades de 40 e 59 anos (tabela 1), e com previsão de aumento deste número para além de 592 milhões em 2035, representando cerca de 10,1 % da população global (KHARROUBI; DARWISH, 2015).

No Brasil, a prevalência é um pouco menor; em 2010, estimava-se que 6,3 % dos brasileiros com idade igual ou superior a 18 anos desenvolviam o diabetes, com um custo anual direto estimado de US\$ 3,952 bilhões em 2000, e custo anual indireto estimado de US\$ 18,6 bilhões (BERTOLDI et al., 2013).

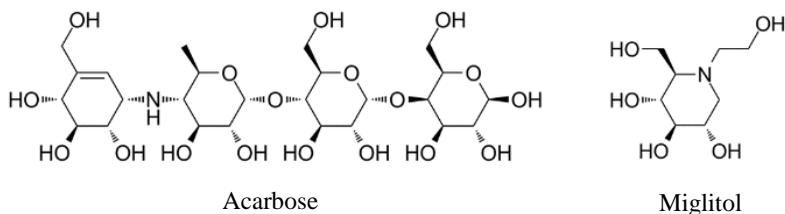
Um dos alvos estratégicos no tratamento desta doença é a enzima α -glicosidase, cuja atividade é fundamental para vários processos bioquímicos, tais como a degradação de polissacarídeos da dieta, fornecendo unidades de monossacarídeos, que podem então ser absorvidos e utilizados pelo organismo. Essa função no organismo justifica a procura de potenciais inibidores terapêuticos da α -glicosidase para serem utilizados no diabetes, obesidade, entre outras doenças. Exemplos de fármacos (figura 12) já utilizados na terapêutica no tratamento de diabetes não insulino dependente (tipo 2) com mecanismo de ação inibidor da α -glicosidases são a acarbose (Glucobay[®]) e o miglitol (Glyset[®]), pois interferem na digestão de carboidratos da dieta, reduzindo a hiperglicemia pós-prandial (BORGES DE MELO; DA SILVEIRA GOMES; CARVALHO, 2006).

Tabela 1 - Número de indivíduos com diabetes tipo 1 em crianças (0-14 anos), com diabetes em adultos (20-79 anos) e com hiperglicemia (tipo 2 ou diabetes gestacional) na gravidez (20-49 anos).

Região	Diabetes tipo 1 em crianças (0-14 anos)		Diabetes em adultos (20-79 anos)				Hiperglicemia na gravidez (20-49 anos)	
	2013		2013		2035		2013	
	Número em milhares	Recém- diagnosticados em milhares	Número em milhões	Prevalência comparativa	Número em milhões	Prevalência comparativa	Casos em nascidos vivos em milhões	Prevalência comparativa
África	39,1	6,4	19,8	5,7 %	41,5	6,0 %	4,6	14,4 %
Europa	129,4	20,0	56,3	6,8 %	68,9	7,1 %	1,7	12,6 %
Oriente Médio e Norte da África	64	10,7	34,6	10,9 %	67,9	11,3 %	3,4	17,5 %
América do Norte e Caribe	108,6	16,7	36,8	9,6 %	50,4	9,9 %	0,9	10,4 %
América do Sul e Central	45,6	7,3	24,1	8,2 %	38,5	8,2 %	0,9	11,4 %
Sudeste Asiático	77,9	12,5	72,1	8,7 %	123,0	9,4 %	6,3	25,0 %
Pacífico Occidental	32,5	5,3	138,2	8,1 %	201,8	8,4 %	3,7	11,9 %
Mundo	497,1	78,9	381,8	8,3 %	592,0	8,8 %	21,4	14,8 %

Fonte: Adaptado de KHARROUBI e DARWISH (2015).

Figura 12 - Exemplos de fármacos inibidores da α -glicosidase.



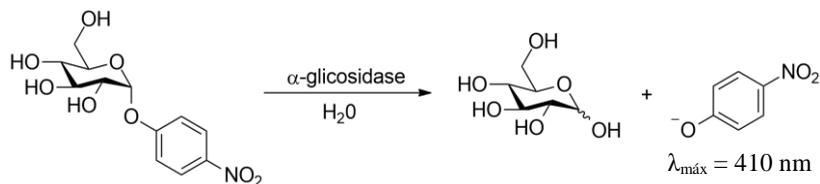
Fonte: O autor.

O cenário epidemiológico torna claro que a busca por novas alternativas para o tratamento da doença, entre estes os agentes inibidores da enzima α -glicosidase, é urgente. Fármacos cada vez mais eficazes, com menos efeitos adversos e mais acessíveis à população são o estímulo para se tornar a vida dos acometidos pela diabetes cada vez melhor.

2.3.1.2.1 Métodos para a determinação da atividade da α -glicosidase

Na década de 1970, alguns trabalhos já verificavam a capacidade de certas culturas de micro-organismos em inibir a atividade de glicosidases (NIWA et al., 1970; PULS et al., 1977; SCHMIDT et al., 1977). Porém, foi somente na década de 1990 que WALKER, WINDER e KELLAM (1993), desenvolveram um método colorimétrico para a determinação da atividade de α -amilase, β -galactosidase e α -glicosidase aplicado a microplacas. O grupo de pesquisa utilizou o método para efetuar uma triagem de inibidores de glicosidases em microalgas e cianobactérias (CANNELL et al., 1987). Este método se baseia na quebra da ligação glicosídica α -1,4 do *p*-nitrofenil α -D-glicopiranosídeo (p-NPG, substrato da enzima), formando *p*-nitrofenol (p-NP, produto da reação), que é detectado pela sua absorvância à 410 nm (figura 13) e relacionado com a atividade da enzima.

Figura 13 - Reação do p-NPG com a enzima α -glicosidase.



Fonte: O autor.

O método já foi empregado em inúmeros trabalhos existentes na literatura para se avaliar a potencial atividade de inibição da enzima α -glicosidase por parte de amostras promissoras, provenientes das mais diversas fontes (DE SOUZA et al., 2012; KIM et al., 1997; LIU et al., 2006; MENG et al., 2016). Assim como nos ensaios de avaliação da atividade da enzima AChE, costuma-se expressar o resultado como uma relação da concentração da amostra que proporciona 50 % de inibição da atividade enzimática, denominado IC₅₀.

O método foi então transposto para o universo da CE no início do século XXI por grupo de pesquisa de Tóquio, que desenvolveu método plugue-plugue clássico para as enzimas α -glicosidase, β -galactosidase e β -N-acetilglicosaminidase. Nestes trabalhos, os autores estabeleceram os parâmetros primordiais para o ensaio, como por exemplo o fato de que os eletrólitos para se realizar a reação e proporcionar a separação deveriam ser diferentes, devido a incompatibilidade da enzima com o eletrólito de separação, e estudaram parâmetros cinéticos das enzimas no método proposto (KANIE; KANIE, 2002, 2003).

Em 2010, um grupo chinês utilizou o método para avaliar a capacidade de 21 ervas tradicionais chinesas em inibir a enzima α -glicosidase, variando porém o tipo de EMMA para o modo plugue-plugue com reação no “inlet” (GUO et al., 2010). Três anos mais tarde, um grupo de pesquisadores do Paquistão desenvolveu método de EMMA “off-line” (fora do capilar) em modo pré-capilar para avaliar a inibição da α -glicosidase quando exposta a polioxometalatos, agregados oligoméricos de cátions de metais de transição ligados por ânions de óxido (IQBAL et al., 2013). No mesmo ano, outro grupo da China desenvolveu e aplicou método de EMMA com a enzima imobilizada em um monólito polimérico poroso de poli(glicidil metacrilato-co-etileno dimetacrilato) modificado com nanopartículas de ouro, um microrreator, para avaliar o potencial de inibição de 11 produtos naturais (ZHANG et al., 2013). Recente trabalho descreveu um microrreator de maneira diferente, onde α -glicosidase foi imobilizada na parede interna do capilar tratado com 3-aminopropiltriétoxissilano e utilizando o glutaraldeído como ligante homobifuncional, aplicando o modelo para estudos de cinética com o inibidor padrão acarbose (LIU; CHEN; SHI, 2015).

Ao final, a utilização de nanopartículas magnéticas em ensaios enzimáticos de α -glicosidase por CE foi abordada em estudo que imobilizou a enzima nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄, e a utilizou para realizar a investigação de inibidores enzimáticos em plantas da medicina tradicional chinesa. Neste estudo porém, a reação foi realizada fora do capilar de eletroforese, em tubo de ensaio, e um ímã utilizado para separar

as nanopartículas do meio reacional e uma alíquota deste é analisada por CE, para a verificação do produto formado (LIU; CHEN; SHI, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de métodos de microanálise mediada por eletroforese capilar (EMMA) e de microrreator de enzima imobilizada (IMER) aplicados no rastreamento de novos agentes terapêuticos para doença de Alzheimer e diabetes baseados na inibição de AChE e α -glicosidase.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudo 1 – Desenvolvimento de EMMA múltiplo para AChE e α -glicosidase aplicado a sucos de frutas:
 - Propor método de EMMA múltiplo para AChE com o sistema de injeções múltiplas sequenciais;
 - Propor método de EMMA múltiplo para α -glicosidase com o sistema de injeções múltiplas sequenciais;
 - Aplicar os métodos de EMMA múltiplo para o rastreamento de novos agentes inibidores da AChE e da α -glicosidase em amostras de sucos de frutas naturais;
 - Analisar os sucos de frutas por HPLC-ESI-MS/MS a fim de identificar os fenólicos presentes responsáveis pela atividade verificada;
- Estudo 2 – Desenvolvimento de EMMA duplo simultâneo para AChE e α -glicosidase aplicado a compostos fenólicos selecionados:
 - Propor método de EMMA duplo simultâneo para AChE e α -glicosidase utilizando o sistema de injeções múltiplas;
 - Aplicar o método de EMMA duplo simultâneo para o rastreamento de novos agentes inibidores da AChE e da α -glicosidase em fenólicos isolados selecionados pelas análises dos sucos de frutas;

- Estudo 3 – Desenvolvimento de método de IMER pelo ancoramento da AChE em MNPs aplicado a extratos vegetais de espécies de Myrtaceae:
 - Propor método de IMER para a AChE utilizando nanopartículas magnéticas de ferrita de manganês;
 - Aplicar o método de IMER para o rastreio de novos agentes inibidores da AChE em amostras de extratos vegetais de espécies da família Myrtaceae.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Experimentos de eletroforese capilar foram conduzidos em equipamento Agilent 7100 CE System (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipado com um detector de arranjos de diodos (DAD) e software *ChemStation* para controle, processamento e aquisição de dados. Foram utilizados capilares de sílica fundida com revestimento externo de poliimida ou poliacrilato (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA), com temperatura ajustada em 37 °C.

Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por “*electrospray*” (HPLC-ESI-MS/MS, do inglês *High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with electrospray ionization*.) foram feitas em um cromatógrafo líquido Agilent® 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), com fonte de ionização TurbolonSpray® acoplada a um espectrômetro de massas Qtrap® 3200 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, EUA). O software Analyst® (versão 1.5.1) foi utilizado para o registro e tratamento de dados.

As caracterizações das nanopátículas magnéticas foram realizadas em espectrômetro Shimadzu modelo IR-Prestige 21 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), Zetasizer Malvern Instruments modelo Nano Series (Spectris PLC., Egham, UK), termobalança Shimadzu modelo TGA-50 Series (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), microscópio eletrônico JEOL modelo JEM-1011 TEM (JEOL Ltd., Tokyo, Japan), difratômetro PANalytical modelo Xpert PRO Multipurpose Diffractometer (Spectris PLC., Egham, UK) e magnetômetro Quantum Design modelo PPMS EverCool-II® equipado com Vibrating Sample Magnetometer (Quantum Design Inc., San Diego, USA).

Outros equipamentos utilizados para preparo de amostra e de soluções foram: Ultra-Turrax® IKA modelo T25 (IKA-Works Inc., Wilmington, USA).

4.2 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. AChE de *Electrophorus electricus* (EC.3.1.1.7), α -Glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20), metilsulfato de neostigmina, acarbose, propranolol, ácido cinâmico, 4-hidroxibenzoato de butila, iodeto de acetiltiocolina (AThCh), *p*-nitrofenil α -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG),

tetraborato de sódio anidro ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), ácido fórmico, reagente de Folin-Ciocalteu, quitosana de massa molar média (QTS), ácido cítrico monohidratado e tripolifosfato de sódio (TPP) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Sulfato de magnésio (MgSO_4) anidro, carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3), metanol (MeOH), ácido acético glacial e glutaraldeído (GA) 50 % foram adquiridos de Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil), dihidrogenofosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) adquirido de FischerChemical (Fair Lawn, NJ, EUA), ácido bórico (H_3BO_3) e hidrogenofosfato de sódio anidro (Na_2HPO_4) adquiridos de Synth (Diadema, SP, Brasil) e hidróxido de sódio (NaOH) adquirido de Neon Comercial (São Paulo, SP, Brasil). A água utilizada para o preparo de amostras e eletrólito de corrida foi deionizada utilizando equipamento Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

4.3 PROCEDIMENTOS GERAIS

Novos capilares foram condicionados durante 30 minutos com NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e água Milli-Q, e em seguida, durante 15 min com BGE apropriado à 1.000 mbar. A fim de obter boa simetria de pico e tempos de migração reprodutíveis, o capilar foi condicionado no início de cada dia com a seguinte sequência: 5 min com NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; 5 min com água Mili-Q; e 5 min com BGE à 1.000 mbar. Entre as corridas, o capilar foi condicionado com água Mili-Q durante 30 s, e BGE durante 1 min.

A atividade da enzima foi determinada pela área de pico do produto, uma vez que o tempo de reação é constante devido aos comprimentos idênticos dos plugues de enzima e substrato durante todos os experimentos. A percentagem de inibição enzimática foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{x}{\text{branco}} \times 100 \right) \quad (3)$$

Na equação, “x” representa a área do pico do produto de reação determinado em uma dada concentração de inibidor ou amostra, e “branco” é o pico do produto de reação determinado em teste sem a presença de um inibidor. Os valores de área do pico do produto determinados neste estudo foram medidos da média de experimentos realizados em triplicata. O software Microsoft® Excel 2016 foi utilizado para realizar a análise estatística de regressão.

4.4 ESTUDO 1 – DESENVOLVIMENTO DE EMMA MÚLTIPLO PARA AChE E α -GLICOSIDASE APLICADO A SUCOS DE FRUTAS

4.4.1 Preparo das amostras de sucos

Os sucos de frutas foram gentilmente cedidos por parceria com a Prof.^a Dr.^a Michele Debiasi Alberton, do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, do departamento de ciências farmacêuticas da Universidade Regional de Blumenau (FURB).

Para produzi-los, foram adquiridas treze frutas (figura 14) de um mercado local de alimentos, com base em critério de disponibilidade, sendo elas: maçã (*Malus pumila* Miller), uva (*Vitis* sp.), goiaba (*Psidium guajava* L.), jaboticaba [*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel], kiwi (*Actinidia deliciosa* C.F.Liang e A.R.Ferguson), manga (*Mangifera indica* L.), amora (*Morus* sp.), laranja [*Citrus × sinensis* (L.) Osbeck], maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.), limão tahiti [*Citrus × latifolia* (Yu.Tanaka) Tanaka], pitanga (*Eugenia uniflora* L.), pitaya [*Hylocereus undatus* (Haworth) Britton & Rose] e morango (*Fragaria × ananassa* Duchesne).

Figura 14 - Frutas utilizadas para a produção dos sucos.



Fonte: O autor.

Quarenta gramas do fruto inteiro (sementes de limão, maçã e manga foram removidas) foram liquidificados com 200 mL de água deionizada, resultando em um suco que foi filtrado sob pressão reduzida, liofilizado (-50 °C, 48 h) e armazenado em recipientes vedados à -20 °C até análise.

4.4.2 Soluções

Os método de EMMA múltiplo para avaliação da inibição de AChE e α -glicosidase foi realizado com base nos métodos descritos por MARTÍN-BIOSCA et al. (2009) e GUO et al. (2010), com modificações. O eletrólito de fundo (BGE) nos experimentos de AChE foi tampão borato-fosfato à 30 mmol L⁻¹ (pH 8,0), preparado com H₃BO₃ e NaH₂PO₄ em água Milli-Q e ajustando o pH com NaOH 1,0 mol L⁻¹. A solução enzimática foi preparada diluindo AChE à 10 U mL⁻¹ com BGE borato-fosfato. As soluções para o ensaio de inibição da AChE foram preparadas com o inibidor padrão (neostigmina) ou amostra de suco (5 mg mL⁻¹), 2,0 mmol L⁻¹ de substrato (AThCh), 20 mmol L⁻¹ MgSO₄ e propranolol como padrão interno à 25 mg L⁻¹ em BGE. As soluções de suco para os testes de atividade inibitória foram preparadas dissolvendo 100 mg do material liofilizado em 10 mL de água deionizada e centrifugando a 12.000 rpm por 120 s.

Já nos ensaios de α -glicosidase, utilizou-se dois BGE diferentes. Um para separação e outro para realização da reação enzimática. O BGE utilizado para promover a separação de substrato e produto foi composto por 20 mmol L⁻¹ de Na₂B₄O₇ (pH 9,2) preparado em água Milli-Q. O BGE para a reação enzimática foi composto por 30 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ e 10 mmol L⁻¹ de Na₂HPO₄ (pH 6,8) preparado em água Milli-Q. A solução enzimática foi preparada diluindo α -glicosidase, em BGE fosfato também em concentração de 10 U mL⁻¹. As soluções de teste foram preparadas com inibidor padrão (acarbose) ou amostra de suco (1,0 mg mL⁻¹), 0,2 mmol L⁻¹ de substrato (p-NPG) e ácido cinâmico como padrão interno à 25 mg L⁻¹ em BGE fosfato.

Com o objetivo de avaliar parâmetros cinéticos e inibitórios da AChE, foram utilizadas diferentes concentrações de substrato, variando de 0,2 a 5,0 mmol L⁻¹, e de neostigmina, variando de 0,0 a 40 μ mol L⁻¹. Para os mesmos estudos, com a α -glucosidase, foram utilizadas concentrações de substrato variando de 0,1 a 1,2 mmol L⁻¹ e de acarbose, variando de 0,0 a 0,6 mmol L⁻¹.

4.4.3 Condições eletroforéticas

Nos experimentos do estudo 1 foram utilizados capilares de 58,5 cm de comprimento total (efetivo de 50 cm) com diâmetro interno de 50 μ m, externo de 375 μ m e com revestimento externo de poliimida. Nos ensaios de AChE o detector foi ajustado a 230 nm, e nos de α -glicosidase a 270 e 406 nm, devido aos máximos de absorção de padrão interno e

produto, respectivamente. Para se realizar o experimento, o capilar teste foi previamente preenchido com o BGE, e as soluções de enzima e substrato (com ou sem inibidor), foram introduzidas pela extremidade do capilar mais distante do detector (“*inlet*”) do capilar hidrodinamicamente em modo “sanduíche”, na seguinte sequência: água deionizada (20 mbar por 5 s), solução de enzima (50 mbar por 5 s), solução de teste com substrato (50 mbar por 5 s), solução de enzima (50 mbar por 5 s) e água deionizada (20 mbar por 5 s). O procedimento de injeções múltiplas para obtenção de dois testes em um único experimento foi realizado injetando-se dois “sanduíches” de teste em sequência, com um plugue (chamado de espaçador), composto apenas pelo BGE, entre as duas injeções, com 50 mbar por 12 s para AChE e 20 s para α -glicosidase.

Após todas as injeções, o BGE foi inserido com 50 mbar por 30 s, com a finalidade de empurrar todos os segmentos para a região termostaticada do capilar, que é aquela que fica no interior do cartucho do equipamento. Uma vez injetados, os plugues são deixados em repouso por um período de incubação de 2 min para que a reação aconteça. Ao final, uma tensão de 30 kV é então aplicada para promover o processo de separação.

4.4.4 Análise de capacidade redutora de Folin-Ciocalteu

Utilizou-se a análise da capacidade redutora de Folin-Ciocalteu para a investigação de compostos fenólicos totais nos sucos de frutas, determinado através da reação de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método descrito por ANAGNOSTOPOULOU et al. (2006). Uma alíquota de 0,5 mL de uma solução de amostra (sucos a 10 mg mL^{-1} , em água ultrapura), 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu foram misturados e, após 3 min, 1,0 mL de solução saturada de Na_2CO_3 foi adicionada. Esta solução foi então agitada e deixada em repouso durante 1 h. Os valores de absorvância das soluções foram determinados em espectrofotômetro a 725 nm. Para o teste branco, uma solução foi preparada como descrito acima, porém sem a solução de amostra. A concentração de fenóis foi estimada por interpolação a partir de uma curva de calibração, construída com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 25 a 300 mg L^{-1} , diluídas em MeOH. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por L de suco (mgGA L^{-1}).

4.4.5 Análise de compostos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS

A análise por HPLC-ESI-MS/MS foi realizada utilizando os parâmetros de pré-tratamento da amostra, cromatográficos e de espectrometria de massas previamente descritos por SCHULZ et al. (2015). No equipamento utilizou-se coluna Phenomenex[®] Synergi 4 μ Polar-RP 80A (150 mm x 2 mm, tamanho de partícula de 4 μ m) a 30 °C. Os eluentes foram constituídos pela mistura dos solventes A (MeOH/H₂O na proporção de 95:5, v v⁻¹) e B (H₂O/ácido fórmico 0,1 %) como segue: 1º estágio – 10 % de solvente A e 90 % de B (modo isocrático) por 5 min; 2º estágio – gradiente linear dos solventes A e B (de 10 a 90 % de A) por 2 min; 3º estágio – 90 % de solvente A e 10 % de B (modo isocrático) por 3 min; 4º estágio – gradiente linear dos solventes A e B (de 90 % a 10 % de A) por 7 min com fluxo de 250 μ L min⁻¹ para a fase móvel. Em todas as análises, o volume injetado foi de 5 μ L.

Para a identificação e quantificação dos compostos, padrões de 46 compostos fenólicos (ácido 4-aminobenzóico, ácido 4-hidroximetilbenzóico, apigenina, aromadendrina, ácido cafêico, carnosol, catequina, ácido clorogênico, crisina, ácido cinâmico, coniferaldeído, ácido elágico, epicatequina, epigallocatequina, galato de epigallocatequina, eriodictilol, ácido ferúlico, enxofre, galanga, ácido gálico, hispudulina, isoquercetina, kaempferol, ácido mandélico, ácido metoxifenilacético, mirricetrina, naringerina, naringina, ácido p-anísico, ácido p-cumárico, pinocembrina, ácido protocatecuico, quercetina, resveratrol, ácido rosmarínico, rutina, ácido salicílico, escopoletina, sinapaldeído, ácido sinápico, siringaldeído, ácido siringico, taxifolina, umbeliferona, ácido vanílico e vanilina) dissolvidos em MeOH (0,02 a 6,0 mg L⁻¹) foram analisados sob as mesmas condições descritas acima.

O cromatógrafo líquido foi acoplado a um espectrômetro de massas híbrido triplo quadrupolo/íon-trap linear utilizando fonte de ionização por eletronebulização, em modo positivo de ionização, com as seguintes parâmetros: interface íon-spray a 400 °C; tensão íon-spray de 4500 V; curtain gas, 10 psi; gás de nebulização, 45 psi; gás auxiliar, 45 psi; e gás de colisão, médio. Os pares de íons foram monitorados no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

As amostras de suco foram preparadas dissolvendo 50 mg do material liofilizado em 5 mL de solução de ácido clorídrico pH 2. Estas soluções foram extraídas três vezes com 2 mL de éter etílico cada, e os três extratos foram combinados. Após a secagem do extrato combinado, este foi armazenado em um recipiente vedado a -20 °C. Antes da análise,

o material seco foi dissolvido em 1 mL de MeOH e centrifugado a 12.000 rpm durante 120 s, e diluído em proporção 3:7 de amostra/H₂O.

4.5 ESTUDO 2 – DESENVOLVIMENTO DE EMMA DUPLO SIMULTÂNEO PARA AChE E α -GLUCOSIDASE APLICADO A COMPOSTOS FENÓLICOS SELECIONADOS

4.5.1 Amostras de compostos fenólicos

O Laboratório de Eletroforese Capilar possui uma biblioteca de compostos fenólicos bastante extensa, já previamente adquiridos de Sigma-Aldrich ou isolados de fontes vegetais e caracterizados por técnicas espectroscópicas adequadas. Estes compostos fenólicos são utilizados em diversas frentes de trabalho no laboratório, e para o presente estudo foram selecionados os compostos fenólicos identificados nos sucos de frutas que apresentaram melhor atividade, isto é, jaboticaba e pitanga. São eles: ácido gálico, quercetina, ácido sinápico, ácido salicílico, vanilina, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido protocatecuico, ácido *p*-cumárico e taxifolina. Todos os compostos fenólicos foram dissolvidos em MeOH em concentração de 100 mg L⁻¹.

4.5.2 Soluções

O BGE utilizado foi tampão borato-fosfato 30 mmol L⁻¹ (pH 8,0). A solução enzimática foi com AChE à 10 U mL⁻¹ em BGE. As soluções para o ensaio de AChE foram preparadas com o inibidor padrão (neostigmina) ou composto fenólico (10 mg L⁻¹), 5 mmol L⁻¹ de substrato (AThCh), 20 mmol L⁻¹ de MgSO₄ e propranolol como padrão interno a 25 mg L⁻¹ em BGE.

As soluções para o ensaio de α -glucosidase foram dissolvidas em BGE fosfato. A solução de α -glucosidase foi diluída para 10 U mL⁻¹ com o BGE de fosfato. As soluções de teste foram preparadas com inibidor padrão (acarbose) ou composto fenólico (10 mg L⁻¹), 0,5 mmol L⁻¹ de substrato (*p*-NPG) e o padrão interno 4-hidroxibenzoato de butila à 25 mg L⁻¹ em BGE de fosfato.

Com o objetivo de avaliar estudos cinéticos e inibitórios da AChE, foram utilizadas diferentes concentrações de substrato, variando de 0,2 a 5,0 mmol L⁻¹, e neostigmina, variando de 0,0 a 40 μ mol L⁻¹. Para os mesmos estudos com a α -glucosidase, foram utilizadas concentrações de substrato variando de 0,1 a 1,2 mmol L⁻¹ e acarbose variando de 0,0 a 0,6 mmol L⁻¹.

4.5.3 Condições eletroforéticas

Nos experimentos do estudo 2 foram utilizados capilares de 48,5 cm de comprimento total (efetivo de 40 cm) com diâmetro interno de 50 μm , externo de 375 μm e com revestimento externo de poliimida. O detector foi ajustada em 230, 298 e 406 nm, devido aos máximos de absorção de padrões internos e produtos de reação. Para se realizar o experimento, o capilar teste é previamente preenchido com o BGE, e as soluções de enzima e substrato (com ou sem inibidor), são introduzidas pela entrada (“*inlet*”) do capilar hidrodinamicamente em modo “sanduíche”, assim como feito no estudo 1 (item 4.4.1). O procedimento de injeções múltiplas para obtenção do teste duplo simultâneo em um único experimento foi realizado injetando duas sequências de teste (cada uma com seus componentes específicos de AChE e α -glicosidase) em sequência com um plugue (chamado de espaçador) composto apenas pelo BGE, entre as duas injeções, com 50 mbar por 10 s.

Após todas as injeções, o BGE foi inserido com 50 mbar por 30 s, com a finalidade de empurrar todos os segmentos para a região termostaticada do capilar, que é aquela que fica no interior do cartucho do equipamento. Uma vez injetados, os plugues são deixados em repouso por um período de incubação de 2 min para que a reação aconteça. Ao final, uma tensão de 30 kV é então aplicada para promover o processo de separação.

4.6 ESTUDO 3 – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE IMER PELO ANCORAMENTO DA AChE EM MNPs APLICADO A EXTRATOS VEGETAIS DE ESPÉCIES DE MYRTACEAE

4.6.1 Preparo das nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas (MNPs) de ferrita de manganês (MnFe_2O_4) foram obtidas por meio de parceria com o Prof. Dr. Alexandre Luis Parize e sua aluna Natália Bruzamarello Caon do Laboratório de Estudo em Materiais Poliméricos da UFSC. Essas nanopartículas foram submetidas a processo baseado em trabalho de LIU, CHEN e SHI (2017), com algumas modificações, para a incorporação da enzima AChE.

4.6.1.1 Incorporação de AChE às MNPs

Para se efetuar a incorporação de AChE às MNPs de MnFe_2O_4 , elas primeiramente foram funcionalizadas com quitosana (QTS) de massa

molar média. Previamente, 100 mL de uma solução de QTS $0,4 \text{ g L}^{-1}$ foi preparada empregando ácido acético 1 % (pH 4) como solvente e deixado em agitação por 12 h. Uma alíquota de 2,8 mL de ferrofluido de MNPs de MnFe_2O_4 (1,0 g de MnFe_2O_4) foi lavada com citrato (3 lavagens com ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ultrassom por 20 min a cada lavagem e separação magnética para remover o sobrenadante) e adicionada à solução de QTS, sob agitação em equipamento de Ultra-Turrax® em velocidade de 3000 rpm por 5 min. Em seguida, 50 mL de solução de tripolifosfato (TPP) $0,5 \text{ g L}^{-1}$ foi adicionado a mistura de MnFe_2O_4 e QTS, e agitado novamente em equipamento de Ultra-Turrax® com 8000 rpm por 40 min. Após, o compósito resultante ($\text{MnFe}_2\text{O}_4@QTS$) foi separado do sobrenadante com auxílio de imã de neodímio, lavado 6 vezes com água ultrapura e liofilizado. A massa final obtida foi de 0,9656 g.

Para garantir uma boa fixação da enzima com as MNPs, utilizou-se glutaraldeído (GA) como reticulante da QTS, realizando ligação cruzada entre a enzima e as MNPs com QTS. 50 mg de $\text{MnFe}_2\text{O}_4@QTS$ foram dispersas em 30 mL de solução de GA 2,5 % e deixado sob agitação magnética por 4 h em temperatura ambiente. O sólido resultante ($\text{MnFe}_2\text{O}_4@QTS\text{-GA}$) foi novamente separado do sobrenadante com auxílio de imã de neodímio, lavado seis vezes com água ultrapura e liofilizado. O processo final utilizou 1,0 mg de $\text{MnFe}_2\text{O}_4@QTS\text{-GA}$ ressuspenso em 900 μL de BGE borato-fosfato (como citado no item 4.4.2) ao qual adicionou-se 100 μL de solução de AChE a 100 U mL^{-1} também em BGE borato-fosfato. Essa mistura foi deixada sob agitação em agitador de mesa com 2000 rpm por 2 h em temperatura ambiente. O sólido resultante ($\text{MnFe}_2\text{O}_4@QTS\text{-GA-AChE}$) foi lavado três vezes com BGE borato-fosfato e acondicionado em 1 mL do mesmo eletrólito sob refrigeração ($2 - 8 \text{ }^\circ\text{C}$) até o uso.

4.6.2 Caracterização das MNPs

4.6.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras secas foram maceradas em gral de ágata com KBr grau espectroscópico. Imediatamente após a produção da pastilha sob lâmpada incandescente, os espectros foram adquiridos no espectrômetro de infravermelho, em modo absorbância, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , com 64 aquisições e resolução espectral de 2 cm^{-1} .

4.6.2.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A determinação do raio hidrodinâmico foi realizada utilizando o equipamento multiusuário Zetasizer disponível no Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio), com laser de 633 nm. A intensidade do espalhamento de luz foi verificada a 173°, em triplicata, e cada medida acumulou 15 correlogramas. Foi utilizada célula capilar plástica para potencial zeta de 1 mL e a concentração de cada dispersão diluída foi de 0,1 mg mL⁻¹.

4.6.2.3 Potencial zeta

Foi utilizado o equipamento multiusuário Zetasizer disponível no Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio), com laser de 633 nm. A análise foi realizada em célula capilar plástica de 1 mL para potencial zeta, e a concentração de cada dispersão diluída foi de 0,1 mg mL⁻¹. As medidas foram obtidas em triplicata. Foi utilizada célula capilar plástica para potencial zeta de 1 mL e a concentração de cada dispersão diluída foi de 0,1 mg mL⁻¹.

4.6.2.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

Para aquisição das curvas termogravimétricas, foi utilizada uma termobalança TGA-50, em que aproximadamente 12 mg de cada amostra foram depositadas em suporte de platina e aquecidos até 1.000 °C, a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, utilizando nitrogênio como gás de arraste (50 mL min⁻¹).

4.6.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Para avaliar a distribuição de tamanhos da ferrita de manganês e recobrimento com quitosana, imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC realizadas em parceria com a doutoranda Natália Bruzamarillo Caon

Foram preparadas dispersões diluídas de cada material em solvente adequado (isopropanol para ferrita de manganês, água para MnFe₂O₄@QTS), as quais foram homogeneizadas em ultrassom e depositadas sobre *grid* de cobre com filme de carbono ultrafino, com auxílio de micropipeta. Após secagem do solvente, as amostras foram armazenadas em porta *grid* até a análise.

4.6.2.6 Difração de raios-X (XRD)

Os difratogramas da ferrita de manganês e da amostra $\text{MnFe}_2\text{O}_4@QTS$ foram obtidos em um difratômetro disponível no Laboratório de Difração de Raios-X (multiusuário) do Departamento de Física da UFSC. Estas análises foram realizadas em parceria com o Professor Fabricio Luiz Faita (Instituto de Física/UFRGS).

4.6.2.7 Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM)

O equipamento multiusuário modelo PPMS EverCool-II® equipado com *Vibrating Sample Magnetometer* (VSM) marca Quantum Design, disponível no Laboratório Multiusuário de Caracterização Magnética de Materiais (LMCMM) da UFSC, foi utilizado para obtenção das curvas de magnetização em temperatura de 300 K.

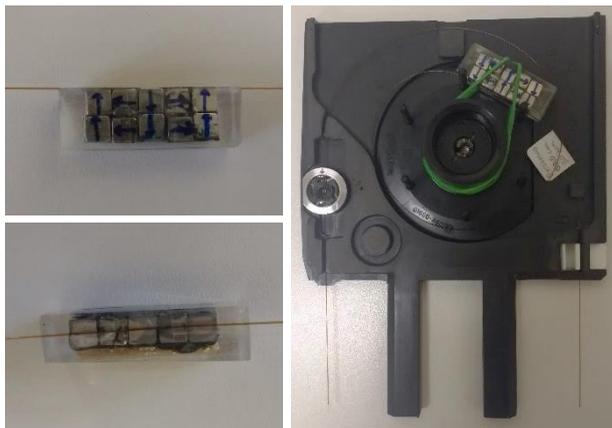
Esta caracterização magnética é importante para avaliar as propriedades magnéticas da ferrita de manganês sem recobrimento, e também o efeito do recobrimento de quitosana. Estas análises foram realizadas em parceria com o Professor Dr. Fabricio Luiz Faita (Instituto de Física/UFRGS).

4.6.3 Montagem externa do microrreator de enzima imobilizada

Para a confecção do IMER, utilizaram-se 10 imãs de neodímio (cada um com 5x5x5 mm) que foram organizados em duas colunas de arranjo de Halbach (figura 15). Para efetiva imobilização do arranjo de imãs, utilizou-se massa de acrílico para formar um bloco, que uma vez confeccionado teve aproximadamente 3,5 cm de comprimento, 11 mm de altura e 6 mm de espessura. Esse bloco de arranjo de imãs foi realizado pela aluna Natália Bruzarella Caon do Laboratório de Estudo em Materiais Poliméricos da UFSC e gentilmente cedido para a execução deste estudo.

Esse bloco de imãs, que serve de força para aprisionar no interior do capilar as MNPs funcionalizadas com a enzima AChE, teve um capilar fixado com fita adesiva na face de maior campo magnético, posicionado no meio do arranjo de imãs e a exatos 11,5 cm da extremidade do capilar. Dessa forma, com o auxílio de um elástico, o bloco de imãs fica posicionado no interior do cartucho de equipamento de eletroforese capilar (figura 15), garantindo assim o controle de temperatura na região onde as MNPs ficaram aprisionadas.

Figura 15 - Imagens da montagem do microrreator de enzima imobilizada. Imagem lateral do bloco de imãs em arranjo de Halbach (A), imagem superior do bloco de imãs em arranjo de Halbach e bloco de imã com capilar fixado acomodados no interior do cartucho do equipamento de eletroforese capilar (C).



Fonte: O autor.

4.6.4 Experimento de atividade enzimática com IMER

4.6.4.1 Preparo dos extratos vegetais

Os extratos hidroalcoólicos vegetais utilizados foram gentilmente cedidos por parceria com a Prof. Dr.^a Michele Debiasi Alberton, do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, do departamento de ciências farmacêuticas da Universidade Regional de Blumenau (FURB). Para produzi-los, foram coletadas as folhas de sete espécies da família Myrtaceae no estado de Santa Catarina, sendo elas: *Eugenia brasiliensis* Lam., *Eugenia catharinensis* D.Legrand, *Eugenia involucrata* DC., *Eugenia platysema* O.Berg, *Myrcia pubipetala* Miq., *Myrcia splendens* (Sw.) DC. e *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel.

O material vegetal, após coleta e identificação, foi seco em estufa com circulação de ar a 50 °C e moído em moinhos de facas. Este material foi submetido a procedimento de maceração em etanol 70 % (m m⁻¹) durante sete dias. O extrato obtido foi filtrado e o solvente extrator evaporado em rota-evaporador (com temperatura inferior a 60 °C) com condensador acoplado sob vácuo, sendo concentrado até seu volume ser reduzido. Repetiu-se o procedimento por mais duas vezes, e após a

evaporação total do solvente, obteve-se o extrato que foi utilizado nos ensaios de inibição enzimática.

4.6.4.2 Soluções

O BGE foi também tampão borato-fosfato 30 mmol L⁻¹ (pH 8,0). As soluções para o ensaio enzimático foram preparadas com o inibidor padrão (neostigmina) ou amostra teste de extrato (100 mg L⁻¹), 1,0 mmol L⁻¹ de substrato (AChE), 20 mmol L⁻¹ de MgSO₄ e imidazol como padrão interno a 0,2 mmol L⁻¹ em BGE. As soluções de extratos vegetais para os testes de atividade inibitória foram preparadas dissolvendo 1,0 mg do material seco em 1,0 mL de MeOH e centrifugando a 12.000 rpm por 120 s. Com o objetivo de se realizar estudos cinéticos e inibitórios da AChE imobilizada, foram utilizadas diferentes concentrações de substrato, variando de 0,2 a 5,0 mmol L⁻¹, e neostigmina, variando de 0,0 a 40 μmol L⁻¹.

4.6.4.3 Condições eletroforéticas

Nos experimentos do estudo 3 foram utilizados capilares de 56,5 cm de comprimento total (efetivo de 48 cm) com diâmetro interno de 75 μm, externo de 375 μm e com revestimento externo de poliacrilato. O detector foi ajustado em 210 e 230 nm, devido aos máximos de absorção de padrão interno e produto de reação.

Uma vez montada a configuração externa do microrreator, isto é, o capilar fixo no bloco de ímãs acondicionado no do cartucho, a introdução das nanopartículas foi realizada no próprio equipamento de eletroforese capilar. Para isso, o capilar previamente preenchido com BGE borato-fosfato foi lavado com 1.000 mbar por 30 s com a solução de 1,0 mg mL⁻¹ de MnFe₂O₄@QTS-GA-AChE também em BGE borato-fosfato, previamente homogeneizada. Após este procedimento, o capilar foi lavado com 1.000 mbar por 30 s com o BGE borato-fosfato, com o intuito de se remover o excesso de nanopartículas que porventura não ficarem aprisionadas pelo ímã.

Após montadas as configurações externas e internas do microrreator, o mesmo está pronto para a realização dos experimentos de atividade enzimática. Para se realizar o experimento, ao capilar do microrreator já previamente preenchido com o BGE borato-fosfato foi introduzida pela entrada (“*inlet*”) do capilar hidrodinamicamente com 50 mbar por 5 s a solução de teste, e BGE borato-fosfato com 50 mbar por 60 s, este com a finalidade de empurrar o plugue de teste para a região do

imã no interior do cartucho do equipamento, isto é, onde se encontram as MNPs. Após as injeções, uma tensão de 15 kV foi então aplicada para promover o processo de separação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO 1 – DESENVOLVIMENTO DE EMMA MÚLTIPLO PARA AChE E α -GLICOSIDASE APLICADO A SUCOS DE FRUTAS

Métodos de EMMA para avaliação da atividade da AChE utilizam o interior do tubo capilar como meio para que a enzima catalise a hidrólise do substrato sintético (A_{Th}Ch) em tiocolina e acetato. Uma vez ocorrida a reação, a tensão aplicada sobre o capilar permite a separação do produto e substrato remanescente, e através da integração do pico de tiocolina é possível estimar a atividade da enzima. Da mesma forma, para a enzima α -glucosidase, o substrato sintético (p-NPG) é convertido em *p*-nitrofenol (p-NP) e glicose, e uma estimativa da atividade enzimática é feita com base na área do pico do p-NP.

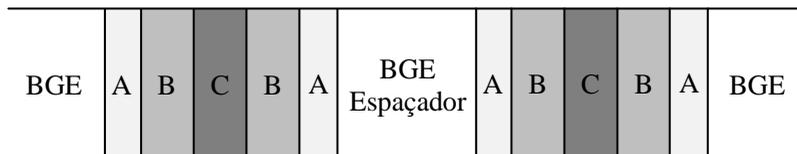
Baseando-se em trabalho de MARTÍN-BIOSCA e colaboradores (2009), conseguiu-se, com algumas modificações, reproduzir a técnica de avaliação da atividade da AChE. O método de EMMA proposto é baseado na abordagem de plugues injetados em um modo chamado “sanduíche”, isso porque a solução de substrato, que pode ou não conter inibidor ou amostra, é inserida no capilar entre dois plugues de solução da enzima de interesse. A mistura dos segmentos injetados para a reação enzimática ocorrer é baseada em dois fatores: difusão passiva; e pelo fenômeno de TDLFP. A última, é a formação de um perfil parabólico na interface dos plugues ao injetar um plug subsequente com pressão alta o suficiente, por um curto período de tempo (SCRIBA; BELAL, 2015).

Uma vez estabelecida a metodologia de EMMA, utilizou-se o sistema de injeções múltiplas sequenciais no aprimoramento do método, com vistas ao aumento da frequência analítica. Para tanto, entre cada uma das injeções de teste feitas pelo modo “sanduíche”, injetou-se um plugue de apenas BGE por 12 s com 50 mbar, atuando como um “espaçador” ou “divisor”, separando as duas seções “sanduíche” de teste (figura 16). Para se corrigir possíveis erros de injeção, utilizou-se padrão interno nas soluções de substrato, no caso da AChE, o selecionado foi propranolol, em concentração constante de 25 mg L⁻¹.

Dessa forma, conseguiu-se separar de maneira efetiva todos os analitos, com resolução e eficiência adequada, permitindo a realização de dois experimentos de inibição da AChE em uma única corrida eletroforética (figura 17). Esse tipo de abordagem é particularmente interessante, pois permite que em um mesmo experimento eletroforético (aproximadamente 5 min de processos de injeção e incubação e 2,5 min de corrida) sejam obtidos, por exemplo, os resultados para o controle

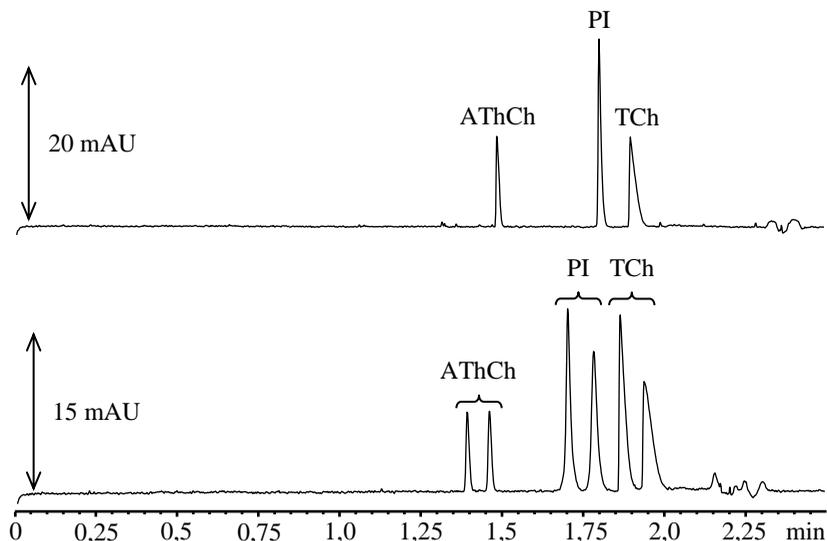
negativo e uma amostra. Isso significa que, em apenas um experimento de poucos minutos, é possível efetuar o cálculo de inibição de uma amostra em estudo, concomitante com uma grande economia de reagentes e reduzida geração de resíduos.

Figura 16 - Representação esquemática da injeção múltipla em EMMA dentro do capilar. A – água deionizada; B – AChE 10 U mL⁻¹; C – Solução de AThCh com ou sem inibidor/amostra e 25 mg L⁻¹ de propranolol como padrão interno.



Fonte: O autor.

Figura 17 - Comparação de eletroferogramas de EMMA de AChE em injeção simples (superior) e injeção múltipla (inferior). AThCh – iodeto de acetiltiocolina (substrato); PI – padrão interno (propranolol); TCh – tiocolina (produto).



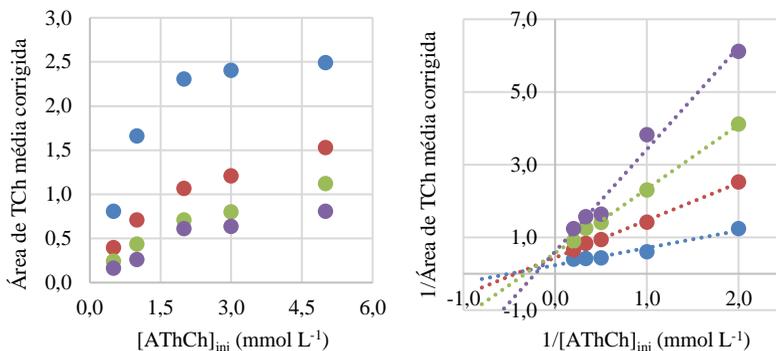
Fonte: O autor.

Com o objetivo de se avaliar os parâmetros de cinética enzimática pelo método, foram construídos gráficos de Michaelis-Menten e seus respectivos gráficos de duplos recíprocos, conhecidos por Lineweaver-

Burk. Como todos os experimentos foram realizados utilizando um mesmo tempo de incubação (2 min), admitiu-se aqui, no lugar de velocidade inicial da reação (V_0), classicamente o eixo y em um gráfico de Michaelis-Menten, como sendo a área corrigida do produto da reação. Sendo assim, o gráfico de Michaelis-Menten foi construído com a área corrigida do pico do produto no eixo y e a concentração de substrato utilizada na solução de injeção no eixo x. Já o gráfico de Lineweaver-Burk foi construído com o inverso da área corrigida do produto da reação no eixo y e o inverso da concentração de substrato utilizado na solução de injeção no eixo x.

Como inibidor padrão da enzima AChE, utilizou-se a neostigmina, um inibidor reversível de média duração pertencente a classe dos carbamatos. Analisando os dois gráficos supracitados, algumas informações podem ser inferidas. No caso daqueles referentes ao método para AChE (figura 18), uma análise qualitativa das retas de tendências traçadas no gráfico de Lineweaver-Burk, nos revela um aumento do K_m (intercepto com o eixo x) e uma diminuição de $V_{máx}$ (intercepto com o eixo y), o que indica um comportamento de inibição misto. De mesma forma, com a curva traçada sem a presença do inibidor padrão, é possível com a equação 2, o cálculo do K_m , que foi estimado em $2,01 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 18 - Gráfico de Michaelis-Menten (à esquerda) e seu correspondente gráfico de Lineweaver-Burk (à direita) para a reação de AChE. Neostigmina à (●) $0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (●) $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (●) $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e (●) $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em concentrações variadas de AThCh.



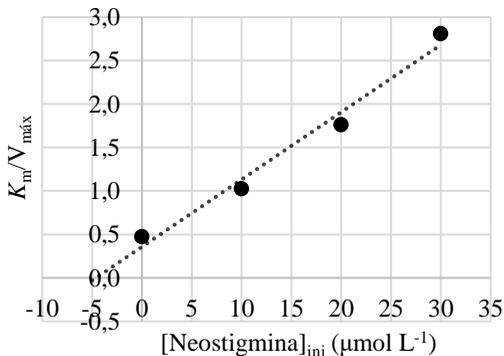
Fonte: O autor.

Em busca por valores de K_m para comparação do método, nota-se que a presente literatura contém variações significativas dos parâmetros enzimáticos da AChE. Os parâmetros relatados diferem notavelmente

devido a diferentes métodos utilizados, suas abordagens, da fonte de enzima utilizada, as condições de armazenamento, dentre outros (POHANKA et al., 2011). Quando AChE de ratos é utilizada, dependendo do tecido de origem, valores de K_m de $0,147 \text{ mmol L}^{-1}$ para enzima de retina e $0,423 \text{ mmol L}^{-1}$ para enzima proveniente de cérebro, são obtidos por método em espectrofotômetro utilizando ACh como substrato (TUNNICLIFF; TSUKADA; BARBEAU, 1976). De maneira parecida, utilizando AChE comercial obtida de enguia elétrica (a mesma do presente estudo) pelo método clássico de Ellman, um valor de K_m de $0,206 \text{ mmol L}^{-1}$ é obtido (POHANKA et al., 2011).

O valor de K_m no presente estudo é maior, o que poderia indicar uma afinidade menor do substrato pela enzima. Entretanto, em outro estudo utilizando o método de Ellman, AChTh como substrato e AChE de cérebro de rato, obteve um valor K_m de $2,65 \text{ mmol L}^{-1}$, se assemelhando a este estudo (ROY; CHAUDHURI, 2006). Resultados obtidos aqui podem ser assumidos como em concordância com a literatura, uma vez que se encontra dentro de uma mesma ordem de grandeza daqueles reportados.

Figura 19 - Gráfico para determinação de K_i de neostigmina.



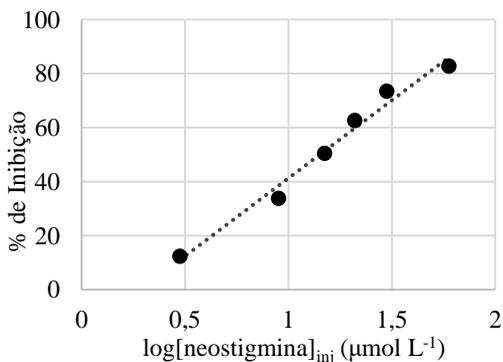
Fonte: O autor.

Outro parâmetro cinético importante na avaliação do método é a determinação da constante de inibição (K_i), aqui no caso da neostigmina. No método proposto, calculou-se o K_i através da construção de gráfico com os dados de coeficiente linear ($K_m/V_{\text{máx}}$, obtidos do gráfico de Lineweaver-Burk) no eixo y e a concentração do inibidor no eixo x (Figura 19). Neste gráfico o ponto de interseção no eixo x da linha de tendência é igual a $-K_i$, e foi estimado em $4,62 \mu\text{mol L}^{-1}$. Em estudo com

AChE do peixe ciclídeo jaguar (*Parachromis managuensis*), os autores obtiveram K_i de $0,0044 \mu\text{mol L}^{-1}$ (ARAÚJO et al., 2016) um valor quase 1000 vezes menor que o encontrado no presente método. Assim como o K_m , vários fatores podem ter contribuído para essa discrepância, como por exemplo o método usado, que no caso foi por estimativa matemática usando a equação de Cheng e Prusoff, que usa valores de IC_{50} , concentração de substrato e K_m para calcular o K_i , além da fonte da enzima ser diferente.

Por fim, determinou-se a concentração necessária para inibir em 50 % a atividade da enzima (IC_{50}) com a neostigmina. Para tanto, construiu-se um gráfico de porcentagem de inibição por concentração de inibidor (figura 20). Através da equação da reta de tendência deste gráfico, essa concentração foi determinada como sendo $14,194 \pm 0,028 \mu\text{mol L}^{-1}$. Comparando com valores de literatura, novamente se observa que existem resultados muito diversos. O mesmo estudo de ARAÚJO et al. (2016), que obteve o K_i de $0,0044 \mu\text{mol L}^{-1}$, obteve uma IC_{50} para neostigmina de apenas $0,61 \mu\text{mol L}^{-1}$, o que seria um valor consideravelmente menor que o aqui encontrado.

Figura 20 - Gráfico de inibição da AChE na presença de neostigmina.



Fonte: O autor.

Entretanto, assim como os outros parâmetros avaliados, a pesquisa na literatura trouxe valores de IC_{50} bem mais próximos. Dois estudos de triagem para identificação de novos inibidores da AChE, um com derivados da 4-metoxifenetilamina (ABBASI et al., 2018) e outro com derivados de 1-acetil-3-aryl tioureias (SAEED et al., 2017), obtiveram pelo método clássico de Ellman IC_{50} para neostigmina de $2,036 \pm 0,058 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de $22,2 \pm 3,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados são

de fato mais próximos aos aqui expostos, corroborando com o método proposto.

Da mesma forma, com base no trabalho de GUO e colaboradores (2010), e implementando o uso de injeções múltiplas sequenciais, se propôs também um método que fosse capaz de realizar dois testes de atividade enzimática da α -glicosidase. Para isso, de maneira similar ao método múltiplo de AChE anteriormente exposto, utilizou-se um plugue composto apenas de BGE para atuar como espaçador entre duas sequências “sanduíches” de teste (figura 21). O tamanho deste plugue de espaçador otimizado para este método foi de 50 mbar por 20 s, obtendo-se com êxito separação de produtos e padrões internos das duas sequencias de injeções (figura 22). Novamente, para se corrigir possíveis erros de injeção, utilizou-se padrão interno nas soluções de substrato, no caso da α -glicosidase, o selecionado foi ácido cinâmico, em concentração constante de 25 mg L⁻¹.

Figura 21 - Representação esquemática da injeção múltipla em EMMA dentro do capilar. A – água deionizada; B – α -glicosidase 10 U mL⁻¹; C – solução de p-NPG com ou sem inibidor/amostra e 25 mg L⁻¹ de ácido cinâmico como padrão interno.



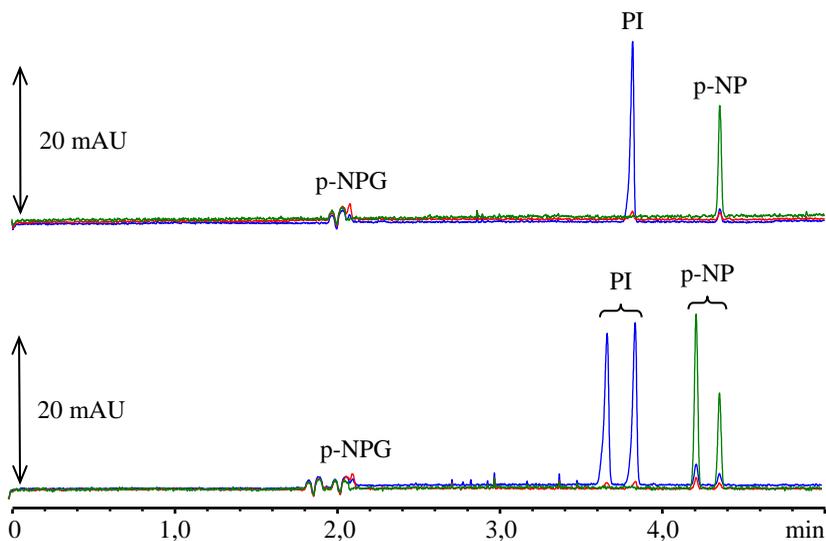
Fonte: O autor.

Da mesma forma que para o método múltiplo de AChE, os parâmetros cinéticos do método, utilizando os gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk, também foram avaliados. Como inibidor padrão da α -glicosidase, utilizou-se acarbose. Uma análise qualitativa das retas de tendências traçadas no gráfico de Lineweaver-Burk (figura 23), nos permite perceber, um aumento do K_m (intercepto com o eixo x) e um $V_{m\acute{a}x}$ quase inalterado (intercepto com o eixo y), o que indica um comportamento de inibição competitivo. Ainda com o mesmo gráfico, o K_m calculado a partir da equação da reta de tendência sem a presença do inibidor foi estimado em 0,98 mmol L⁻¹.

Outro método de EMMA, porém em abordagem de injeções simples (um resultado por corrida), desenvolvido também para a α -glicosidase obteve um valor de K_m de 0,9 mmol L⁻¹, valor similar ao do presente trabalho. Os autores ainda executam no mesmo estudo, ensaio

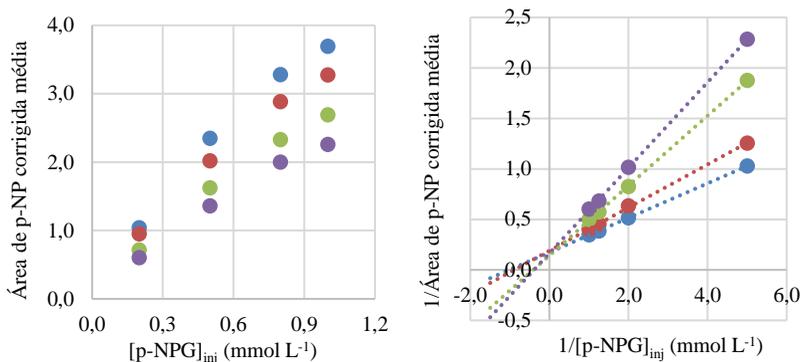
de atividade da enzima α -glicosidase por método espectrofotométrico tradicional para comparação, e obtiveram um valor de $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$, mais uma vez corroborando com o valor aqui estimado (KANIE; KANIE, 2002). Ainda, trabalho que avaliou a capacidade dos fenólicos de *Eleusine coracana* L. em inibir a enzima α -glicosidase, adquiriu experimentalmente K_m de $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$, executado por método espectrofotométrico clássico, e que é consideravelmente maior que o aqui avaliado (SHOBANA; SREERAMA; MALLESHI, 2009). Outro estudo porém, que avaliou parâmetros cinéticos da enzima com substrato diferente por método amperométrico, obteve K_m de $0,45 \text{ mmol L}^{-1}$ (HAYASHI et al., 2006), o que mais uma vez comprova que são encontrados na literatura uma vasta gama de valores cinéticos para uma mesma enzima, dependendo dos parâmetros executados no ensaio.

Figura 22 - Comparação de eletroferogramas de EMMA de α -glicosidase em injeção simples (superior) e injeção múltipla (inferior). p-NPG – *p*-nitrofenil α -D-glicopiranosídeo (substrato); PI – padrão interno (ácido cinâmico); p-NP – *p*-nitrofenol (produto). Acarbose (controle de inibição) em concentração de 100 mg L^{-1} . Linha azul referente à aquisição em 270 nm , vermelha à 306 nm e verde à 406 nm .



Fonte: O autor.

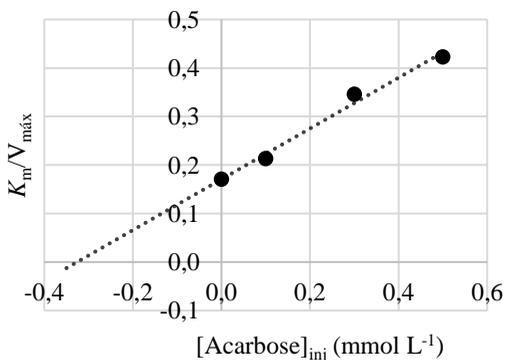
Figura 23 - Gráfico de Michaelis-Menten (à esquerda) e seu correspondente gráfico de Lineweaver-Burk (à direita) para a reação de α -glicosidase. Acarbose à (●) 0 mmol L⁻¹, (●) 0,1 mmol L⁻¹, (●) 0,3 mmol L⁻¹ e (●) 0,5 mmol L⁻¹ em concentrações variadas de p-NPG.



Fonte: O autor.

Através do gráfico de $K_m/V_{máx}$ por concentração de acarbose (figura 24), estimou-se um K_i de 0,326 mmol L⁻¹, que está de acordo com valor encontrado na literatura de 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (KIMURA et al., 2004). Entretanto, valores mais baixos, como $62 \pm 13 \mu\text{mol L}^{-1}$ (SIM et al., 2010) e $77,9 \pm 11,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (KIM et al., 1999) também são reportados na literatura.

Figura 24 - Gráfico para determinação de K_i de acarbose.

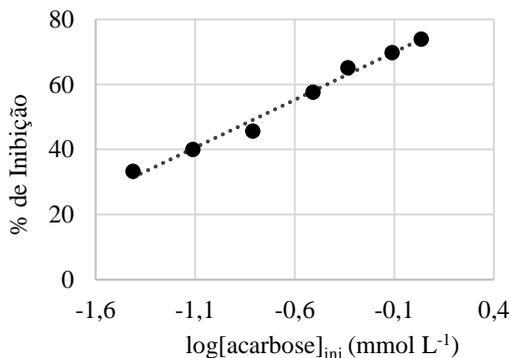


Fonte: O autor.

Concluindo a avaliação do método, a IC_{50} foi mensurada da mesma forma que para o método da AChE, traçando-se um gráfico de

porcentagem de inibição por concentração do inibidor acarbose (figura 25). Através da equação da reta de tendência, estimou-se esse valor em $0,166 \pm 0,002 \text{ mmol L}^{-1}$, o que está de acordo com alguns valores encontrados na literatura. Dois estudos distintos que realizaram a verificação da atividade da enzima α -glicosidase por método espectrofotométrico clássico, obtiveram valores de IC_{50} de $0,201 \pm 0,019 \text{ mmol L}^{-1}$ (WAN et al., 2012) e $0,62 \pm 0,12 \text{ mmol L}^{-1}$ (YANG et al., 2016), e corroboram com o método aqui proposto.

Figura 25 - Gráfico de inibição da α -glicosidase na presença de acarbose.



Fonte: O autor.

Buscando-se uma aplicação para o método, pensou-se em utilizá-lo para verificar a possível atividade inibitória frente as enzimas por sucos naturais de frutas. Dessa forma, treze frutas foram adquiridas em mercado local e utilizadas para produção de sucos (método disponível na seção 4.4.1).

Na tentativa de entender os resultados de inibição enzimática encontrados e sabendo que outros estudos têm demonstrado que compostos fenólicos presentes em amostras de produtos naturais podem contribuir para a inibição das enzimas estudadas (SZWAJGIER, 2014; YANG; LIAN; YU, 2015), realizou-se a pesquisa de compostos fenólicos pelo método clássico de Folin-Ciocalteu e por HPLC-ESI-MS/MS, para associação com os resultados de atividade enzimática inibitória encontrada para os sucos de frutas.

Devido a interferências da matriz, a concentração dos sucos no ensaio de α -glicosidase precisou ser menor do que no ensaio de AChE. No ensaio de AChE, a concentração final de suco foi de $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$, e no ensaio de α -glicosidase foi de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Os resultados para

avaliação da atividade de inibição enzimática (tabela 2 e figura 26) mostram que os sucos de jaboticaba, limão e maracujá apresentaram a melhor atividade inibitória em relação à AChE, com percentuais de inibição de $85,90 \pm 1,73$, $77,51 \pm 1,55$ e $66,38 \pm 1,91$, respectivamente. No caso do ensaio da α -glicosidase, os sucos de pitanga, jaboticaba e amora foram os de melhor atividade inibitória, com porcentagens de inibição de $69,47 \pm 2,89$, $57,91 \pm 2,60$ e $51,73 \pm 2,22$, respectivamente. Como pitanga e jaboticaba apresentaram boas atividades para as duas enzimas, e ambas são da família Myrtaceae e endêmicas da Mata Atlântica do Sul do Brasil, a discussão será focada no suco de fruta dessas duas espécies.

Tabela 2 - Resultados de atividade inibitória de acetilcolinesterase e α -glucosidase e fenólicos totais dos sucos de frutas.

Suco	% de inibição		Capacidade redutora de Folin-Ciocalteu
	AChE ^a	α -Glicosidase ^b	mgAG L ⁻¹
Amora-preta	$28,54 \pm 0,37$	$51,73 \pm 2,22$	$63,28 \pm 6,17$
Goiaba	$36,32 \pm 2,80$	$21,60 \pm 1,43$	$101,23 \pm 18,14$
Jaboticaba	$85,90 \pm 1,73$	$57,91 \pm 2,60$	$303,54 \pm 28,28$
Kiwi	$42,18 \pm 6,58$	$11,13 \pm 0,54$	$6,62 \pm 2,77$
Laranja	$43,22 \pm 2,72$	$8,25 \pm 0,88$	$55,08 \pm 7,69$
Limão-taiti	$77,51 \pm 1,55$	$9,73 \pm 1,55$	$49,44 \pm 8,92$
Maçã	$33,99 \pm 4,38$	$10,44 \pm 1,44$	$23,79 \pm 3,20$
Manga	$44,97 \pm 2,57$	$12,31 \pm 1,39$	n.d.
Maracujá	$66,38 \pm 1,91$	$13,14 \pm 2,91$	$9,18 \pm 2,35$
Morango	$51,43 \pm 1,39$	$23,56 \pm 1,76$	$80,21 \pm 8,15$
Pitanga	$52,67 \pm 1,24$	$69,47 \pm 2,89$	$367,00 \pm 11,42$
Pitaya	$39,28 \pm 4,00$	$19,57 \pm 1,05$	$31,23 \pm 10,88$
Uva	$26,39 \pm 2,21$	$22,28 \pm 0,82$	$3,28 \pm 1,60$
Padrão ^c	$80,64 \pm 0,66$	$39,03 \pm 3,51$	n.a.

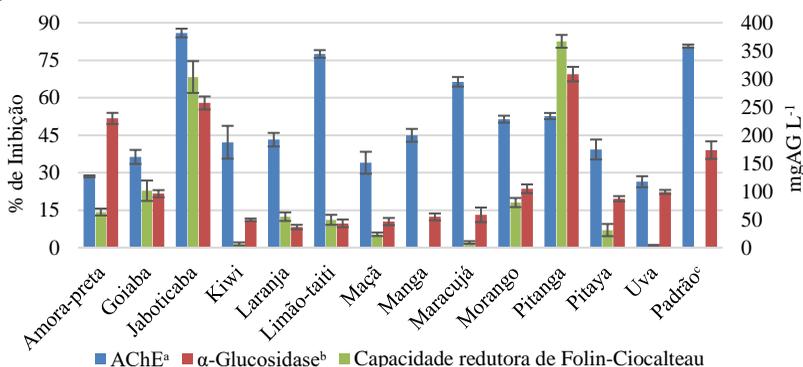
^a Sucos neste ensaio à 5 mg mL⁻¹; ^b sucos neste ensaio à 1 mg mL⁻¹; ^c neostigmina à 10 mg L⁻¹ e acarbose à 100 mg L⁻¹; n.a. não aplicável; n.d. não detectável.

Fonte: O autor.

Em relação à atividade inibitória contra à acetilcolinesterase, no melhor do nosso entendimento, não foram encontrados estudos na literatura relacionados à possível atividade inibitória da pitanga ou da jaboticaba. Já para a jaboticaba, algumas publicações na literatura relatam

a atividade antidiabética dessa planta. Um estudo descobriu que a ingestão de *Myrciaria jaborcaba* por adultos saudáveis aumentou o status antioxidante do soro e diminuiu os níveis de glicose e insulina após a refeição, o que é um indicativo de efeitos clínicos importantes relacionados ao metabolismo da glicose (PLAZA et al., 2016), e um dos possíveis mecanismos para o efeito observado poderia ser a inibição da enzima α -glicosidase, pesquisa que foi realizada pela primeira vez no presente trabalho.

Figura 26 - Resultados de atividade inibitória de acetilcolinesterase e α -glicosidase e fenólicos totais dos sucos de frutas.



^a Sucos neste ensaio à 5 mg mL⁻¹; ^b sucos neste ensaio à 1 mg mL⁻¹; ^c neostigmina à 10 mg L⁻¹ e acarbose à 100 mg L⁻¹; n.a. não aplicável; n.d. não detectável.

Fonte: O autor.

Já sobre as espécies de pitanga, um estudo recente observou que os extratos etanólicos dos frutos de *Eugenia uniflora* inibiram a α -glicosidase *in vitro*, e afirmaram que os resultados poderiam ser explicados pela presença de compostos fenólicos, embora não tem identificado quais estavam presentes (VINHOLES et al., 2017). Isso corrobora com nosso estudo, uma vez que identificamos vários compostos fenólicos importantes, com um efeito também interessante contra a enzima por parte do suco. Além disso, frações do extrato em etanol 70 % das folhas de *E. uniflora* demonstraram efeitos benéficos na hiperglicemia e hipertrigliceridemia pós-prandial em camundongos. Acredita-se que os mecanismos sejam a inibição da decomposição de açúcar e gordura e a absorção de glicose (ARAI et al., 1999). Portanto, *E. uniflora* pode ser útil no tratamento de diabetes e obesidade.

Os resultados para o teor de compostos fenólicos totais (tabela 2 e figura 26) mostraram que os sucos de pitanga e jaboticaba apresentaram altos níveis dessa classe de substância, com $367,00 \pm 11,42$ e $303,54 \pm 28,28$ mgAG L⁻¹, respectivamente. Nas análises por HPLC-ESI-MS/MS (tabela 3), vários compostos fenólicos foram identificados nos sucos, dos quais ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, taxifolina e hispidulina foram descritos nesse estudo pela primeira vez para a espécie *P. cauliflora*; e vanilina e ácido salicílico em *E. uniflora*.

No suco de jaboticaba, o ácido gálico foi o composto fenólico identificado com a maior concentração ($217,0 \pm 54,2$ µg L⁻¹). Um estudo que avaliou o IC₅₀ para AChE de ácido gálico teve um resultado de $16,8$ µmol L⁻¹, enquanto galantamina, um inibidor padrão da enzima, teve uma IC₅₀ de $0,88$ µmol L⁻¹. Embora não tenha sido tão eficaz quanto a galantamina, a atividade anticolinesterásica do ácido gálico pode ser considerada relevante (KIM et al., 2011). Outros compostos fenólicos identificados em nosso trabalho, como o ácido *p*-cumárico, também foram associados à uma relevante atividade de inibição da AChE (SZWAJGIER; BOROWIEC, 2012).

No suco de pitanga, a quercetina foi o principal composto fenólico ($765,2 \pm 53,3$ µg L⁻¹). Este composto também teve sua capacidade de inibir a atividade da enzima α -glucosidase investigada, sendo encontrado um valor de IC₅₀ de 290 µmol L⁻¹, o que os autores do estudo consideraram como uma atividade moderada (WATANABE et al., 1997). Muitos outros compostos fenólicos, alguns identificados no presente estudo, também demonstraram potencial capacidade de inibir a atividade da α -glucosidase. Trabalhos anteriores com ácido cafêico, isoquercetina e rutina isolados de *Edgeworthia gardneri*, apresentaram valores de IC₅₀ de 957 ± 36 , 1233 ± 87 e 272 ± 15 µg mL⁻¹, respectivamente, para esses compostos (MA et al., 2015). Todos esses achados também contribuem para a hipótese de que a inibição das enzimas observada é devida, pelo menos em parte, à presença de compostos fenólicos nas amostras (SZWAJGIER, 2015).

Outros alimentos com expressivo conteúdo de compostos fenólicos também demonstraram efeito promissor sobre essas enzimas. Extratos de azeites extra-virgens espanhóis ricos nessa classe de compostos foram capazes de inibir não só a AChE, mas também a butirilcolinesterase, a 5-lipoxigenase e a monoamina oxidase, todas relacionadas com doenças do sistema nervoso central (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ et al., 2018a). Esses mesmos extratos também inibiram as enzimas α -glucosidase e α -amilase, ambas relacionados ao diabetes. Os autores concluem que esses óleos e os compostos fenólicos podem atuar

como potenciais nutracêuticos no tratamento ou prevenção desses distúrbios (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ et al., 2018b).

De maneira similar ao nosso trabalho, outros sucos também demonstraram atividade promissora sobre as enzimas testadas. Sucos de cinco frutas cítricas inibiram de maneira dose-dependente a atividade da AChE, e essa atividade (assim como a antioxidante) pode fazer parte do mecanismo pelo qual esses sucos cítricos podem ser usados para manejar e/ou prevenir a doença de Alzheimer (ADEMOSUN; OBOH, 2012). Finalmente, em sucos de frutas da Malásia, ácido elágico, miricetina, quercetina, ácido gálico, taxifolina e kaempferol foram identificados e foram capazes de inibir a α -glicosidase. Os autores afirmaram que a atividade inibitória observada poderia estar associada aos compostos polifenólicos presentes nos sucos, e sugeriram tais informações sustentam o uso desses frutos no desenvolvimento de alimentos funcionais (SULAIMAN; OOI, 2014).

Em conclusão desse estudo, a atividade inibidora observada pelos sucos de fruta sobre a AChE e α -glicosidase descritos acima, pode ser explicada, pelo menos em parte, pela presença dos compostos fenólicos identificados. O método de EMMA pela abordagem de injeções múltiplas empregado para investigar a inibição enzimática, provou ser uma ferramenta poderosa para a triagem de atividade inibitória, por meio das vantagens já expostas na discussão, como a rápida análise e o baixo consumo de amostras e reagentes. Os frutos estudados e as substâncias identificadas podem ser considerados para uso em terapia anti-Alzheimer e anti-diabetes. Estudos futuros podem revelar que essas frutas podem ser usadas como alimentos funcionais, ou em tratamentos adjuvantes para as duas doenças aqui mencionadas e possivelmente para outras. Dados desse estudo estão publicados em SIEBERT et al. (2019).

Tabela 3 - Resultados da quantificação de compostos fenólicos nos sucos de frutas por HPLC-ESI-MS/MS (continua).

	tR (min)	[M-H] (<i>m/z</i>)	Íon produto (<i>m/z</i>)	$\mu\text{g L}^{-1}$					
				Amora-preta	Goiaba	Jaboticaba	Kiwi	Laranja	Limão-Taiti
Ácido gálico	3,71	168,9	125,0	n.d.	n.d.	217,0 ± 54,2	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido protocatecuico	6,27	152,9	109,0	26,7 ± 6,6	n.d.	11,2 ± 9,1	n.d.	n.d.	n.d.
Catequina	8,58	289,0	109,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido clorogênico	9,10	353,1	191,0	35,2 ± 4,1	n.d.	8,5 ± 0,8	n.d.	n.d.	n.d.
Epicatequina	9,19	288,9	109,0	n.d.	n.d.	n.d.	28,0 ± 8,0	n.d.	n.d.
Ácido caféico	9,25	178,9	135,0	6,4 ± 1,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vanillina	10,27	150,9	136,0	20,3 ± 9,3	n.d.	n.d.	n.d.	18,1 ± 0,5	n.d.
Ácido <i>p</i> -cumárico	10,32	162,9	119,1	3,6 ± 1,5	n.d.	7,8 ± 1,6	n.d.	1,6 ± 0,7	17,5 ± 6,4
Ácido ferúlico	10,58	192,9	134,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	20,8 ± 7,6	9,9 ± 1,6
Taxifolina	10,59	303,0	125,1	165,7 ± 36,6	n.d.	15,7 ± 3,6	n.d.	n.d.	n.d.
Rutina	10,69	609,2	300,1	22,1 ± 6,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido salicílico	10,75	136,9	93,0	4,4 ± 0,8	2,8 ± 0,4	5,8 ± 1,3	4,1 ± 0,6	4,1 ± 0,1	3,9 ± 1,0
Ácido sinápico	10,76	223,0	148,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	42,7 ± 2,5	4,8 ± 3,3
Isoquercetina	10,79	463,1	300,0	87,7 ± 9,1	n.d.	14,4 ± 2,1	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetina	10,80	300,9	151,0	103,1 ± 23,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Escopoletina	10,93	190,9	179,0	11,0 ± 1,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,1 ± 1,0
Naringina	11,00	580,3	151,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34,4 ± 25,3	n.d.
Aromadendrina	11,21	287,0	125,0	19,1 ± 3,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido elágico	11,78	300,9	145,0	n.d.	n.d.	193,9 ± 66,0	n.d.	n.d.	n.d.
Hispidulina	12,58	298,9	284,0	4,3 ± 2,2	n.d.	2,3 ± 1,5	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. não detectado.

Fonte: O autor.

Tabela 3 - Resultados da quantificação de compostos fenólicos nos sucos de frutas por HPLC-ESI-MS/MS (conclusão).

	tR (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íon produto (m/z)	µg L ⁻¹						
				Maçã	Manga	Maracujá	Morango	Pitanga	Pitaya	Uva
Ácido gálico	3,71	168,9	125,0	n.d.	33,6 ± 11,2	n.d.	24,7 ± 3,2	117,3 ± 12,0	n.d.	n.d.
Ácido protocatecuico	6,27	152,9	109,0	n.d.	n.d.	n.d.		6,7 ± 0,7	n.d.	n.d.
Catequina	8,58	289,0	109,0	14,6 ± 2,4	n.d.	n.d.	398,7 ± 84,3	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido clorogênico	9,10	353,1	191,0	94,8 ± 12,6	n.d.	n.d.	n.d.	4,5 ± 0,8	n.d.	n.d.
Epicatequina	9,19	288,9	109,0	82,7 ± 29,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido cafêico	9,25	178,9	135,0	n.d.	n.d.	4,6 ± 1,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vanillina	10,27	150,9	136,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13,3 ± 3,9	n.d.	n.d.
Ácido <i>p</i> -cumárico	10,32	162,9	119,1	n.d.	1,1 ± 0,3	3,4 ± 0,2	2,6 ± 0,9	4,7 ± 0,5	n.d.	n.d.
Ácido ferúlico	10,58	192,9	134,0	n.d.	n.d.	6,8 ± 3,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Taxifolina	10,59	303,0	125,1	n.d.	7,0 ± 2,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido salicílico	10,75	136,9	93,0	2,7 ± 0,5	n.d.	4,9 ± 1,2	6,3 ± 1,4	6,3 ± 1,9	3,9 ± 0,6	n.d.
Isoquercetina	10,79	463,1	300,0	41,1 ± 13,7	110,1 ± 10,7	n.d.	n.d.	62,6 ± 9,7	n.d.	n.d.
Quercetina	10,80	300,9	151,0	326,4 ± 180,2	322,0 ± 95,6	n.d.	159,9 ± 25,0	765,2 ± 53,3	n.d.	70,5 ± 3,9
Ácido <i>p</i> -anísico	11,17	150,9	107,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	289,9 ± 64,8	n.d.
Aromadendrina	11,21	287,0	125,0	n.d.	3,4 ± 1,7	n.d.	116,0 ± 36,5	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido elágico	11,78	300,9	145,0	n.d.	88,1 ± 29,1	n.d.	68,8 ± 10,3	n.d.	n.d.	n.d.
Hispidulina	12,58	298,9	284,0	n.d.	12,0 ± 5,2	n.d.	n.d.	n.d.	5,8 ± 0,3	n.d.

n.d. não detectado.

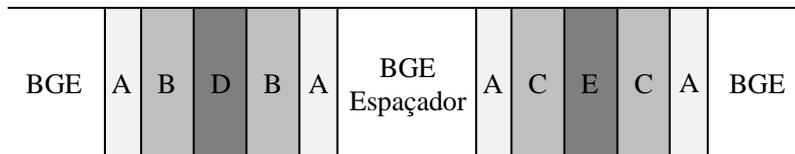
Fonte: O autor.

5.2 ESTUDO 2 – DESENVOLVIMENTO DE EMMA DUPLO SIMULTÂNEO PARA AChE E α -GLICOSIDASE APLICADO A COMPOSTOS FENÓLICOS SELECIONADOS

Buscado um maior aprimoramento dos métodos anteriormente proposto, pensou-se na hipótese de realizar o ensaio de ambas as enzimas no mesmo experimento eletroforético, isto é, em uma mesma corrida, resultando em uma análise dupla simultânea.

O BGE escolhido para este procedimento foi o borato-fosfato (pH 8,0), uma vez que ele contribui para uma menor dispersão por eletromigração dos analitos do ensaio de AChE e também possui um pH suficientemente alto para proporcionar a ionização efetiva dos produtos de reação e de seus respectivos padrões internos dos dois ensaios. Outra característica bastante importante é a de que os analitos (substrato, produto e padrão interno) envolvidos em ambas as reações possuem cargas diferentes. Cátions movem-se a favor do EOF e são assim mais rápidos que os ânions, que tem mobilidade contrária ao EOF. No ensaio de AChE os analitos são cátions, e por terem mobilidade no sentido do EOF, são mais rápidos. Já àqueles referentes a α -glicosidase são ânions, e tem mobilidade contrária ao EOF, sendo assim mais lentos. Portanto a co-migração destes não ocorre, o que torna viável a análise simultânea proposta. Entretanto, é importante que o primeiro segmento “sanduíche” de teste injetado seja sempre aquele referente ao ensaio de AChE, para garantir que não haja a mistura dos analitos quanto aplicada a diferença de potencial.

Figura 27 - Representação esquemática da injeção múltipla em EMMA dentro do capilar. A – água deionizada; B – AChE 10 U mL⁻¹; C – α -glicosidase 10 U mL⁻¹; D – solução de AThCh com ou sem inibidor/amostra e 25 mg L⁻¹ de padrão interno propranolol; E – solução de p-NPG com ou sem inibidor/amostra e 25 mg L⁻¹ de 4-hidroxibenzoato de butila como padrão interno.

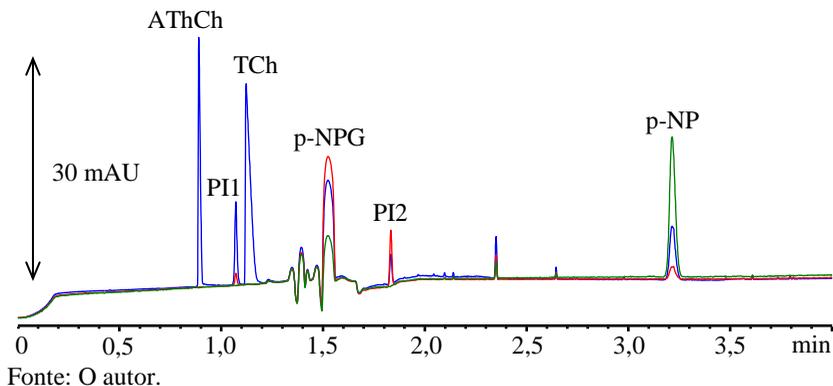


Fonte: O autor.

A abordagem de injeções também foi baseada nos plugues em modo “sanduíche”, e através da introdução de um espaçador de 10 s com

50 mbar de pressão composto apenas por BGE entre as duas seções de teste “sanduíche” de enzimas e substratos distintos (figura 27), foi possível realizar os dois ensaios de atividade enzimática diferentes em apenas uma corrida eletroforética. O eletroferograma obtido com esses parâmetros (figura 28) possui boa resolução, não sendo observada comigração dos analitos essenciais para o cálculo da atividade enzimática.

Figura 28 - Exemplo de eletroferograma de EMMA duplo simultâneo para os ensaios de AChE e α -glicosidase. AThCh – iodeto de acetiltiocolina (substrato); PII – padrão interno 1 (propranolol); TCh – tiocolina (produto); p-NPG – *p*-nitrofenil α -D-glicopiranosídeo (substrato); PI2 – padrão interno 2 (4-hidroxibenzoato de butila); p-NP – *p*-nitrofenol (produto). Linha azul referente à aquisição em 230 nm, vermelha à 298 nm e verde à 406 nm.

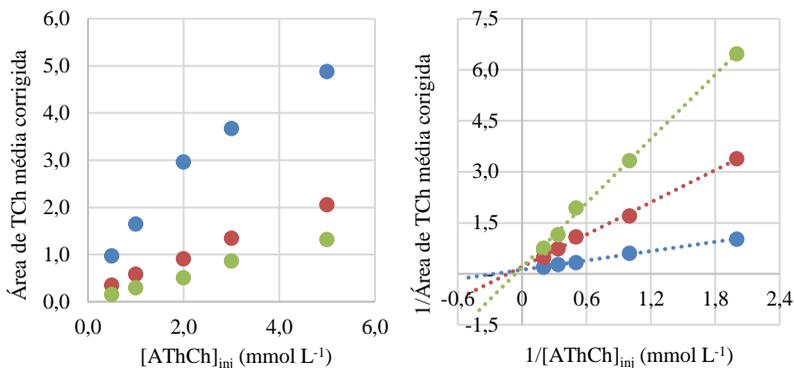


Parâmetros cinéticos para este método duplo simultâneo também foram avaliados. Através da construção dos gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk (figura 29), o K_m para a enzima AChE neste método foi calculado em $3,81 \text{ mmol L}^{-1}$, valor este quase duas vezes maior que o obtido pelo método descrito no estudo 1 deste trabalho (seção 5.1). Entretanto, como já discutido, valores de K_m podem apresentar variações bastante significativas, e valores parecidos com os aqui expostos são reportados na literatura (ROY; CHAUDHURI, 2006). O caráter de inibição do inibidor padrão neostigmina seguiu o encontrado no estudo anterior, apresentando um caráter de inibição misto, divergindo da literatura (ABBASI et al., 2018).

Outro fator importante na avaliação da cinética enzimática, o K_i estimado para a neostigmina neste método através do gráfico de $K_m/V_{\text{máx}}$ por concentração de inibidor (figura 30) foi estimado em $4,27 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, o que corrobora com o método de AChE já exposto aqui no estudo 1 desta

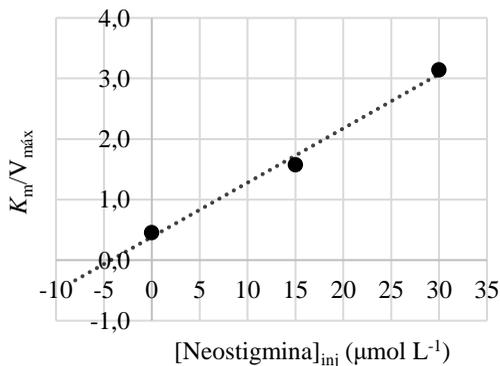
tese (seção 5.1), onde o K_i obtido foi de $4,62 \mu\text{mol L}^{-1}$. Como já discutido anteriormente, valores consideravelmente menores foram encontrados na literatura, porém assim como para os demais parâmetros cinéticos, variações deste parâmetro podem variar dependendo de fatores como por exemplo a fonte da enzima e o método utilizado.

Figura 29 - Michaelis-Menten (à esquerda) e seu correspondente gráfico de Lineweaver-Burk (à direita) para a reação de AChE.



Fonte: O autor.

Figura 30 - Gráfico para determinação de K_i de neostigmina.

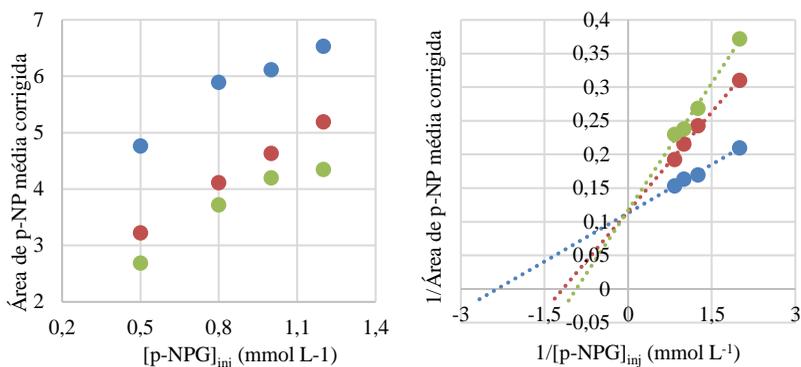


Fonte: O autor.

Os mesmos parâmetros para a α -glicosidase também foram avaliados. O K_m estimado foi de $0,43 \text{ mmol L}^{-1}$ (figura 31). Diferentemente do método de AChE, aqui o K_m foi quase metade do encontrado no método proposto no estudo 1 (seção 5.1), o que indicaria

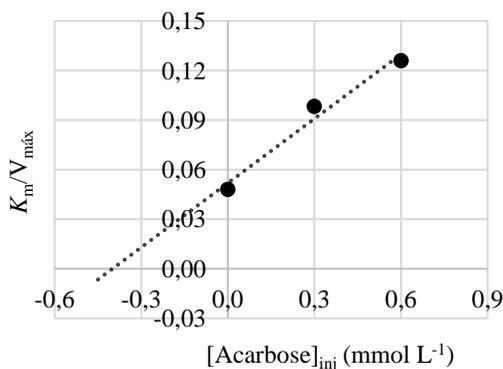
uma maior afinidade da enzima pelo substrato p-NPG. Porém, o valor encontrado corrobora como valor da literatura (HAYASHI et al., 2006) já discutido anteriormente. Além disso, o caráter de inibição do inibidor padrão utilizado, evidenciado pelo gráfico de Lineweaver-Burk, segue o padrão competitivo, o que mais uma vez corrobora com a literatura (GUO et al., 2010). Ainda, o valor de K_i de $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$ estimado para a acarbose por esse método (figura 32) se assemelha ao do proposto pelo estudo 1 (seção 5.1), comprovando a validade do método.

Figura 31 - Michaelis-Menten (à esquerda) e seu correspondente gráfico de Lineweaver-Burk (à direita) para a reação de α -glicosidase.



Fonte: O autor.

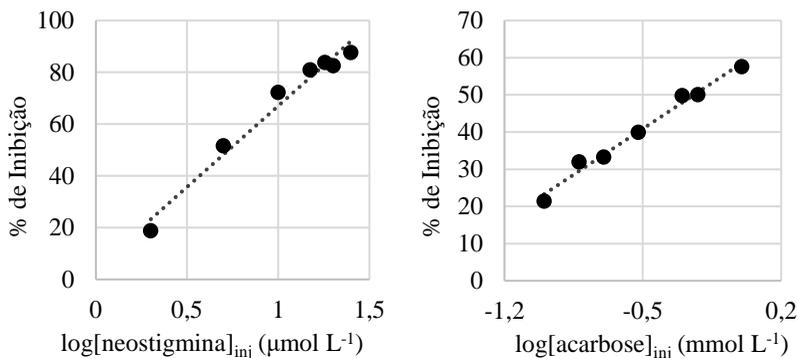
Figura 32 - Gráfico para determinação de K_i de acarbose.



Fonte: O autor.

Em relação aos valores de IC_{50} obtidos, estes foram $5,115 \pm 0,472 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,582 \pm 0,017 \text{ mmol L}^{-1}$ para neostigmina e acarbose, respectivamente (figura 33). A IC_{50} obtida para a neostigmina é consideravelmente menor e a IC_{50} para acarbose é consideravelmente maior que aquelas obtidas no método descrito no estudo 1 (seção 5.1). Em ambos os casos, o que se observa é uma relação inversa entre K_m e IC_{50} . No caso da AChE em que o K_m aumentou, a IC_{50} observada para o inibidor padrão (neostigmina) foi menor, e para a α -glicosidase o inverso foi observado. Uma possível explicação para esse fenômeno talvez seria de que em um K_m maior, a afinidade pelo substrato não é tão elevada e possivelmente uma menor concentração de inibidor seria suficiente para se obter a inibição de 50 % da atividade da enzima.

Figura 33 - Gráficos de inibição da AChE na presença de neostigmina (à esquerda) e inibição da α -glicosidase na presença de acarbose (à direita).



Fonte: O autor.

Com base no estudo 1, onde se investigou a capacidade de sucos de fruta em inibir as enzimas AChE e α -glicosidase, aventou-se a ideia de testar os compostos fenólicos identificados nos sucos de jaboticaba e pitanga (que apresentaram os melhores resultados de inibição) isoladamente frente essas duas enzimas. Para tanto, o método duplo simultâneo aqui proposto pela primeira vez foi empregado. Os compostos fenólicos foram testados em uma concentração de 10 mg L^{-1} , e os resultados encontram-se na tabela 4.

Os compostos fenólicos que apresentaram a melhor atividade contra a enzima AChE foram o ácido *p*-cumárico e o ácido protocatecuico, com inibições de $40,14 \pm 4,75 \%$ e $36,22 \pm 1,19 \%$, respectivamente. Um estudo que avaliou os possíveis mecanismos de

proteção do ácido protocatecuico contra o estresse oxidativo induzido pelo cádmio e a neurotoxicidade em ratos, verificou que este composto fenólico é eficaz em inibir a atividade das enzimas colinesterases (AChE e butirilcolinesterase) *in vivo* no modelo animal utilizado. Os autores concluem que o efeito observado nas enzimas pode proteger contra a neurotoxicidade induzida pelo cádmio (ADEFEGHA et al., 2016). Outro estudo avaliou o potencial de inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase de diferentes maltes de cevada e trigo de cerveja, além dos ácidos fenólicos presentes nestes. Dentre os compostos fenólicos testados, ácido *p*-cumárico foi o que melhor inibiu a AChE (SZWAJGIER; BOROWIEC, 2012).

Tabela 4 - Resultados de atividade inibitória de acetilcolinesterase e α -glicosidase de compostos fenólicos selecionados.

Compostos fenólicos (10 mg L ⁻¹)	% de inibição	
	AChE	α -Glicosidase
Ácido gálico	7,18 ± 2,37	14,10 ± 5,47
Quercetina	23,44 ± 3,84	46,53 ± 4,90
Ácido sinápico	34,07 ± 3,03	4,76 ± 2,06
Ácido salicílico	30,57 ± 1,73	10,52 ± 1,92
Vanilina	31,96 ± 1,81	4,28 ± 0,88
Ácido clorogênico	29,81 ± 4,74	6,87 ± 6,53
Ácido elágico	35,82 ± 2,35	43,75 ± 6,83
Ácido protocatecuico	36,22 ± 1,19	3,79 ± 1,09
Ácido <i>p</i> -cumárico	40,14 ± 4,75	16,89 ± 0,51
Taxifolina	29,72 ± 3,35	15,10 ± 3,40
Neostigmina (10 mg L ⁻¹)	39,77 ± 2,10	-
Acarbose (300 mg L ⁻¹)	-	44,33 ± 3,63

Fonte: O autor.

Já em relação a α -glicosidase, os compostos fenólicos que apresentaram maior o maior potencial de inibição da enzima foram a quercetina e o ácido elágico, com inibições de 46,53 ± 4,90 % e 43,75 ± 6,83 %, respectivamente. Em trabalho que investigou o potencial de inibição da enzima por parte dos extratos metanólicos das folhas secas do *tochu-cha* (*Eucommia ulmoides*), planta usada na medicina tradicional chinesa na forma de chá, os autores demonstraram que a quercetina foi capaz de inibir mais de 50 % da atividade da α -glicosidase a uma

concentração de $24 \mu\text{mol L}^{-1}$ (WATANABE et al., 1997), o que corrobora com resultados obtidos nos testes *in vitro* do presente trabalho.

Outro estudo relevante para comparação, que avaliou o potencial de inibição de compostos fenólicos extraídos das sementes do “cajueiro-japonês” (*Hovenia dulcis*) sobre as enzimas α -amilase e α -glicosidase, obteve resultados expressivos para quercetina, com uma IC_{50} de $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MENG et al., 2016). Em contrapartida, outro trabalho que investigou o mesmo tipo de atividade dos compostos fenólicos das folhas da espécie *Gynura medica*, isolou também a quercetina e obteve uma IC_{50} de $1,67 \pm 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ (TAN et al., 2013), o que nos mostra que, assim como para os parâmetros cinéticos determinados no método, valores de inibição para um mesmo composto podem apresentar variações, dependendo do estudo. O consenso que se pode chegar é o de que o composto inibe a enzima.

Em relação ao ácido elágico, estudo que avaliou o potencial de inibição de compostos fenólicos extraídos do “carvalho da Mongólia” frente a α -glicosidase, encontrou valor de IC_{50} de $3,65 \pm 0,09 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o composto, e apesar de ser um valor comparativamente mais baixo que o aqui relatado, corrobora com nossos resultados (YIN et al., 2018). Por fim, artigo que verificou a atividade inibitória de derivados do ácido elágico obtidos de *Terminalia superba* frente a mesma enzima, também obteve resultados significativos de IC_{50} , na ordem de 7 a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ (TABOPDA et al., 2008).

O método de EMMA duplo proposto, assim como no estudo 1 (seção 5.1) também executado pela abordagem de injeções múltiplas, empregado para investigar a inibição enzimática pelos compostos fenólicos isolados foi de extrema valia, por meio das vantagens da CE já expostas na em discussões anteriores, como a rápida análise e o baixo consumo de amostras e reagentes. Muitos estudos com os compostos de melhor resultado ainda precisam ser feitos (como de farmacocinética e de toxicologia), mas que podem revelar que alguns dos compostos fenólicos aqui estudados, assim como os sucos de frutas, podem ser considerados para uso em terapia anti-Alzheimer e anti-diabetes, como adjuvantes por exemplo para as duas doenças aqui mencionadas e possivelmente para outras.

5.3 ESTUDO 3 – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE IMER PELO ANCORAMENTO DA AChE EM MNPs APLICADO A EXTRATOS VEGETAIS DE ESPÉCIES DE MYRTACEAE

No intuito de se propor um avanço ainda maior das técnicas de verificação de atividade enzimática por CE, a próxima etapa para isso foi o desenvolvimento de um IMER, pois nessa abordagem, a enzima utilizada no ensaio não seria perdida, o que tornaria o método ainda mais econômico em termos financeiros. Como meio de suporte para as enzimas, pensou-se em utilizar MNPs, que seriam aprisionadas dentro do capilar, em uma região específica delimitada, pela força do campo magnético de ímãs de neodímio. Para tanto, firmou-se parceria com o Prof. Dr. Alexandre Luis Parize e sua aluna Natália Bruzamarello Caon do Laboratório de Estudo em Materiais Poliméricos do Departamento de Química da UFSC, que confeccionaram as MNPs de $MnFe_2O_4$ utilizadas nesse estudo.

O ancoramento das enzima às MNPs, baseou-se em trabalho proposto por LIU, CHEN e SHI (2017), que usaram quitosana como meio de revestimento das nanopartículas, e glutaraldeído como intermediário de ligação (*cross-linker*) da quitosana com a enzima. Uma vez confeccionada as nanopartículas funcionalizadas, estas foram submetidas a procedimento de caracterização, com vistas a comprovação da efetiva imobilização da enzima às MNPs.

5.3.1 Caracterizações das nanopartículas magnéticas

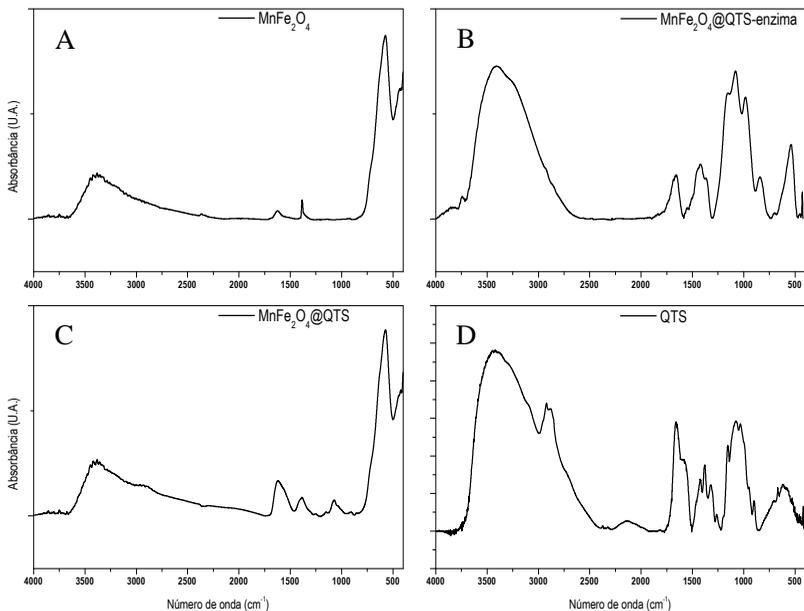
5.3.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

No espectro da ferrita de manganês, as bandas próximas de 400 e 600 cm^{-1} indicam a interação cátion-ânion nos sítios octaédricos e tetraédricos, respectivamente (WALDRON, 1955). Estas bandas estão presentes no espectro apresentado na figura 34-A e são características das estruturas em espinélio, especialmente ferritas (JACOB et al., 2011). A banda em 577 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação metal-oxigênio em sítio tetraédrico, e a banda em 418 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação metal-oxigênio em sítio octaédrico.

As bandas próximas de 3400 e em 1626 cm^{-1} foram assinaladas como deformação axial da ligação O-H e deformação angular de H-O-H para água livre ou absorvida. A banda próxima de 1378 cm^{-1} é referente

à deformação axial assimétrica de $-\text{NO}$, o que indica a presença de nitrato residual (JACOB et al., 2011) da etapa de passivação da superfície.

Figura 34 - Espectros de FTIR de MnFe_2O_4 (A), MnFe_2O_4 @QTS-enzima (B), MnFe_2O_4 @QTS (C) e QTS (D).



Fonte: Gentilmente cedido por Natália Bruzamarello Caon.

No espectro da quitosana (figura 34-D), podem ser observadas bandas características em 1656 cm^{-1} (estiramento de carbonila em amida I), 1379 cm^{-1} ($-\text{CH}_2$), e 898 cm^{-1} (estrutura sacarídica), além de uma banda larga centrada em 3300 cm^{-1} , referente ao estiramento de hidroxil e amina. No espectro da ferrita de manganês encapsada com quitosana (figura 34-C), estas bandas sofreram alterações, sejam elas respectivamente: 1617 cm^{-1} , 1384 cm^{-1} e 907 cm^{-1} . A interação da ferrita com a quitosana causa estas alterações nos valores dos estiramentos, o que indica que há recobrimento efetivo da ferrita pela quitosana (LIU; CHEN; SHI, 2017).

O espectro da ferrita de manganês com quitosana e enzima (figura 34-B), quando comparado ao espectro da quitosana pura, mostra que a banda em 2920 cm^{-1} , referente ao estiramento de C-H na quitosana, não está presente após reação com a enzima. E quando comparado ao espectro da ferrita de manganês com quitosana sem enzima, a banda em 1617 cm^{-1}

¹ foi deslocada novamente para 1656 cm^{-1} , o que indica que a reação com a enzima afetou a interação da quitosana com a ferrita de manganês.

5.3.1.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Para o cálculo do raio aparente a 173° , foi empregada a equação 3 (equação de Stokes-Einstein), em que D é o coeficiente de difusão aparente, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da amostra e η é a viscosidade do meio.

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (3)$$

Foram obtidos os valores de $14,7 \pm 0,4 \text{ nm}$, $59,5 \pm 2,7 \text{ nm}$ e $69,4 \pm 6,6 \text{ nm}$ para MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{QTS}$ e $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{QTS}$ -enzima, respectivamente. É importante frisar que estes valores são maiores do que os valores obtidos por microscopia eletrônica e por difração de raios-X, uma vez que consideram o raio aparente da partícula solvatada, incluindo no valor do raio a camada de hidratação que contorna a partícula.

5.3.1.3 Potencial zeta

O potencial zeta (potencial ζ) foi calculado pela equação 4 (aproximação de Helmholtz-Smoluchowski):

$$\zeta = \frac{4\pi\mu\eta}{E\varepsilon} \quad (4)$$

Em que μ é a mobilidade eletroforética, E é o campo elétrico aplicado, η é a viscosidade do solvente e ε é a constante dielétrica do meio. Foram obtidos os valores de $+33,1 \pm 0,7 \text{ mV}$, $-10,1 \pm 0,7 \text{ mV}$ e $-35,2 \pm 1,3 \text{ mV}$ para MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{QTS}$ e $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{QTS}$ -enzima, respectivamente.

Estes valores indicam que as dispersões de ferrita de manganês em água e do compósito com nanopartículas são estáveis, ou seja, possuem baixa tendência à agregação devido às repulsões das cargas presentes na superfície das partículas: cargas positivas na superfície da primeira e negativas na superfície da segunda.

O compósito de ferrita de manganês com quitosana apresenta cargas negativas na superfície, devido ao tripolifosfato empregado na

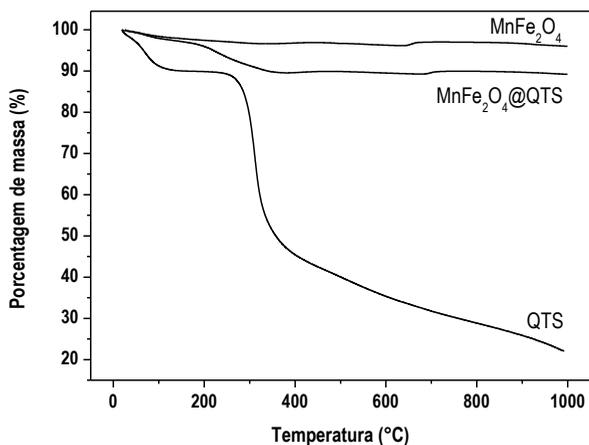
etapa de síntese, para realizar o efetivo recobrimento das nanopartículas pela quitosana, por gelatinização iônica.

5.3.1.4 Análise termogravimétrica

As curvas de aquecimento para MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{QTS}$ e QTS estão apresentadas na figura 35, em que é possível verificar que a ferrita de manganês apresenta elevada estabilidade frente ao aquecimento. A perda de massa da amostra $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{QTS}$ que ocorre em temperatura próxima de 200 °C refere-se à degradação da parte orgânica do compósito (quitosana e tripolifosfato). Desconsiderando a água adsorvida (3,3 %), nesta etapa ocorre a perda de 7,4 % da massa do compósito.

Os dados mostram que pouca massa de polímero foi incorporada na superfície da MNP, o que rendeu compósito com elevado teor de material magnético com superfície funcionalizada não-magnética.

Figura 35 - Curvas de aquecimento para MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{QTS}$ e QTS.



Fonte: Gentilmente cedido por Natália Bruzamarello Caon.

5.3.1.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

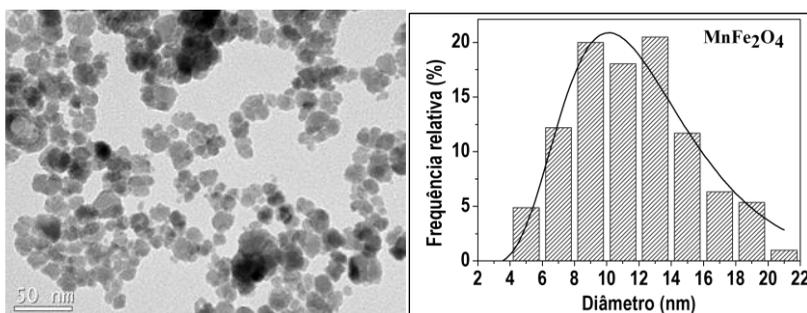
As imagens obtidas por TEM e a distribuição de tamanhos (histograma) da ferrita de manganês estão apresentadas na figura 36. A linha corresponde ao melhor ajuste, assumindo uma distribuição log-normal (equação 5):

Onde $\ln D_0$ é o valor médio de $\ln D$ e σ é o desvio padrão. O diâmetro mais provável corresponde ao ponto máximo, $D_{mp} = D_0 \exp(-$

σ^2). Foi considerado como D_{ME} (diâmetro obtido por microscopia eletrônica) o valor de D_0 e o desvio padrão é o valor de σ da distribuição log-normal. O *software open source* Fiji (*Fiji Is Just ImageJ*) foi utilizado para realização das medidas de tamanho das partículas.

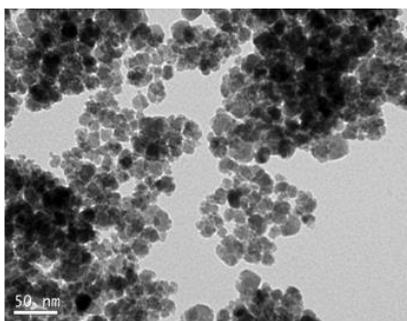
$$P(D) = \frac{1}{D(2\pi)^{1/2}} \exp\left(-\frac{(\ln D - \ln D_0)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (5)$$

Figura 36 - (A) Imagem de TEM da ferrita de manganês, (B) histograma da distribuição de tamanhos e (C) imagem de TEM do composto $MnFe_2O_4@QTS$.



(A) $MnFe_2O_4$

(B)



(C) $MnFe_2O_4@QTS$

Fonte: Gentilmente cedido por Natália Bruzamarello Caon.

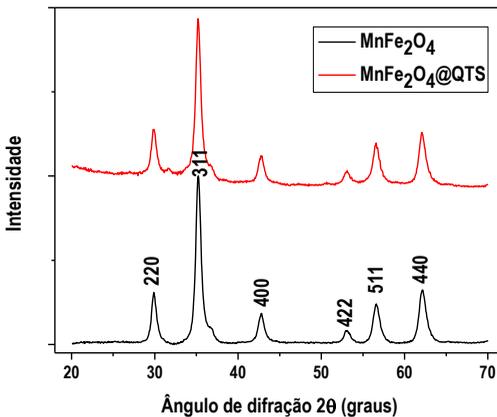
O diâmetro da ferrita de manganês obtido por TEM foi de $13,4 \pm 0,4$ nm. Pode ser observado na figura 35 (C) que o recobrimento com quitosana foi uniforme e rendeu uma camada pouco espessa de casca. Esse fato é importante, pois permitiu a ancoragem da enzima no

compósito, como verificado por espectroscopia no infravermelho, mas não comprometeu tão significativamente o caráter superparamagnético do sistema, uma vez que pouca massa não-magnética foi agregada à ferrita de manganês, como será apresentado na seção 5.3.1.7.

5.3.1.6 Difração de raios-X

Na figura 37 estão apresentados os padrões de difração de raios-X da ferrita de manganês e do compósito $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{QTS}$. É possível verificar que a ferrita de manganês possui os planos de difração característicos de estrutura em espinélio (marcados na figura 37) e que o compósito detém porção amorfa na estrutura, gerada pela camada de quitosana.

Figura 37 - Difratogramas de raios-X da ferrita de manganês, com os principais planos de reflexão assinalados, e do compósito $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{QTS}$.



Fonte: Gentilmente cedido por Natália Bruzamarello Caon.

Utilizando a equação de Scherrer (Equação 6), foi obtido o tamanho de cristalito por intermédio do alargamento do sinal referente ao plano de difração de maior intensidade.

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (6)$$

Em que τ é o tamanho médio do domínio ordenado, K é um fator adimensional que varia de acordo com a forma do cristalito, λ é o

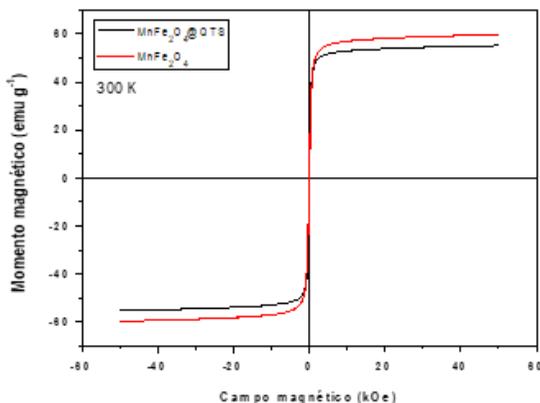
comprimento de onda do raio-X, β é a medida em radianos do alargamento na meia altura do sinal (FWHM) após descontar o alargamento instrumental, e θ é o ângulo de Bragg em graus.

O alargamento da meia altura do sinal do plano de difração 311 foi empregado para determinação do tamanho do cristalito da ferrita de manganês, considerando nanopartícula esférica. O tamanho do cristalito por DRX para ferrita de manganês é de 11,3 nm, valor bem próximo do obtido por TEM.

5.3.1.7 Magnetometria de amostra vibrante

As curvas apresentadas na figura 38 mostram o comportamento superparamagnético tanto da ferrita de manganês quanto do compósito: em campo magnético igual a zero, não há magnetização nas amostras. Este comportamento é observado em materiais com baixa coercividade, como nas ferritas macias, que é o caso da ferrita de manganês. Em presença de campo magnético, tanto a ferrita de manganês quanto o compósito apresentam magnetização, ou seja, resposta ao campo magnético.

Figura 38 - Curvas de magnetização em função do campo aplicado para ferrita de manganês e do compósito $\text{MnFe}_2\text{O}_4@QTS$.



Fonte: Gentilmente cedido por Natália Bruzamarcello Caon.

Os valores de magnetização de saturação (M_s) foram de 59,8 emu g^{-1} para ferrita de manganês e 55,2 emu g^{-1} para o compósito. Com estes valores é possível calcular o teor de conteúdo magnético no compósito utilizando a equação 7, de acordo com TENÓRIO-NETO et

al. (2015), em que M_s é a magnetização de saturação do compósito e M_{s_0} refere-se ao valor da magnetização de saturação da ferrita de manganês sem quitosana.

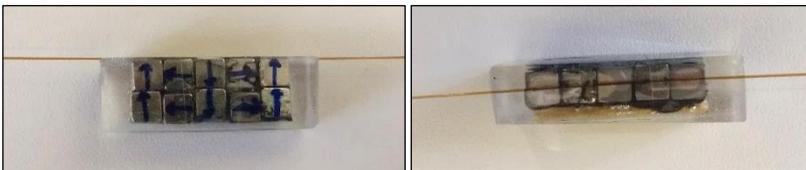
$$\text{Conteúdo magnético (\% massa)} = \frac{M_s}{M_{s_0}} \times 100 \quad (7)$$

O conteúdo magnético do compósito é de 92,3 %, condizente com o valor obtido pela análise termogravimétrica, que indicou 7,4 % de massa de quitosana no compósito. Este valor mostra que o compósito possui caráter magnético elevado quando comparado com a ferrita de manganês sem quitosana, que o torna adequado para a aplicação planejada.

5.3.2 Método eletroforético

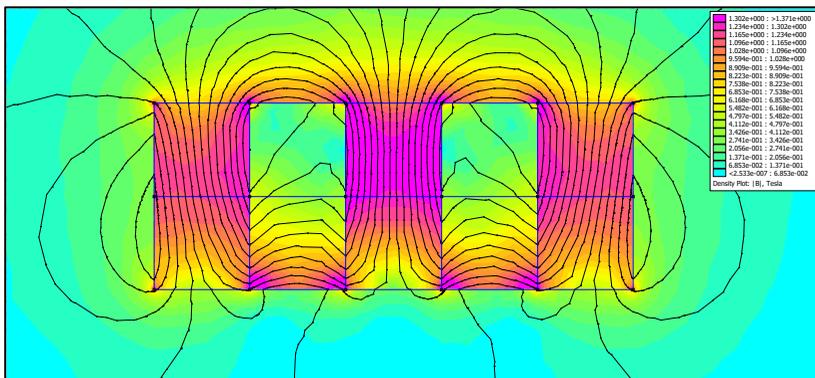
Uma vez estabelecidas as caracterizações das MNPs funcionalizadas, voltou-se a atenção para uma forma de introduzi-las e aprisiona-las no interior no tubo capilar, a fim de se produzir o IMER. Após sucessivas tentativas sem sucesso, a condição que melhor chegou ao resultado esperado foi utilizando como força de aprisionamento das MNPs, um bloco de ímãs de neodímio de 2,5 cm (figura 39) em arranjo de Halbach. Esse tipo de arranjo de ímãs, potencializa o campo magnético em uma de suas faces enquanto que quase o anula na outra (HALBACH, 1980, 1985). Esse tipo de fenômeno é possível ser facilmente simulado por meio do software *Finite Element Method Magnetics*, (MEEKER, 2010) e a força do campo na superfície da face de maior intensidade é estimada em torno de 1,3 Tesla (figura 40). Esse bloco de ímãs de neodímio foi confeccionado pela aluna Natália Bruzamarello Caon e gentilmente cedido para a realização dos experimentos deste estudo.

Figura 39 - Bloco de ímãs de neodímio montados em arranjo Halbach, face lateral (à esquerda) e face superior (à direita), onde é afixado o capilar.



Fonte: O autor.

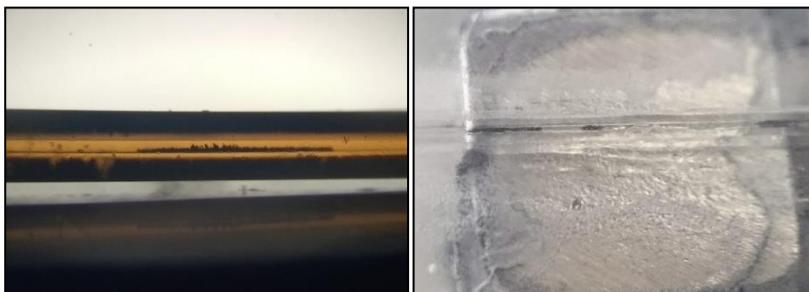
Figura 40 - Simulação do campo magnético dos ímãs em arranjo de Halbach.



Fonte: Gentilmente cedido por Natália Bruzarella Caon.

O capilar selecionado para os experimentos foi de 75 μm , diâmetro um pouco maior do que o utilizado nos estudos prévios, para prevenção da obstrução do mesmo pelas MNPs. O comprimento do capilar também foi pensado para ser de tal tamanho que fosse possível acomodar o bloco de ímãs e realizar uma segunda volta pelo cassete. Da mesma forma, a introdução das MNPs também precisou ser otimizada, e uma lavagem do capilar por 30 s a 1000 mbar, com solução à 1 mg mL^{-1} de MNPs funcionalizadas foi o suficiente para produzir um leito efetivo de MNPs (figura 41), porém sem bloquear o interior do capilar.

Figura 41 - Imagem obtida com microscópio óptico em aumento de 100x (à esquerda) e com lupa de aumento de 5x (à direita) da região com os ímãs em arranjo de Halbach após a introdução das MNPs funcionalizadas.



Fonte: O autor

O arranjo de ímãs foi posicionado no interior do cartucho do modelo de eletroforese capilar utilizado nos experimentos, a exatos 12 cm da entrada do capilar (figura 42). Portanto, precisou-se saber o quanto deveria ser injetado de BGE após a injeção da solução teste com substrato, para se “empurrar” este plugue até a região dos ímãs, e promover a reação com a enzima ancorada às MNPs. Para tanto, uma série de injeções apenas com acetona de marcador foram feitas, mensurando o tempo que esta levava para chegar ao detector. Assim, pôde-se calcular quantos cm por s o aparelho era capaz de injetar em uma determinada pressão. A uma pressão de 50 mbar, essa “velocidade de injeção”, no equipamento e capilar utilizado, foi determinada como sendo igual a $0,2 \text{ cm s}^{-1}$. Sendo assim, para que o plugue de substrato chegasse a zona de MNPs, este deveria ser “empurrado” por uma injeção de BGE por 60 s a 50 mbar.

Figura 42 - Esquema de acondicionamento dos ímãs em arranjo de Halbach dentro do cartucho do equipamento de eletroforese capilar, juntamente com o capilar utilizado.

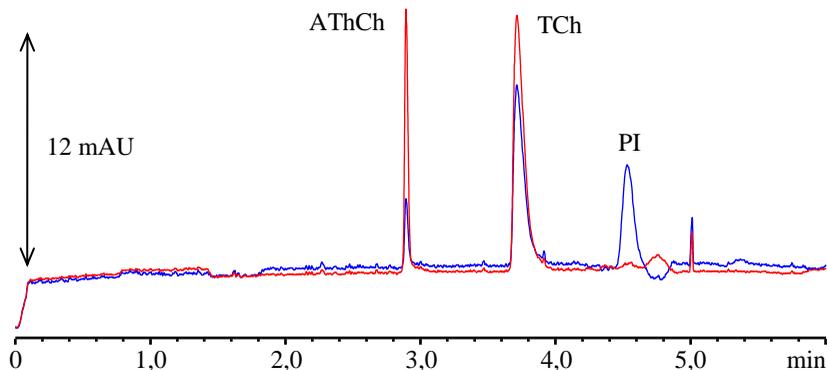


Fonte: O autor.

O padrão interno precisou ser diferente do previamente utilizado, o propranolol nas condições propostas acabava por co-migrar com a TCh, o produto da reação. Assim, por meio de simulações no software *PeakMaster* (versão 5.1), o imidazol foi selecionado. Com a definição

desses parâmetros, obteve-se em 5 min de corrida um eletroferograma (figura 43) com todos os componentes necessários para o cálculo de atividade.

Figura 43 - Exemplo de eletroferograma obtido através de IMER de AChE. AThCh – iodeto de acetiltiocolina (substrato); PI – padrão interno (imidazol); TCh – tiocolina (produto). Linha azul referente à aquisição em 210 nm e vermelha à 230 nm.

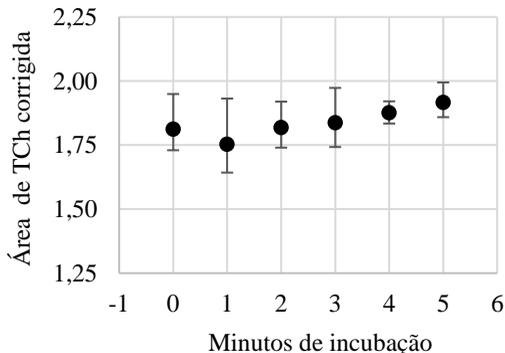


Fonte: O autor.

Uma vez estabelecido o método, avaliou-se a influência do tempo de incubação da reação na formação do produto tiocolina. Para tanto, um mesmo microrreator foi utilizado para se realizar experimentos sem incubação (0 min) e com 1 a 5 min de incubação, em experimentos de controle negativo, onde não existe a influência de um inibidor. Como observado no gráfico (figura 44), não existe diferença significativa entre os tempos de incubação de 0 a 5 minutos. Esse resultado é de particular interesse, pois deste modo não se faz necessária a incubação da reação do capilar, o que diminui o tempo de análise, tornando o método mais rápido.

Uma das particularidades mais interessantes de se utilizar um microrreator é a possibilidade de se reutilizar a enzima aprisionado no interior do capilar para se realizar vários ensaios. Para se estimar quantos ensaios de atividade enzimática poderiam ser feitos com mesmo IMER, avaliou-se a estabilidade do mesmo. Para isso, quatro microrreatores foram submetidos a 50 experimentos do tipo controle negativo (onde não há a presença de inibidores ou amostras, apenas o substrato) em sequência, para se avaliar por quantos ensaios o pico referente ao produto da reação se mantém.

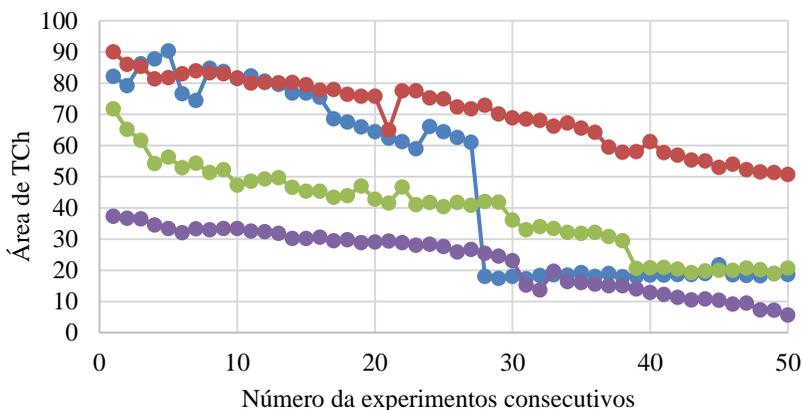
Figura 44 - Influência do tempo de incubação na formação de produto da reação em IMER.



Fonte: O autor.

Como se observa no gráfico a seguir (figura 45), a área referente ao pico de TCh, diminui gradativamente a medida que os experimentos são executados. Em um deles (linha azul), o sinal diminui drasticamente a partir do 27 experimento, o que nos leva a crer que a diminuição do sinal observada se deve a um fenômeno semelhante a uma lixiviação. Entre cada um dos experimentos, existe uma etapa de lavagem do capilar com o BGE, o que deve acabar por removendo pouco a pouco as MNPs.

Figura 45 - Estabilidade do microrreator de enzima imobilizada ao longo de 50 ensaios.

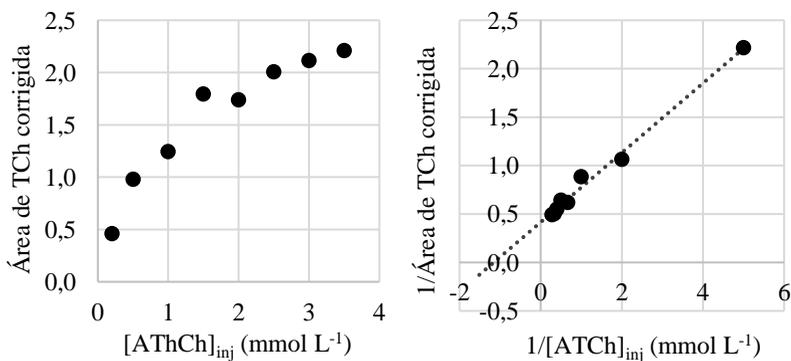


Fonte: O autor.

Isso nos leva a proposta de que, o importante neste tipo de procedimento é se executar controles negativos periódicos ao longo dos experimentos, por exemplo a cada dois ensaios com amostras, para que se tenha um valor mais “atualizado” do controle negativo a ser usado na equação do cálculo de inibição. Dessa forma pode-se prevenir resultados de falsa inibição, decorrente da diminuição do produto não por inibição da enzima, mas por perda de MNPs no interior do capilar.

Assim como nos demais estudos, foram realizados estudos cinéticos com o método de IMER proposto. Da mesma forma como anteriormente exposto, gráficos de Michalis-Menten e de Lineweaver-Burk (figura 46) foram construídos para se estimar o K_m da enzima por esse método. O valor de K_m encontrado neste método foi de $1,16 \text{ mmol L}^{-1}$, que é sensivelmente menor do que os obtidos nos demais métodos propostos neste trabalho. Quando comparado com o método proposto no estudo 1 (seção 5.1) este valor é quase duas vezes menor, e quando comparado com o método proposto no estudo 2 (seção 5.2), este valor é mais de 3 vezes menor. Isso nos indica que possivelmente existe uma maior afinidade entre a enzima e o seu substrato no método por IMER, que pode talvez ser decorrente do ancoramento da enzima nas MNPs. Trabalhos na literatura já expõem que enzimas imobilizadas podem possuir uma maior atividade quando comparada à mesma enzima em solução livre (CLARK, 1994; LIANG; LI; YANG, 2000).

Figura 46 - Gráfico de Michaelis-Menten (à esquerda) e seu correspondente gráfico de Lineweaver-Burk (à direita) para a reação de AChE em IMER.



Fonte: O autor.

Outros estudos propondo métodos também com AChE imobilizada chegaram a valores de K_m próximos aos aqui expostos. Em trabalho que

desenvolveu biossensor de AChE imobilizada em microesferas magnéticas para detecção de inseticidas organofosforados, o valor de K_m obtido pelo método proposto foi de $1,04 \text{ mmol L}^{-1}$, corroborando com o aqui obtido (ISTAMBOULIE et al., 2007). Outro trabalho também desenvolvendo método de biossensor com AChE para a detecção de pesticidas organofosforados, porém utilizando nanotubos de carbono como suporte para imobilização da enzima, obteve valor de $1,75 \text{ mmol L}^{-1}$ para o K_m , mais uma vez se assemelhando ao obtido no presente estudo (LIU; LIN, 2006).

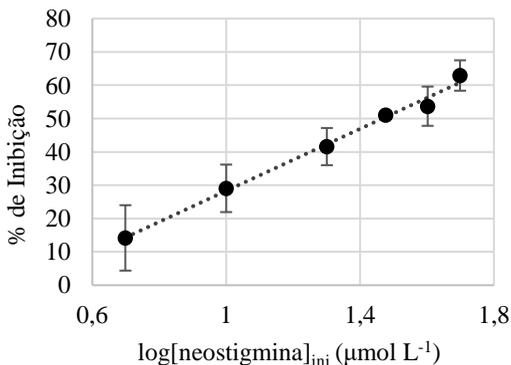
Uma vez mais, agora no caso da enzima imobilizada, também se observam na literatura valores maiores e menores para esse parâmetro cinético. No caso de um biossensor proposto utilizando como meio de imobilização a encapsulação por sol-gel, os autores relatam um valor de K_m de $8,18 \text{ mmol L}^{-1}$. Os autores atribuem a talvez pouca afinidade da enzima pelo substrato a uma possível desnaturação dos sítios ativos da enzima durante o processo de preparo do sol-gel, ou ainda a uma barreira de difusão na rede sol-gel, impedindo o substrato de entrar em contato efetivo com o sítio ativo da enzima (DOONG; TSAI, 2001). Em contrapartida, detector amperométrico desenvolvido para o monitoramento da atividade da AChE, obteve de K_m de $0,59 \text{ mmol L}^{-1}$, quase metade do obtido pelo presente método (PARSAJOO; KAUFFMANN, 2013).

Concluindo a avaliação cinética do método, a IC_{50} (figura 47) foi avaliada em 3 microrreatores distintos, com uma média de $29,42 \pm 3,88 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, valor este pouco mais de duas vezes maior do que o obtido pelo estudo 1 (seção 5.1) e mais de cinco vezes maior que o obtido pelo método proposto no estudo 2 (seção 5.2). Considerando que os valores de K_m encontrados naqueles estudos (tabela 5) são superiores ao deste, como já discutido, presume-se que a enzima imobilizada possui uma afinidade maior pelo substrato, e portanto, uma maior concentração de inibidor talvez seja necessária para se obter a mesmo efeito de inibição.

Pensando em uma aplicação para o método, foi proposto experimentá-lo em uma matriz ainda mais complexa que aquela utilizada no estudo 1 deste trabalho (sucos de frutas). Dessa forma, extratos hidroalcoólicos de 7 espécies de Myrtaceae nativas da Mata Atlântica do Sul do Brasil, obtidos em parceria com a Prof.^a Dr.^a Michele Debiasi Alberton do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FURB, foram utilizados. Extratos vegetais são conhecidos por serem uma matriz complexa e apresentarem uma vasta gama de compostos das mais variadas classes, dos mais apolares, como terpenos e esteroides, aos de

maior polaridade, como flavonoides e antocianinas (HOSTETTMANN et al., 2008).

Figura 47 - Gráfico de inibição da AChE em IMER na presença de neostigmina.



Fonte: O autor.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos e de inibição enzimática obtidos pelos três métodos propostos.

		Estudo 1	Estudo 2	Estudo 3
K_m	AChE	2,01 mmol L ⁻¹	3,81 mmol L ⁻¹	1,16 mmol L ⁻¹
	α -Glicosidase	0,98 mmol L ⁻¹	0,43 mmol L ⁻¹	-
K_i	AChE	4,62 μ mol L ⁻¹	4,27 μ mol L ⁻¹	-
	α -Glicosidase	0,326 mmol L ⁻¹	0,40 mmol L ⁻¹	-
IC_{50}	AChE	14,194 \pm 0,472 μ mol L ⁻¹	5,115 \pm 0,472 μ mol L ⁻¹	29,42 \pm 3,88 μ mol L ⁻¹
	α -Glicosidase	0,166 \pm 0,002 mmol L ⁻¹	0,582 \pm 0,017 mmol L ⁻¹	-

Fonte: O autor.

Pode-se observar através dos resultados (tabela 6), que quase todos os extratos inibem a AChE em uma faixa de 10 % a 20 %, na concentração testada. Entretanto, o extrato das folhas de jaboticaba (*P. cauliflora*) foi capaz de inibir em mais de 40 % a atividade da enzima nesta concentração. Interessantemente, este resultado corrobora com o obtido no estudo 1 (SIEBERT et al., 2019), onde o suco de fruta com a melhor atividade sobre a mesma enzima foi o da própria jaboticaba. Isso nos leva a crer que possivelmente existe algum metabólito secundário na planta

que provavelmente está presente nas folhas e frutos e contribui para a atividade observada.

Tabela 6 - Resultados de atividade inibitória de acetilcolinesterase de extratos hidroalcoólicos de espécies da família Myrtaceae.

Amostra (100 mg L ⁻¹)	% de inibição da AChE
<i>Eugenia brasiliensis</i>	14,23 ± 5,50
<i>Eugenia catharinensis</i>	18,25 ± 8,02
<i>Eugenia involucrata</i>	10,91 ± 4,79
<i>Eugenia platysema</i>	12,77 ± 5,80
<i>Myrcia pubipetala</i>	8,72 ± 5,76
<i>Myrcia splendens</i>	13,64 ± 8,12
<i>Plinia cauliflora</i>	42,31 ± 6,81
Neostigmina (10 mg L ⁻¹)	51,05 ± 1,04

Fonte: O autor.

Em relação as outras espécies estudadas, apenas para a *E. brasiliensis* foi encontrado estudo que avaliou também atividade inibitória do extrato bruto das folhas da espécie. Naquele estudo, os autores utilizaram o ensaio clássico de Ellman na investigação, e com a mesma concentração utilizada aqui, conseguiram uma inibição de 40,3 ± 0,1 % (MAGINA et al., 2012), maior que a obtida através de nosso método. É importante ressaltar que a composição química dos extratos vegetais pode não ser a mesma, uma vez que os metabólitos secundários de plantas podem sofrer alterações dependente do local da coleta, estação do ano, bem como outros fatores (SIMÕES et al., 2018), portanto não há como afirmar qual resultado é mais acurado.

O método de IMER proposto, assim como nos demais estudos deste trabalho, empregado para a triagem de inibição da enzima AChE quando exposta a extratos vegetais foi de extrema valia, por meio das vantagens da CE já expostas nas discussões anteriores. Além das economias de reagente e tempo necessários para a obtenção dos resultados, foi possível com esse método aproveitar a enzima em diversos ensaios, uma vez que a mesma se encontra aprisionada no interior do tubo capilar utilizado na técnica.

6 CONCLUSÕES

1. Em relação ao Estudo 1:

- ✓ Foi possível propor métodos múltiplos de EMMA para a avaliação da atividade enzimática de AChE e α -glicosidase;
- ✓ Os métodos tiveram seus parâmetros cinéticos avaliados, com resultados condizentes com a literatura, o que viabilizam o uso destes para a triagem de novos inibidores enzimáticos;
- ✓ Sucos de 13 frutas foram submetidos a avaliação do potencial de inibição das enzimas, e resultados interessantes foram obtidos para os sucos de pitanga e jaborcaba;
- ✓ Através de análise por HPLC-ESI-MS/MS, foram identificados vários compostos fenólicos com indícios bibliográficos de atividade contra as duas enzimas avaliadas, que podem ter contribuído para o resultado observado.

2. Em relação ao Estudo 2:

- ✓ Método duplo simultâneo de EMMA para as enzimas AChE e α -glicosidase foi proposto;
- ✓ Os parâmetros cinéticos do método foram avaliados e corroboram com dados existentes na literatura, permitindo também o uso deste para a triagem de novos inibidores;
- ✓ Dez compostos fenólicos foram avaliados através do método, com ácido *p*-cumárico e ácido protocatecuico desempenhando a melhor inibição da AChE, e ácido elágico e quercetina os mais efetivos contra α -glicosidase.

3. Em relação ao Estudo 3:

- ✓ Através do uso de nanopartículas magnéticas de ferrita de manganês, foi possível propor método de IMER para AChE;
- ✓ O método foi aplicado com sucesso na triagem de extratos hidroalcoólicos de sete espécies de Myrtaceae, das quais a jaboticaba teve o melhor resultado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos de EMMA aqui desenvolvidos foram consistentes com os valores encontrados na literatura para a cinética das enzimas selecionadas neste trabalho e podem ser usados na triagem de novos inibidores destas. Os métodos envolvendo as injeções múltiplas, quando aplicados de maneira correta, oferecem muitas vantagens. Entretanto, maiores ajustes poderiam ser feitos, principalmente no que tange à robustez e reprodutibilidade. Os métodos aplicados à acetilcolinesterase poderiam ser explorados também para a avaliação da butirilcolinesterase (BChE), uma enzima semelhante, com mesmo substrato, porém com aplicações diferentes. Geralmente, quando executados em conjunto, ensaios de AChE e BChE oferecem uma melhor ideia do alvo da ação do inibidor.

Seguindo a mesma lógica, ensaios com a α -amilase, enzima responsável pela degradação de amido em oligossacarídeos menores, poderiam ser realizados juntamente com ensaios da α -glicosidase, fornecendo assim um melhor quadro de avaliação de inibidores enzimáticos para a utilização no diabetes.

Com o conhecimento desenvolvido a partir do método de IMER para AChE, abrem-se as portas para que novas enzimas sejam ancoradas no suporte de MNPs, e assim outros métodos possam ser desenvolvidos. Enzimas de difícil acesso, pouca disponibilidade, de alto custo ou ainda não disponíveis comercialmente, apenas por meio de isolamento, parecem boas candidatas para esse tipo de abordagem, uma vez que a enzima se preserva por vários ensaios antes da inutilização da mesma.

Quando aplicados às amostras propostas, os métodos de EMMA aqui desenvolvidos produziram resultados interessantes. As amostras estudadas podem no futuro, após maiores estudos, serem candidatas ao tratamento das doenças aqui abordadas, e possivelmente outras ainda não estudadas.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, M. A. et al. Synthesis, enzyme inhibitory kinetics mechanism and computational study of N-(4-methoxyphenethyl)-N-(substituted)-4-methylbenzenesulfonamides as novel therapeutic agents for Alzheimer's disease. **PeerJ**, v. 6, p. e4962, 26 jun. 2018.
- ADEFEGHA, S. A. et al. Alterations of Na⁺/K⁺-ATPase, cholinergic and antioxidant enzymes activity by protocatechuic acid in cadmium-induced neurotoxicity and oxidative stress in Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 559–568, out. 2016.
- ADEMOSUN, A. O.; OBOH, G. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity and Fe²⁺-Induced Lipid Peroxidation in Rat Brain In Vitro by Some Citrus Fruit Juices. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 5, p. 428–434, maio 2012.
- AHMED, A. M. History of diabetes mellitus. **Saudi Medical Journal**, v. 23, n. 4, p. 373–378, 2002.
- ALZHEIMER, A. Über eine eigenartige schweren. Erkrankungsprozess der Hirnrinde. **Neurologisches Centralblatt**, v. 23, p. 1129–1136, 1906.
- ANAGNOSTOPOULOU, M. A. et al. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 19–25, jan. 2006.
- ARAI, I. et al. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 1–3, p. 307–314, dez. 1999.
- ARAÚJO, M. C. DE et al. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 182–189, ago. 2016.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2012.
- BAJDA, M.; WIĘCKOWSKA, A.; MALAWSKA, B. Electrophoretically mediated microanalysis technique as a tool for the rapid screening of novel acetylcholinesterase inhibitors. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 66, n. 4, p. 357–362, 2009.

BANKE, N.; HANSEN, K.; DIERS, I. Detection of enzyme activity in fractions collected from free solution capillary electrophoresis of complex samples. **Journal of Chromatography A**, v. 559, n. 1–2, p. 325–335, 1991.

BAO, J.; REGNIER, F. E. Ultramicro enzyme assays in a capillary electrophoretic system. **Journal of Chromatography A**, v. 608, n. 1–2, p. 217–224, set. 1992.

BARCELÓ-BARRACHINA, E. et al. CEC separation of heterocyclic amines using methacrylate monolithic columns. **Electrophoresis**, v. 28, n. 11, p. 1704–1713, jun. 2007.

BERCHTOLD, N. C.; COTMAN, C. W. Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease: Greco-Roman Period to the 1960s. **Neurobiology of Aging**, v. 19, n. 3, p. 173–189, maio 1998.

BERTOLDI, A. D. et al. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: a comprehensive literature review. **Globalization and Health**, v. 9, n. 1, p. 62, 2013.

BOLLER, F.; FORBES, M. M. History of dementia and dementia in history: An overview. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 158, n. 2, p. 125–133, jun. 1998.

BORGES DE MELO, E.; DA SILVEIRA GOMES, A.; CARVALHO, I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, n. 44, p. 10277–10302, out. 2006.

CANNELL, R. J. P. et al. Microalgae and Cyanobacteria as a Source of Glycosidase Inhibitors. **Microbiology**, v. 133, n. 7, p. 1701–1705, 1 jul. 1987.

CIPRIANI, G. et al. Alzheimer and his disease: a brief history. **Neurological Sciences**, v. 32, n. 2, p. 275–279, 11 abr. 2011.

CLARK, D. S. Can immobilization be exploited to modify enzyme activity? **Trends in Biotechnology**, v. 12, n. 11, p. 439–443, nov. 1994.

CRAIG, M. E.; HATTERSLEY, A.; DONAGHUE, K. C. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatric Diabetes**, v. 10, n. SUPPL. 1, p. 3–12, set. 2009.

DE SOUZA, P. et al. Inhibitory Activity of α -Amylase and α -Glucosidase by Plant Extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Medica**, v. 78, n. 04, p. 393–399, 1 mar. 2012.

DOONG, R.-A.; TSAI, H.-C. Immobilization and characterization of sol-gel-encapsulated acetylcholinesterase fiber-optic biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 434, n. 2, p. 239–246, maio 2001.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, maio 1959.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, jul. 1961.

FAN, Y.; SCRIBA, G. K. E. Advances in-capillary electrophoretic enzyme assays. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 5, p. 1076–1090, 2010.

FIGUEIREDO-GONZÁLEZ, M. et al. Nutraceutical Potential of Phenolics from 'Brava' and 'Mansa' Extra-Virgin Olive Oils on the Inhibition of Enzymes Associated to Neurodegenerative Disorders in Comparison with Those of 'Picual' and 'Cornicabra'. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 722, 21 mar. 2018a.

FIGUEIREDO-GONZÁLEZ, M. et al. Evaluation of the neuroprotective and antidiabetic potential of phenol-rich extracts from virgin olive oils by in vitro assays. **Food Research International**, v. 106, p. 558–567, abr. 2018b.

FRANCIS, P. T. et al. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 66, n. 2, p. 137–147, 1 fev. 1999.

GALTIER, F. Definition, epidemiology, risk factors. **Diabetes & Metabolism**, v. 36, n. 6, p. 628–651, dez. 2010.

GANZERA, M. Quality control of herbal medicines by capillary electrophoresis: Potential, requirements and applications. **Electrophoresis**, v. 29, n. 17, p. 3489–3503, ago. 2008.

GUO, L.-P. et al. Screening α -glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 5, p. 1250–1253, dez. 2010.

HALBACH, K. Design of permanent multipole magnets with oriented rare earth cobalt material. **Nuclear Instruments and Methods**, v. 169, n. 1, p. 1–10, fev. 1980.

HALBACH, K. Application of permanent magnets in accelerators and electron storage rings (invited). **Journal of Applied Physics**, v. 57, n. 8, p. 3605–3608, 15 abr. 1985.

HARMON, B. J.; PATTERSON, D. H.; REGNIER, F. E. Mathematical treatment of electrophoretically mediated microanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 19, p. 2655–2662, 1993.

HAYASHI, T. et al. Amperometric Measurement of α -Glucosidase Activity Using Hydroquinone- α -D-Glucopyranoside as a Substrate. **BUNSEKI KAGAKU**, v. 55, n. 12, p. 925–929, 2006.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, out. 2002.

HODGES, J. R. Alzheimer's centennial legacy: origins, landmarks and the current status of knowledge concerning cognitive aspects. **Brain**, v. 129, n. 11, p. 2811–2822, 29 set. 2006.

HOSTETTMANN, K. et al. **Handbook of Strategies for the Isolation of Bioactive Natural Products**. 1. ed. Bogotá: CYTED, 2008.

HU, F. et al. Enzyme Inhibitor Screening by Electrospray Mass Spectrometry with Immobilized Enzyme on Magnetic Silica Microspheres. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 19, n. 6, p. 865–873, jun. 2008.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 6th. ed. Belgium: International Diabetes Federation, 2013.

INZUCCHI, S. E. Oral Antihyperglycemic Therapy for Type 2 Diabetes. **JAMA**, v. 287, n. 3, p. 360, 16 jan. 2002.

IQBAL, J.; IQBAL, S.; MÜLLER, C. E. Advances in immobilized enzyme microreactors in capillary electrophoresis. **The Analyst**, v. 138, n. 11, p. 3104, 2013.

IQBAL, S. et al. Development of a fast and efficient CE enzyme assay for the characterization and inhibition studies of α -glucosidase inhibitors. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 21–22, p. 3623–3628, nov. 2013.

ISTAMBOULIE, G. et al. Highly sensitive detection of organophosphorus insecticides using magnetic microbeads and genetically engineered acetylcholinesterase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 4, p. 506–512, nov. 2007.

JACOB, B. P. et al. Influence of preparation method on structural and magnetic properties of nickel ferrite nanoparticles. **Bulletin of Materials Science**, v. 34, n. 7, p. 1345–1350, 17 dez. 2011.

JOHNSON, K. A.; GOODY, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. **Biochemistry**, v. 50, n. 39, p. 8264–8269, 4 out. 2011.

KANIE, Y.; KANIE, O. Electrophoretically mediated microscale reaction of glycosidases: kinetic analysis of some glycosidases at the nanoliter scale. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 19, p. 1757–1762, out. 2002.

KANIE, Y.; KANIE, O. Electrophoretically mediated reaction of glycosidases at a nanoliter scale. **Electrophoresis**, v. 24, n. 6, p. 1111–1118, mar. 2003.

KÁSA, P.; RAKONCZAY, Z.; GULYA, K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 52, n. 6, p. 511–535, ago. 1997.

KERR, S. Drug Discovery Through Enzyme Inhibition. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. (Eds.). **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 7th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. p. 1520.

KHARROUBI, A. T.; DARWISH, H. M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 6, p. 850–867, 2015.

KIM, J. H. et al. Neuronal cell protection and acetylcholinesterase inhibitory effect of the phenolics in chestnut inner skin. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 311–318, 30 abr. 2011.

KIM, M.-J. et al. Comparative Study of the Inhibition of α -Glucosidase, α -Amylase, and Cyclomaltodextrin Glucanosyltransferase by Acarbose, Isoacarbose, and Acarviosine–Glucose. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 371, n. 2, p. 277–283, nov. 1999.

KIM, Y. J. et al. Novel and versatile synthesis of pyrrolidine type azasugars, DAB-1 and LAB-1, potent glucosidase inhibitors. **Tetrahedron**, v. 53, n. 22, p. 7501–7508, jun. 1997.

KIMURA, A. et al. Two potent competitive inhibitors discriminating α -glucosidase family I from family II. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 6, p. 1035–1040, abr. 2004.

KULSHRESHTHA, A.; PIPLANI, P. Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. **Neurological Sciences**, v. 37, n. 9, p. 1403–1435, 1 set. 2016.

LAKHTAKIA, R. The History of Diabetes Mellitus. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 13, n. 3, p. 368–370, 2013.

LEHNINGER, A. L.; COX, M. M.; NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LIANG, J. F.; LI, Y. T.; YANG, V. C. Biomedical application of immobilized enzymes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 8, p. 979–990, ago. 2000.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658–666, mar. 1934.

LIU, D.-M.; CHEN, J.; SHI, Y.-P. An online immobilized α -glucosidase microreactor for enzyme kinetics and inhibition assays. **RSC Adv.**, v. 5, n. 70, p. 56841–56847, 2015.

LIU, D.-M.; CHEN, J.; SHI, Y.-P. Screening of enzyme inhibitors from traditional Chinese medicine by magnetic immobilized α -glucosidase coupled with capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 164, n. December 2016, p. 548–555, mar. 2017.

LIU, D.-M.; SHI, Y.-P.; CHEN, J. Application of Capillary Electrophoresis in Enzyme Inhibitors Screening. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 775–782, 2015.

LIU, G.; LIN, Y. Biosensor Based on Self-Assembling Acetylcholinesterase on Carbon Nanotubes for Flow Injection/Amperometric Detection of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 835–843, fev. 2006.

LIU, Y. et al. Synthesis and pharmacological activities of xanthone derivatives as α -glucosidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 5683–5690, ago. 2006.

LIU, Z.-Q. Chemical Methods To Evaluate Antioxidant Ability. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 10, p. 5675–5691, 13 out. 2010.

MA, Y.-Y. et al. α -Glucosidase Inhibition and Antihyperglycemic Activity of Phenolics from the Flowers of *Edgeworthia gardneri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 37, p. 8162–8169, 23 set. 2015.

MAGINA, M. D. A. et al. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1184–1188, 2012.

MARQUES, P. R. B. D. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791–1799, 2008.

MARTÍN-BIOSCA, Y. et al. Screening of acetylcholinesterase inhibitors by CE after enzymatic reaction at capillary inlet. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 10, p. 1748–1756, maio 2009.

MATA, A. T. et al. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 778–786, jan. 2007.

MAURER, K.; VOLK, S.; GERBALDO, H. Auguste D and Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1546–1549, maio 1997.

MCGONIGLE, P.; RUGGERI, B. Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 162–171, jan. 2014.

MENG, Y. et al. Evaluation of Total Flavonoids, Myricetin, and Quercetin from *Hovenia dulcis* Thunb. As Inhibitors of α -Amylase and α -Glucosidase. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 4, p. 444–449, 27 dez. 2016.

MIN, W. et al. On-line immobilized acetylcholinesterase microreactor for screening of inhibitors from natural extracts by capillary electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 8, p. 2397–2405, 30 nov. 2012.

NEHMÉ, R.; MORIN, P. Advances in capillary electrophoresis for miniaturizing assays on kinase enzymes for drug discovery. **Electrophoresis**, v. 36, n. 21–22, p. 2768–2797, 2015.

NIWA, T. et al. “Nojirimycin” as a Potent Inhibitor of Glucosidase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 34, n. 6, p. 966–968, ago. 1970.

NOVÁKOVÁ, S. et al. Electrophoretically mediated microanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, n. 1–2, p. 173–184, 2004.

PARSAJOO, C.; KAUFFMANN, J.-M. Development of an acetylcholinesterase immobilized flow through amperometric detector based on thiocholine detection at a silver electrode. **Talanta**, v. 109, p. 116–120, maio 2013.

PLAZA, M. et al. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jacobinica* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. **Food Chemistry**, v. 211, p. 185–197, nov. 2016.

POHANKA, M. et al. Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 4, p. 2631–2640, 18 abr. 2011.

PULS, W. et al. Glucosidase inhibition. **Naturwissenschaften**, v. 64, n. 10, p. 536–537, out. 1977.

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640–651, abr. 2014.

RHEE, I. K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, n. 1–2, p. 217–223, abr. 2001.

RIGHETTI, P. G. Electrophoresis: The march of pennies, the march of dimes. **Journal of Chromatography A**, v. 1079, n. 1–2, p. 24–40, jun. 2005.

ROY, R.; CHAUDHURI, A. N. Differential acetylcholinesterase activity in rat cerebrum, cerebellum and hypothalamus. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 44, n. 5, p. 381–386, 2006.

SAEED, A. et al. Synthesis, computational studies and biological evaluation of new 1-acetyl-3-aryl thiourea derivatives as potent cholinesterase inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 8, p. 1635–1646, 30 ago. 2017.

SCHMIDT, D. D. et al. α -Glucosidase inhibitors. **Naturwissenschaften**, v. 64, n. 10, p. 535–536, out. 1977.

SCHUCHERT-SHI, A.; HAUSER, P. C. Study of acetylcholinesterase inhibitors using CE with contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 30, n. 19, p. 3442–3448, out. 2009.

SCHULZ, M. et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125–131, nov. 2015.

SCHWARTZ, J. H. et al. **Principles of Neural Science**. 5th Edition. New York: McGraw-Hill Medical, 2013.

SCRIBA, G. K. E.; BELAL, F. Advances in Capillary Electrophoresis-Based Enzyme Assays. **Chromatographia**, v. 78, n. 15, p. 947–970, 2015.

SHOBANA, S.; SREERAMA, Y. N.; MALLESHI, N. G. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1268–1273, ago. 2009.

SIEBERT, D. A. et al. Determination of acetylcholinesterase and α -glucosidase inhibition by electrophoretically-mediated microanalysis and phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS of fruit juices from Brazilian Myrtaceae *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel and *Eugenia uniflora* L. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–6, 8 jan. 2019.

SILVA, J. A. F. DA et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740–744, jun. 2007.

SILVERMAN, R. B. **Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions**. 2nd. ed. [s.l.] Elsevier, 2002.

SIM, L. et al. New Glucosidase Inhibitors from an Ayurvedic Herbal Treatment for Type 2 Diabetes: Structures and Inhibition of Human Intestinal Maltase-Glucoamylase with Compounds from *Salacia reticulata*. **Biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 443–451, 26 jan. 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2018.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Eletroforese Capilar: uma breve introdução. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287–297, 2012.

SULAIMAN, S. F.; OOI, K. L. Antioxidant and α -Glucosidase Inhibitory Activities of 40 Tropical Juices from Malaysia and Identification of Phenolics from the Bioactive Fruit Juices of *Barringtonia racemosa* and *Phyllanthus acidus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 39, p. 9576–9585, 22 out. 2014.

SZWAJGIER, D. Anticholinesterase Activities Of Selected Polyphenols – A Short Report. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 64, n. 1, p. 49–54, 1 jan. 2014.

SZWAJGIER, D. Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids – interaction testing in model solutions. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 22, n. 4, p. 690–694, 13 dez. 2015.

SZWAJGIER, D.; BOROWIEC, K. Phenolic acids from malt are efficient acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 1, p. 40–48, nov. 2012.

TABOPDA, T. K. et al. α -Glucosidase Inhibitors Ellagic Acid Derivatives with Immunoinhibitory Properties from *Terminalia superba*. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 56, n. 6, p. 847–850, 2008.

TAN, C. et al. Yeast α -Glucosidase Inhibitory Phenolic Compounds Isolated from *Gynura medica* Leaf. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 2551–2558, 28 jan. 2013.

TANG, Z.; WANG, T.; KANG, J. Immobilized capillary enzyme reactor based on layer-by-layer assembling acetylcholinesterase for inhibitor screening by CE. **Electrophoresis**, v. 28, n. 17, p. 2981–2987, set. 2007a.

TANG, Z.; WANG, Z.; KANG, J. Screening of acetylcholinesterase inhibitors in natural extracts by CE with electrophoretically mediated microanalysis technique. **Electrophoresis**, v. 28, n. 3, p. 360–365, fev. 2007b.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173–181, 1996.

TENÓRIO-NETO, E. T. et al. TGA and magnetization measurements for determination of composition and polymer conversion of magnetic hybrid particles. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 26, n. 10, p. 1199–1208, out. 2015.

TRALAU, T.; LUCH, A. Drug-mediated toxicity: illuminating the ‘bad’ in the test tube by means of cellular assays? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 7, p. 353–364, jul. 2012.

TUNNICLIFF, G.; TSUKADA, Y.; BARBEAU, A. Some properties of acetylcholinesterase from rat retina. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 54, n. 4, p. 389–392, abr. 1976.

UNITED NATIONS, D. OF E. AND S. A.-P. D. **World Population Prospects: The 2015 Revision, Volume I: Comprehensive Tables**. [s.l.: s.n.].

- VAN DYCK, S. et al. Kinetic study of angiotensin converting enzyme activity by capillary electrophoresis after in-line reaction at the capillary inlet. **Journal of Chromatography A**, v. 986, n. 2, p. 303–311, fev. 2003a.
- VAN DYCK, S. et al. Inhibition study of angiotensin converting enzyme by capillary electrophoresis after enzymatic reaction at capillary inlet. **Journal of Chromatography A**, v. 1013, n. 1–2, p. 149–156, set. 2003b.
- VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 97–120, abr. 1998.
- VAZ, F. A. S.; OLIVEIRA, C. L. M. DE; OLIVEIRA, M. A. L. DE. Fundamentos De Eletroforese Capilar: Uma Abordagem Por Animações. **Quím. Nova**, v. 38, n. 5, p. 732–737, 2015.
- VINHOLES, J. et al. In vitro assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. **Food Bioscience**, v. 19, n. June, p. 92–100, set. 2017.
- VITALI, L. et al. New multilayer coating using quaternary ammonium chitosan and κ -carrageenan in capillary electrophoresis: Application in fast analysis of betaine and methionine. **Talanta**, v. 123, p. 45–53, jun. 2014.
- VITALI, L.; FÁVERE, V. T.; MICKE, G. A. A new method to determine biological sample volume by short end multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 16, p. 2327–2333, abr. 2011.
- WALDRON, R. D. Infrared spectra of ferrites. **Physical Review**, v. 99, n. 6, p. 1727–1735, 1955.
- WALKER, J. M.; WINDER, J. S.; KELLAM, S. J. High-throughput microtiter plate-based chromogenic assays for glycosidase inhibitors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, n. 1–2, p. 141–146, jan. 1993.
- WAN, C. et al. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1929–1937, dez. 2012.
- WATANABE, J. et al. Isolation and Identification of α -Glucosidase Inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 177–178, 12 jan. 1997.

WEINER, H. Enzymes: Classification, Kinetics, and Control. In: DEVLIN, T. M. (Ed.). . **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**. 7th. ed. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, 2010. p. 1204.

WELCH, C. J. et al. MISER chromatography (multiple injections in a single experimental run): the chromatogram is the graph. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, n. 13–14, p. 1674–1681, jul. 2010.

WOREK, F. et al. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. **Clinica Chimica Acta**, v. 288, n. 1–2, p. 73–90, out. 1999.

WOREK, F. et al. On-site analysis of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity with the ChE check mobile test kit—Determination of reference values and their relevance for diagnosis of exposure to organophosphorus compounds. **Toxicology Letters**, v. 249, p. 22–28, maio 2016.

YANG, D. et al. Phenolics from strawberry cv. Falandi and their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 194, p. 857–863, mar. 2016.

YANG, Y.; LIAN, G.; YU, B. Naturally Occurring Polyphenolic Glucosidase Inhibitors. **Israel Journal of Chemistry**, v. 55, n. 3–4, p. 268–284, abr. 2015.

YIN, P. et al. Identification and inhibitory activities of ellagic acid- and kaempferol-derivatives from Mongolian oak cups against α -glucosidase, α -amylase and protein glycation linked to type II diabetes and its complications and their influence on HepG2 cells' viabil. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1247–1259, dez. 2018.

ZHANG, A. et al. Screening α -glucosidase inhibitor from natural products by capillary electrophoresis with immobilised enzyme onto polymer monolith modified by gold nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1854–1859, dez. 2013.

ANEXO A – Trabalho apresentado no 11º Simpósio Brasileiro de Farmacognosia

Certificado



XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia
XVI Simpósio Latino-americano de Farmacobotânica



Certificamos que o trabalho **Microanálise mediada por eletroforese capilar (EMMA) com método alternativo para avaliação de atividade/inibição enzimática**, de autoria de **Diogo A. Siebert, Michele D. Alberton e Gustavo A. Micke**, foi apresentado na forma de painel durante o XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVI Simpósio Latino-americano de Farmacobotânica, realizado em Curitiba-PR, no período de 9 a 11 de agosto de 2017.

Cid Almiré M. Santos

Cid Almiré M. Santos
Presidente da Sociedade Brasileira de Farmacognosia

Leopoldo C. Baratto

Leopoldo C. Baratto
Coordenador da Comissão de Avaliação

Enamante, Res. Paraguassu, A. S. H. Agrícola

Certificado



XI Simpósio Brasileiro de
Farmacognosia
XVI Simpósio
Latino-americano de
Farmacobotânica

Certificamos que o trabalho **Microanálise mediada por eletroforese capilar (EMMA) com método alternativo para avaliação de atividade/inibição enzimática**, de autoria de **Diogo A. Siebert, Michele D. Alberton e Gustavo A. Micke**, apresentado na forma de painel durante o XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVI Simpósio Latino-americano de Farmacobotânica, realizado em Curitiba-PR, no período de 9 a 11 de agosto de 2017, foi classificado em **1º lugar** na área **Atividade Biológica in vitro**.

Cid Almbiré M. Santos
Presidente da Sociedade Brasileira de Farmacognosia



XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia
 XVI Simposio Latinoamericano de Farmacobotanica
 Curitiba, Brasil - 9-11 de agosto de 2017

Microanálise mediada por eletroforese capilar (EMMA) com método alternativo para avaliação de atividade/inibição enzimática

Diogo A. Siebert^{1*}, Michele D. Alberton², Gustavo A. Mücke¹,

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, Brasil;

² Universidade Regional de Blumenau, Blumenau/SC, Brasil.

Introdução: Uma das estratégias que podem ser adotadas para o tratamento de doenças é a inibição de enzimas que possuem papel chave no processo fisiopatológico. Exemplos disso são as enzimas acetilcolinesterase (AChE), relacionado à doença de Alzheimer, e α -glicosidase (α -Gli), relacionado ao *Diabetes mellitus*^{1,2}. Uma tendência recente na área de ensaios enzimáticos é a utilização da eletroforese capilar (CE), cujo método chamado de microanálise mediada por eletroforese capilar (EMMA) é de particular interesse, tendo sido utilizado para ensaios de atividade enzimática, estudos cinéticos e de inibição³. **Objetivos.** O presente estudo buscou a execução e adaptação dos métodos descritos por Martín-Biosca et al.⁴ e por Guo et al.⁵ como ferramenta de estudo para a avaliação da inibição da AChE e α -Gli, respectivamente **Materiais e métodos.** O experimento foi realizado em equipamento Agilent modelo 7100 com DAD e capilares de sílica fundida/polimida (50 μ m x 58,5 cm), em 230 nm para AChE; e 270 e 406 nm para α -Gli. O BGE e o tampão utilizados foram 30 mM de H₃BO₃ e 30 mM de NaH₂PO₄ (pH 8,0) no caso da AChE; e Na₂B₄O₇ 20 mM (pH 9,2) como BGE e fosfato 40 mM (pH 6,8) como tampão de diluição no ensaio de α -Gli. Uma solução de AChE (10 U.mL⁻¹) ou α -Gli (5 U.mL⁻¹) e de substrato (acetiltiocolina, 2 mM, ou *p*-nitrofenil α -D-glicopiranosídeo, 0,2 mM) com ou sem inibidor/amostra, foram introduzidos no capilar em modo sanduíche, ou seja, solução de enzima (50 mBar, 5 s), substrato (50 mBar, 5 s) e enzima (50 mBar, 5 s) e deixado em repouso por 2 minutos (cassete à 37 °C) para incubação. Após, uma tensão de 30 kV foi aplicada. A % de inibição foi calculada pela fórmula: % inibição = 100 - (t/cn × 100); onde t é a área do pico do produto na presença de inibidor/amostra e “cn” a área do pico correspondente ao produto sem presença de inibidor. **Resultados e discussões.** Com esses parâmetros, foi possível verificar que o pico referente ao produto diminuiu em área quando neostigmina e acarbose são adicionados ao ensaio, e uma IC₅₀ de 14,1 μ M e 0,17 mM, respectivamente, foram obtidas. **Conclusões.** O método tem potencial para a avaliação da inibição da AChE ou α -Gli por amostras promissoras, com por exemplo extratos vegetais ou seus compostos isolados. Experimentos estão em andamento no sentido de melhor otimizar o método na presença de inibidores e amostras de produtos naturais.

Palavras-Chave: EMMA, acetilcolinesterase, α -glicosidase.

Referências:

- ¹Reitz, C., Mayeux, R., 2014. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem. Pharmacol.* 88, 640–651.
- ²Galtier, F., 2010. Definition, epidemiology, risk factors. *Diabetes Metab.* 36, 628–651.
- ³Fan, Y., Scriba, G.K.E., 2010. Advances in-capillary electrophoretic enzyme assays. *J. Pharmaceut. Biomed.* 53, 1076–1090.
- ⁴Martín-Biosca, Y., Asensi-Bernardi, L., Villanueva-Camañas, R.M., Sagrado, S., Medina-Hernández, M.J., 2009. Screening of acetylcholinesterase inhibitors by CE after enzymatic reaction at capillary inlet. *J. Sep. Sci.* 32, 1748–1756.
- ⁵Guo, L.-P., Jiang, T.-F., Lv, Z.-H., Wang, Y.-H., 2010. Screening α -glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis. *J. Pharmaceut. Biomed.* 53, 1250–1253.

ANEXO B – Trabalho apresentado no 24º Encontro de Química da Região Sul



XXIV ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL A QUÍMICA NA INTERFACE DE 29/11 A 01/12 DE 2017, FLORIANÓPOLIS, SC

CERTIFICADO

A comissão organizadora do XXIV Encontro de Química da Região Sul – A Química na Interface, realizado em Florianópolis – SC de 29 de novembro a 01 de dezembro de 2017, certifica que o trabalho QA-004 intitulado “**Avaliação da atividade anti-colinesterásica e α -glucosidase de sucos de frutas por microanálise mediada por eletroforese capilar (EMMA)**”, autoria de Diogo A. Siebert (PG), Michele D. Alberton (PQ), Gustavo A. Micke (PQ) foi apresentado na forma de pôster durante o evento.

Nito Angelo Debacher
Coordenador Geral

Avaliação da atividade anti- colinesterásica e α -glucosidase de sucos de frutas por microanálise mediada por eletroforese capilar (EMMA).

Diogo A. Siebert¹ (PG)*, Michele D. Alberton² (PQ), Gustavo A. Micke¹ (PQ). siebertnu@gmail.com

¹ Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, Brasil.

² Departamento de Ciências Farmacéuticas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau/SC, Brasil.

Gmc Analítica (ANA)

Palavras Chave: Sucos, EMMA, acetilcolinesterase, α -glucosidase.

Introdução

Uma das estratégias que podem ser adotadas para o tratamento de doenças é a inibição de enzimas que possuem papel chave no processo fisiopatológico. Exemplos disso são as enzimas acetilcolinesterase (AChE), relacionada à doença de Alzheimer, e α -glucosidase (α -Gli), relacionada ao Diabetes mellitus^{1,2}. Uma tendência recente na área de ensaios enzimáticos é a utilização da eletroforese capilar (CE), cujo método chamado de microanálise mediada por eletroforese capilar (EMMA) é de particular interesse, tendo sido utilizado para ensaios de atividade enzimática, estudos cinéticos e de inibição³. Sucos de frutas são de maneira geral uma excelente fonte de muitos nutrientes, como compostos fenólicos, que contribuem para uma dieta saudável⁴. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de inibição de inibição das enzimas AChE e α -Gli por sucos de frutas, utilizando os métodos descritos por Martin-Biosca et al.⁵ e Guo et al.⁶, com modificações. Para produzir os sucos, foram adquiridas 13 frutas de mercado local, sendo elas: amora-preta, goiaba, jaboticaba, kiwi, laranja, limão-taiti, maçã, manga, morango, maracujá, pitanga, pitaya e uva. Quarenta gramas da fruta inteira foram turbinadas com 200 mL de água deionizada, produzindo um suco, que posteriormente foi filtrado sob pressão reduzida, liofilizado (-80 °C, 48 horas) e armazenado a -20 °C até o uso. O experimento foi realizado em equipamento Agilent modelo 7100 com DAD e capilares de sílica fundida/polimida (50 μ m x 58,5 cm), em 230 nm para AChE; e 270 e 406 nm para α -Gli. O BGE e o tampão utilizados foram 30 mM de H₂BO₃ e 30 mM de NaH₂PO₄ (pH 8,0) no caso da AChE; e Na₂B₄O₇ 20 mM (pH 9,2) como BGE e fosfato 40 mM (pH 6,8) como tampão de diluição no ensaio de α -Gli. Uma solução de AChE (10 U mL⁻¹) ou α -Gli (5 U mL⁻¹) e de substrato (acetilcolina, 2 mM, ou p-nitrofenil α -D-glicopiranosídeo, 0,2 mM) com ou sem inibidor/amostra, foram introduzidos no capilar em modo sanduíche, ou seja, solução de enzima (50 mBar, 5 s), substrato (50 mBar, 5 s) e enzima (50 mBar, 5 s) e deixado em repouso por 2 minutos (cassete à 37 °C) para incubação. Após, uma tensão de 30 kV foi aplicada. A % de inibição foi calculada pela fórmula: % inibição = 100 - (t/cn x

100); onde t é a área do pico do produto na presença de inibidor/amostra e "cn" a área do pico correspondente ao produto sem presença de inibidor.

Resultados e Discussão

Tabela 1. Resultados de atividade inibitória de acetilcolinesterase e de α -glucosidase.

Juice	% inibição	
	AChE ^a	α -Glucosidase ^b
Amora-preta	28,54 \pm 0,37	51,73 \pm 2,22
Goiaba	36,32 \pm 2,80	21,60 \pm 1,43
Jaboticaba	85,90 \pm 1,73	57,91 \pm 2,60
Kiwi	42,18 \pm 6,58	11,13 \pm 0,54
Laranja	43,22 \pm 2,72	8,25 \pm 0,88
Limão-taiti	77,51 \pm 1,55	9,73 \pm 1,55
Maçã	33,99 \pm 4,38	10,44 \pm 1,44
Manga	44,97 \pm 2,57	12,31 \pm 1,39
Maracujá	66,38 \pm 1,91	13,14 \pm 2,91
Morango	51,43 \pm 1,39	23,56 \pm 1,76
Pitanga	52,67 \pm 1,24	69,47 \pm 2,89
Pitaya	39,28 \pm 4,00	19,57 \pm 1,05
Uva	26,39 \pm 2,21	22,28 \pm 0,82
Neostigmina ^c	80,64 \pm 0,66	n.a.
Acarbose ^d	n.a.	39,03 \pm 3,51

^a Sucos neste ensaio à 5 mg mL⁻¹; ^b Sucos neste ensaio à 1 mg mL⁻¹; ^c Neostigmina à 10 mg L⁻¹; ^d Acarbose à 100 mg L⁻¹.

Conclusões

O método de avaliação de atividade enzimática aplicado no estudo foi eficaz na determinação da inibição exercida pelos sucos, dos quais se destacaram os sucos de jaboticaba e pitanga, com atividades interessantes contra as duas enzimas. Estudo de investigação dos constituintes fenólicos dos sucos estão em andamento.

Agradecimentos

CNPq, UFSC e FURB.

¹ Restz, C. e Mayeux, R. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *88*, 640.

² Galtier, F. *Diabetes Metab.* **2010**, *36*, 628.

³ Fan, Y. e Scriba, G.K.E. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2010**, *53*, 1076.

⁴ Li, B.B.; Smith, B. e Hossain, M. *Solvent Extract Method Sep. Purif. Technol.* **2006**, *48*, 182.

⁵ Martin-Biosca, Y., Aresu-Bernardi, L., Villanueva-Cañadas, R.M., Sagrado, S. e Medina-Hernández, M.J. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 1748.

⁶ Guo, L.-P., Jiang, T.-F., Lv, Z.-H. e Wang, Y.-H. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2010**, *53*, 1250.

ANEXO C – Trabalho apresentado no 24th LACE

24th

Latin-American
Symposium on Biotechnology, Biomedical,
Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary
Electrophoresis and Microchip Technology

We hereby certify that the poster entitled “Dual electrophoretically-mediated microanalysis in multiple injection mode for the simultaneous determination of acetylcholinesterase and α -glucosidase activity” was presented by **Diogo Alexandre Siebert, Juliana Soares Campos** and **Gustavo Amadeu Micke** in the 24th Latin- American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology

Norberto Guzman
Dr. Norberto Guzman
Emeritus Chair

Nora Vizoli
Dra. Nora Vizoli
Chair

Fernanda Silva
Dra. Fernanda Silva
Chair

December 01-04, 2018

Mendoza, Argentina

DUAL ELECTROPHORETICALLY-MEDIATED MICROANALYSIS IN MULTIPLE INJECTION MODE FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE AND α -GLUCOSIDASE ACTIVITY

Diogo Alexandre
Siebert

Universidade Federal de
Santa Catarina, Brazil

PP-A-30

Juliana Soares Campos
Gustavo Amadeu Micke

A recent trend in the area of enzymatic assays is the use of capillary electrophoresis, whose method called electrophoretically-mediated microanalysis (EMMA) is of particular interest [1]. Methods developed with multiple injections are enormously advantageous, increasing the analytical frequency [2], and can be adopted to assays with enzymes, such as acetylcholinesterase (AChE), related to Alzheimer's disease, and α -glucosidase (α -Glu), related to Diabetes mellitus [3,4]. The present study sought to propose a dual EMMA method for the simultaneous determination of AChE and α -Glu activity, using the multiple injections. Experiments were performed on an Agilent 7100 equipment with diode array detector using fused silica capillaries (50 μ m x 48.5 cm) at 230, 270 and 406 nm. Buffer solutions used were: 30 mM H₃BO₃/NaH₂PO₄ (pH 8.0) and 40 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 6.8). Solutions of AChE (10 U mL⁻¹) and α -Glu (10 U mL⁻¹) and substrate (acetylthiocholine, 2 mM and p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, 0.2 mM) with or without inhibitor/sample were injected in "sandwich" mode (enzyme-substrate-enzyme), incubated for 2 minutes (cassette at 37 °C) and 30 kV was used for separation. The inhibition percentage was calculated by the formula: inhibition % = 100 - (t/cn × 100); where t and cn are the peak area of the product in the presence of inhibitor/sample and without the presence of an inhibitor, respectively.

With these parameters, it was possible to verify that the products peaks decreased in area when neostigmine and acarbose were added to the assay, and an IC₅₀ of 5.47 μ M and 0.11 mM, respectively, were obtained.

The method has potential for the evaluation of inhibition of AChE or α -Glu in a screening approach, such as plant extracts or their compounds isolated. Experiments are under way to assess the kinetic parameters of the method, and its application to samples of natural products.

References:

1. Fan Y, Scriba GKE. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2010, 53, 1076–1090.
2. Welch CJ, Gong X, Schafer W, Pratt EC, Brkovic T, Pirezada Z, Cuff JF, Kosjek B. Tetrahedron: Asymmetry 2010, 21, 1674–1681.
3. Reitz C, Mayeux R. Biochemical Pharmacology 2014, 88, 640–651.
4. Galtier F. Diabetes & Metabolism 2010, 36, 628–651.

Acknowledgements:

Authors are grateful to CAPES, CNPq, UFSC and INCT-Catálise for the technical and financial support.

ANEXO D – Artigo publicado no periódico *Natural Product Research*

NATURAL PRODUCT RESEARCH
<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1550760>



SHORT COMMUNICATION



Determination of acetylcholinesterase and α -glucosidase inhibition by electrophoretically-mediated microanalysis and phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS of fruit juices from Brazilian Myrtaceae *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel and *Eugenia uniflora* L.

Diogo Alexandre Siebert^a, Flávia de Mello^b, Michele Debiasi Alberton^b, Luciano Vitali^a and Gustavo Amadeu Mücke^a

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil;

^bDepartamento de Ciências Farmacéuticas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brazil

ABSTRACT

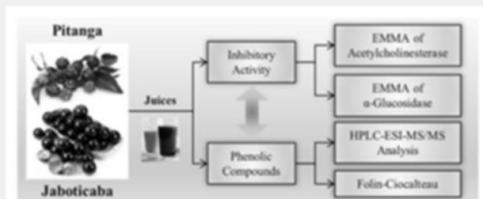
Alzheimer's disease and diabetes mellitus are contemporary diseases of great concern. Phenolic compounds are linked to several health benefits and could lead to novel strategies to combat these ailments. The objective of this study was to evaluate by electrophoretically-mediated microanalysis the potential inhibitory activity of the fruit juices from *Plinia cauliflora* ("jaboticaba") and *Eugenia uniflora* ("pitanga") toward acetylcholinesterase (AChE) and α -glucosidase, target enzymes in strategies for the treatment of these diseases. The phenolic profiles of the samples were also investigated. Jaboticaba and pitanga juices inhibited 85.90 ± 1.73 and $52.67 \pm 1.24\%$ of AChE activity at 5 mg mL^{-1} , and 57.91 ± 2.60 and $69.47 \pm 2.89\%$ of α -glucosidase activity at 1 mg mL^{-1} , respectively. Total phenolic content of the juices were 303.54 ± 28.28 and $367.00 \pm 11.42 \text{ mgGA L}^{-1}$, respectively. The observed inhibitory activity can be explained, at least in part, by the presence of the phenolic compounds.

ARTICLE HISTORY

Received 14 August 2018
 Accepted 17 November 2018

KEYWORDS

Pitanga; Jaboticaba;
 phenolic; EMMA;
 acetylcholinesterase;
 α -glucosidase



CONTACT Gustavo Amadeu Mücke gustavo.micke@ufsc.br

Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1550760>.

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group