

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE COLINESTERASE DE *PROCHILODUS BREVIS*
PARA EMPREGO BIOTECNOLÓGICO**

GIOVANNI ORTIZ LEONCINI

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

GIOVANNI ORTIZ LEONCINI

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE COLINESTERASE DE *PROCHILODUS BREVIS*
PARA EMPREGO BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação de mestrado apresentado
ao Instituto de Química e
Biotecnologia - IQB como requisito
para obtenção de grau de mestre em
Química e Biotecnologia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Fabiane
Caxico de Abreu Galdino
Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Sonia
Salgueiro Machado

MACEIÓ-AL
MAIO/2016

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

L582p Leoncini, Giovanni Ortiz.
Purificação parcial de colinesterase de *Prochilodus brevis* para
emprego biotecnológico / Giovanni Ortiz Leoncini. – 2016.
[105] f. : il., grafs., tabs.

Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.
Coorientadora: Sonia Salgueiro Machado.
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de
Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 95-103.
Anexo: f. 104-[105].

1. Colinesterase. 2. Proteína - Purificação. 3. Biossensor - Enzimas.
I. Título.

CDU: 544.6:53.082.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

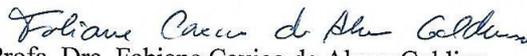


BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Giovanni Ortiz Leoncini**, intitulada: **“Purificação parcial de colinesterase de *Prochilodus brevis* para emprego biotecnológico”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 31 de maio de 2016, às 14h, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Sonia Salgueiro Machado
Coorientadora – (IQB/UFAL)


Prof. Dr. Francis Soares Gomes
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Luciano Aparecido Meirelles Grillo
(Esenfar/UFAL)

Esta dissertação é dedicada aos meus familiares, distantes e próximos que sempre torceram por mim. Especialmente minha mãe por alimentar meus sonhos e meu pai pelo pensamento cético. Moldaram meu caráter que tanto contribuíram para minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, pela oportunidade de realizar este trabalho acreditando na minha capacidade e por todas as vezes que me deparei com barreiras, sempre me transmitindo tranquilidade com seu bom humor.

À professora Dra. Sonia Salgueiro Machado, que norteou meus primeiros passos na pesquisa. Sempre presente me ensinou a coisa mais importante para um pesquisador, pensar.

Ao Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) e ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Aos professores do IQB que contribuíram diretamente ou indiretamente para a construção do meu conhecimento desde a graduação até hoje.

Aos professores doutores que se disponibilizaram para compor a banca examinadora: Dr. Hugo Juarez, Dr. Fracis Soares e Dr. Luciano Meireles.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Enzimologia (LBE) que contribuíram fortemente para a realização deste projeto e na minha autoestima em todos os dias de trabalho: Dra. Jaqueline, Amanda, Nyanne, Emerson, Marina, Madson, Luan, Kaline, Jailson, Magno, Thiago, Thomás, Claudianne; e aos professores Dr. Vitor Lima, Dra. Jaqueline Maria da Silva, Dra. Fátima Lúcia de Brito dos Santos e Dr. Juan Pablo Zúñiga-Hertz.

Aos amigos do Laboratório de Metabolismo e Proteoma (LAMP) pelo companheirismo e boa vontade: Cláudio, Ricardo, Humberto, Cledson, Elizabeth, Fabiana, Roberto, Marta, Nicolas, João, Sarah.

Aos amigos do Laboratório de Eletroquímica pelo suporte e ajuda inegável: Samaysa, Carol, Marylia, Ygor, Caio e Angladis.

Ao amigo Edeildo do Laboratório de Química Medicinal (LQM – Esenfar/UFAL) pela disposição e boa vontade de fornecer os dados de modelagem computacional.

Aos funcionários Anderson, Aldy dos Santos e Dona Geruza.

À Companhia Hidroelétrica do São Francisco (CHESF) pela doação de exemplares de peixes.

Ao órgão de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

À meu pais, Corrado Leoncini e Delia Hilda Ortiz; meu irmão Valentino Leoncini. Me apoiaram e incentivaram todos esses anos.

RESUMO

As colinesterases (ChE) desempenham um papel importante na detecção de organofosforados e carbamatos que são substâncias de alto interesse para o controle ambiental, pois estes compostos estão presentes na maioria dos pesticidas aplicados em lavouras. O desenvolvimento de biossensores a base de ChE para a detecção destes contaminantes com maior rapidez, sensibilidade e seletividade, tem a capacidade de quantificar, a partir de um transdutor adequado, a diminuição da atividade enzimática causada pelos contaminantes. Este trabalho teve como objetivo de purificar e caracterizar AChE de cérebro de *Prochilodus brevis* para o emprego em testes eletroquímicos. Os gradientes de pH, força iônica e temperatura, mostraram maiores atividades em pH 8,5, força iônica de 0,08M, temperatura ótima 28°C e estabilidade térmica de 37°C para extrato livre de células. Foi aplicado o método de precipitação salina em frações de 0-70% seguido de 0-40% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como refinamento para cromatografia líquida. O protocolo de purificação 1 apresentou atividade específica de 1,41 U/mg em 0-70%, enquanto 0-40% apresentou 1,94 U/mg. O protocolo de purificação 2, a fração 0-70% teve atividade específica de 0,31 U/mg e 0-40% de 1,77 U/mg. Após a cromatografia de sephacryl S-200 apresentou atividade específica para os protocolos 1 e 2 de 0,128U/mg e 0,2869 U/mg, respectivamente. Na continuidade do protocolo 2 com DEAE-sepharose o pico eluído apresentou atividade específica de 0,01326 U/mg. No protocolo de purificação 3, 0-70% tem atividade específica 0,310 U/mg, seguido de 1,774 U/mg em 0-40%. Após Sephacryl S-100 foi obtido dois picos com atividade específica de 0,194 U/mg (ChE1) e 0,0873 U/mg (ChE2). Eletroforese SDS-PAGE de ChE1 apresentou banda pouco visível de aproximadamente 67KDa. Os ensaios de inibição com ChE1 apresentaram maior especificidade para BW 284c51. Os testes eletroquímicos com extrato livre de célula, dialisado, ChE1 e ChE2, mostraram oxidação de tiocolina (TCh) com melhores limites de detecção e quantificação para ChE1 e ChE2. Os experimentos de modelagem molecular apresentaram resultados favoráveis na formação do complexo ChE-NTCPM. O estudo mostrou o isolamento de ChE com atividade catalítica para as duas enzimas, AChE e BuChE, com propriedades de adsorção favoráveis em NTCPM no desenvolvimento de biossensor enzimático para monitoramento ambiental.

Palavras-chave: Colinesterase. Purificação de Proteína. Biossensor enzimático.

ABSTRACT

The cholinesterase (ChE) play an important role in the organophosphates and carbamates detection substances that are of high interest for environmental control, because these compounds are present in most pesticides applied to crops. The development of ChE biosensors to detect these contaminants with greater speed, sensitivity and selectivity, has the ability to quantify from a suitable transducer, the reduction of enzyme activity caused by contaminants. This study aimed to purify and characterize AChE of *Prochilodus brevis* brain for use in electrochemical tests. Gradients of pH, ionic strength and temperature, showed high activities in pH 8,5, 0,08M at ionic strength, 28C° of temperature optimum and 37°C of thermal stability for cell-free extract. Was applied salting out method in fractions 0-70% followed by 0-40% of (NH₄)₂SO₄ as a refinement to liquid chromatography. The purification protocol 1 showed specific activity of 1.41 U/mg in 0-70% and 0-40% was 1.94 U/mg. The purification protocol 2, the 0-70% fraction had specific activity of 0.31 U/mg and 0-40% with 1.77 U/mg. After Sephacryl S-200 chromatography, showed specific activity for protocols 1 and 2 of 0,128U/mg and 0.2869 U/mg, respectively. The next stage of the Protocol 2 with DEAE-Sepharose was eluted peak with specific activity of 0.01326 U/mg. In the purification protocol 3, 0-70% have specific activity 0.310 U / mg, followed by 1,774 U/mg in 0-40%. After Sephacryl S-100, was obtain two peaks with a specific activity of 0.194 U/mg (ChE1) and 0.0873 U/mg (ChE2). SDS-PAGE of ChE 1 showed somewhat visible band of approximately 67kDa. Inhibition assays with ChE 1 had higher specificity for BW 284c51. Electrochemical tests with cell-free extract, dialyzed, ChE1 and ChE2, showed thiocholine (TCh) oxidation with better limits of detection and quantification limits for ChE1 and ChE2. The molecular modeling experiments showed favorable results in complex formation ChE-NTCPM. The study showed the isolation of ChE with catalytic activity for both enzymes, AChE and BuChE, with favorable adsorption properties in NTCPM in the development of enzymatic biosensor for environmental monitoring.

Key words: Cholinesterase. Protein Purification. Enzymatic Biosensor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875).....21
- Figura 2** - Liberação de ACh pelo neurônio pré-sináptico, liga-se ao receptor da membrana pós-sináptica abrindo os canais iônicos. AChE atua como regulador da concentração de ACh na fenda sináptica.....23
- Figura 3** - Mecanismo de “porta dos fundos”: liberação dos produtos de hidrólise de ACh no fundo do sítio ativo de AChE.....24
- Figura 4** - Sítio ativo de AChE em humano (*HuAChE*) (PDBID1B41).....25
- Figura 5** - Mecanismo de reação da hidrólise de ACh em etapas de acilação e desacilação.....27
- Figura 6** - Estrutura de AChE (A) e BuChE (B). AChE comporta até 24 moléculas de água correspondendo a um volume de aproximadamente de 276\AA^3 (C), enquanto BuChE comporta 47 moléculas de água que representam um volume de 541\AA^3 (D).....28
- Figura 7** - Acima: formas solúveis (mono-, di- e tetramérica) de AChE (G1 e G2 anfifílicos, e G4 não anfifílico; respectivamente). Abaixo: formas ligadas à membrana de AChE são representadas pela forma G4 globular não anfifílico ancorada na membrana por meio da proteína rica em prolina (PRiMA) ou pela subunidade do colágeno Q. O último a direita representa uma forma dimérica hidrófoba (G2) de AChE ligado à membrana celular por meio de uma âncora de GPI.....29
- Figura 8** - Fórmula estrutural geral de carbamatos.....31
- Figura 9** - Mecanismo esquemático da ação de carbamatos como inibidores ChE.....32
- Figura 10** - Molécula de Fisostigmina, primeiro composto anticolinesterásico utilizado em DA.....33

Figura 11 - Fórmula Estrutural geral de organofosforados.....	34
Figura 12 - Molécula de Iso-OMPA (Tetraisopropil pirofosfoforamida), inibidor específico de BuChE.....	34
Figura 13 - Molécula de BW 284c51, inibidor específico de AChE.....	35
Figura 14 - Esquema de interações entre BW 284c51 e resíduos adjacentes (ausência de água) no interior do sítio ativo de TcAChE.....	36
Figura 15 - Número de papers publicados durante o período de 1990 a 2014. Dados obtidos por pesquisa de papers utilizando como palavras-chave “biosensors” and “enzyme” and “inhibition” no banco de dados de Web of knowledge, Thomson Reuters and Scopus.....	41
Figura 16 - Distribuição de enzimas usadas em design de biosensores baseados em inibição.....	42
Figura 17 - Fluxograma do protocolo de purificação 1.....	48
Figura 18 - Fluxograma do protocolo de purificação 2.....	50
Figura 19 - Fluxograma do protocolo de purificação 3.....	51
Figura 20 - Sistema eletroquímico montado.....	53
Figura 21 - TcAChE inserida na caixa d'água.....	54
Figura 22 - Variação da atividade de ChE presente no extrato de cérebro de <i>Prochilodus Brevis</i> em função do pH de K ₂ HPO ₄	56
Figura 23 - Variação da atividade de ChE presente no extrato de cérebro de <i>Prochilodus Brevis</i> em função da concentração de K ₂ HPO ₄	57
Figura 24 - Variação da atividade de ChE presente no extrato de cérebro de <i>Prochilodus Brevis</i> em função da temperatura.....	58
Figura 25 - Variação da atividade de ChE presente no extrato de cérebro de <i>Prochilodus Brevis</i> em função da temperatura.....	59

- Figura 26** - Perfil de eluição para a cromatografia de AChE de *Prochilodus Brevis* em Sephacryl S-200 (1,0x32,7 cm) previamente equilibrado com 20mM de Tris-HCl, pH 7,5 e NaCl 0,3M com uma taxa de fluxo de 0,28 mL/min e 2,5mL por fração. Absorbância a 280nm (●—●) e atividade AChE (■—■).....62
- Figura 27** - Perfil de eluição para a cromatografia de AChE de *Prochilodus Brevis* em Sephacryl S-200 (1,0x22 cm) previamente equilibrado com 20mM de Tris-HCl, pH 7,5 e NaCl 0,3M com uma taxa de fluxo de 0,40 mL/min e 3,0 mL por fração. Absorbância a 280nm (●—●) e atividade AChE (■—■).....67
- Figura 28** - Perfil de eluição para a cromatografia de AChE de *Prochilodus Brevis* em DEAE-Sepharose (1,5x32 cm) previamente equilibrado com 20mM de Tris-HCl, pH 7,5 com uma taxa de fluxo de 0,125 mL/min e 5 mL por fração. Absorbância a 280nm (●—●) e atividade AChE (■—■).....68
- Figura 29** - Perfil de eluição para a cromatografia de AChE de *Prochilodus Brevis* em Sephacryl S-100 (1,5x16,19 cm) previamente equilibrado com 20mM de Tris-HCl, pH 7,5 com uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min e 3 mL por fração. Absorbância a 280nm (●—●) e atividade AChE (■—■).....73
- Figura 30** - Eletroforese SDS-PAGE a 12%. As canaletas abaixo: (1) Marcador, (2) 0,031 mg proteína de ChE1 (pico 1 – protocolo de purificação 3). A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas coradas com Comassie.....76
- Figura 31** - Efeito dos inibidores em ChE1 de *P. Brevis*. BW 284c51, Eserina e Iso-OMPA a 0,3µM.....78
- Figura 32** - Efeito dos inibidores em ChE1 de *P. Brevis*. BW 284c51, Eserina e Iso-OMPA a 0,7µM.....79
- Figura 33** - Efeito dos inibidores em ChE1 de *P. Brevis*. BW 284c51, Eserina e Iso-OMPA a 1,0 µM.....79
- Figura 34** - Esquema de modificação do eletrodo (A) e mecanismo de detecção do sinal de oxidação de TCh a +750mV (B).....81

Figura 35 - Resposta VPD em ECV/NTCPM/Extrato livre de células (atividade específica = $1,07 \times 10^{-4}$ U/mg) para adições sucessivas de ATCh (0,05, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25, 0,3, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85 mM) em tampão fosfato pH 7.....	82
Figura 36 - Resposta VPD em ECV/NTCPM/Dialisado (atividade específica = $9,40 \times 10^{-4}$ U/mg) para adições sucessivas de ATCh (0,05, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25, 0,3, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85 mM) em tampão fosfato pH 7.....	82
Figura 37 - Resposta VPD em ECV/NTCPM/ChE1 (atividade específica = $9,7 \times 10^{-4}$ U/mg) para adições sucessivas de ATCh (0,05, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25, 0,3, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85 mM) em tampão fosfato pH 7.....	83
Figura 38 - Resposta VPD em ECV/NTCPM/ChE2(atividade específica = $4,3 \times 10^{-4}$ U/mg) para adições sucessivas de ATCh (0,05, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25, 0,3, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85 mM) em tampão fosfato pH 7.....	83
Figura 39 - Curva analítica ATCh/mmol/L vs Corrente μ A em ECV/NTCMP/Extrato livre de célula.....	85
Figura 40 - Curva analítica ATCh/mmol/L vs Corrente μ A em ECV/NTCMP/Dialisado.....	85
Figura 41 - Curva analítica ATCh/mmol/L vs Corrente μ A em ECV/NTCMP/ChE1.....	86
Figura 42 - Curva analítica ATCh/mmol/L vs Corrente μ A em ECV/NTCMP/ChE2.....	86
Figura 43 - Evolução do tempo de simulação e sua influência sobre as cadeias laterais e carbonos alfa ($C\alpha$) para <i>TcAChE</i> . Em azul, deslocamento $C\alpha$; em castanho, deslocamento das cadeias laterais.....	89
Figura 44 - Flutuações dos aminoácidos observadas para <i>TcAChE</i> em função do tempo.....	90
Figura 45 - Complexo formado NTCPM (verde) e região de <i>TcAChE</i>	91
Figura 46 - Evolução do tempo de simulação e sua influência sobre as cadeias laterais e carbonos alfa ($C\alpha$) para <i>HuBuChE</i> . Em azul, deslocamento $C\alpha$; em castanho, deslocamento das cadeias laterais.....	92

Figura 47 - Flutuações dos aminoácidos observadas para <i>HuAChE</i> em função do tempo.....	93
Figura 48 - Complexo formado NTCPM (verde) e região de <i>HuBuChE</i>	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de sulfato de amônio para precipitação da proteína.....	47
Tabela 2 - Precipitação fracionada de colinesterase em diferentes saturações de (NH ₄) ₂ SO ₄	61
Tabela 3 - Protocolo de purificação 1 de acetilcolinesterase cerebral de <i>Prochilodus brevis</i>	64
Tabela 4 - Precipitação fracionada de colinesterase em diferentes saturações de (NH ₄) ₂ SO ₄	66
Tabela 5 - Protocolo de purificação 2 de acetilcolinesterase cerebral de <i>Prochilodus brevis</i>	70
Tabela 6 - Precipitação fracionada de colinesterase em diferentes saturações de (NH ₄) ₂ SO ₄	72
Tabela 7 - Protocolo de purificação 3 de acetilcolinesterase cerebral de <i>Prochilodus brevis</i>	74
Tabela 8 - Porcentagem relativa da atividade específica de BuChE.....	75
Tabela 9 - Massa Molecular de subunidades de ChE de diferentes fontes.....	77
Tabela 10 - Resultados obtidos a partir das curvas analíticas para ATCh em ECV/NTCPM/Fração. A varredura se deu na faixa de potencial de 0,0 a +1,2V. Utilizando a técnica de VPD.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ATCh	Acetilticolina
BuChE	Butirilcolinesterase
BTCh	Butirilticolina
BW 284c51	1,5-Bis(4-alildimetilamôniofenil)3-pentanona dibrometo
ChE	Colinesterase
DEAE	Dietilaminoetil
DM	Dinâmica molecular
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
Eserina	(3a <i>R</i> ,8a <i>S</i>)- 1,3a,8-trimetil- 1 <i>H</i> ,2 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,3a <i>H</i> ,8 <i>H</i> ,8a <i>H</i> - pirrolo [2,3- <i>b</i>] indol-5-il <i>N</i> -metilcarbamato
ε	Coeficiente de extinção molar
GPI	Glicofosfatidilinositol
<i>Hu</i> BChE	Butirilcolinesterase Humana
Iso-OMPA	Tetraisopropyl pyrophosphoramide
mV	Milivolts
NTCPM	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
SAP	Sítio Aniônico Periférico
SNC	Sistema nervoso central
<i>Tc</i> AChE	Acetilcolinesterase Torpedo californica
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VPD	Voltametria de pulso diferencial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Contaminação em ambientes aquáticos.....	20
2.2 <i>Prochilodus brevis</i>	20
2.3 Enzimas Colinesterases e sua função fisiológica	21
2.4 Diferenças estruturais e mecanismo de hidrólise	25
2.5 Isoformas, sequência e homologia	28
2.6 Inibidores de ChE	30
2.7 Purificação de AChE	36
2.8 Aplicação de ChE em biossensores.....	38
3. OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo geral.....	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
4. METODOLOGIA.....	44
4.1 Preparo do extrato livre de células	44
4.2 Quantificação de proteínas	44
4.3 Atividade Enzimática	45
4.4 Caracterização do extrato livre de células	45
4.5 Inibição enzimática.....	46

4.6 Precipitação Salina	46
4.7 Protocolo de purificação 1	48
4.7.1 Cromatografia de Filtração em Gel (Sephacryl S-200)	48
4.8 Protocolo de purificação 2	49
4.8.1 Cromatografia de Filtração em Gel (Sephacryl S-200)	49
4.8.2 Cromatografia de Troca Iônica (DEAE-Sepharose)	49
4.9 Protocolo de purificação 3	50
4.9.1 Cromatografia de Filtração em Gel (Sephacryl S-100)	50
4.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	51
4.11 Modificação do eletrodo	52
4.12 Eletroanálise	53
4.13 Modelo computacional	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.1 Caracterização do extrato livre de células	56
5.2 Protocolo de purificação 1	60
5.3 Protocolo de purificação 2	65
5.4 Protocolo de purificação 3	71
5.5 Eletroforese SDS-PAGE	75
5.6 Ensaio de inibição	78
5.7 Eletroanálise	80
5.8 Modelo computacional	88

5.8.1 Simulação computacional (<i>TcAChE</i> -NTCPM).....	88
5.8.2 Simulação computacional (<i>HuBuChE</i> -NTCPM).....	92
6. CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	96
ANEXO	106

1. INTRODUÇÃO

A determinação da toxicidade dos pesticidas e da poluição ambiental em ambientes aquáticos é indispensável, principalmente em regiões agrícolas, devido aos malefícios causados ao ecossistema aquático e aos seres humanos. (BULSSOLARO, 2010; RODRIGUES, 2003). As interações entre os contaminantes e os organismos vivos possibilitam a medição dos efeitos que estas substâncias podem causar através de indicadores biológicos, tais como enzimas. As colinesterases (ChE) vem sendo utilizadas como indicador de contaminação, pois é uma classe enzimas presente nas sinapses colinérgicas com alta sensibilidade a compostos organofosforados e carbamatos, substâncias que estão presentes em pesticidas utilizados (CHUIKO, 2003; SILVA, 2004). As intoxicações vão desde a população consumidora destes produtos até o agravamento da poluição ambiental na região de cultivo, pois são absorvidos pelo organismo, pelas vias oral, respiratória e cutânea.

Os organofosforados, dependendo de sua solubilidade nos tecidos, vão desenvolver mais prontamente ou tardiamente os sinais clínicos da intoxicação. Por inalação de vapores do produto no ambiente os primeiros sintomas aparecem em poucos minutos, enquanto que pela ingestão oral ou exposição dérmica pode haver um aparecimento tardio dos sintomas. No caso de carbamatos, a exposição dérmica torna-se crítica quando o organismo se encontra em temperatura elevada. Experimentalmente, quantidades apreciáveis de alguns carbamatos e seus metabólitos tem sido encontradas no leite de mães a eles expostas. Assim como, pode-se esperar a presença de resíduos de carbamatos em produtos comestíveis (CALDAS, 2000).

Após absorvidos, seus produtos de biotransformação são rapidamente distribuídos por todos os tecidos. Os compostos mais lipofílicos podem alcançar concentrações significativas no tecido nervoso, e/ou outros tecidos ricos em lipídios, interagindo com sítios ativo de ChEs, mesmo vários dias após a última exposição impedindo a inativação da ACh, permitindo assim, a ação mais intensa e prolongada do mediador químico nas sinapses colinérgicas, a nível de membrana pós-sináptica. ACh é sintetizada no neurônio a partir da acetilcoenzima A e da colina. É inativada por hidrólise sob ação da AChE, com formação de colina e ácido acético que, por sua vez, são reutilizados para formação da acetilcolina. Para que haja a transmissão sináptica

é necessário que a ACh seja liberada na fenda sináptica e se ligue a um receptor pós-sináptico. Em seguida, a ACh disponível é hidrolizada pela AChE. Quando há a inibição da AChE, ocorre um acúmulo de acetilcolina na fenda, levando a uma hiperestimulação colinérgica e consequente morte, dependendo nos níveis de ACh (CALDAS, 2000). Por este fato, a população requer maior controle de substâncias inibidoras de ChE, seja nos produtos aplicados em lavouras, nos alimentos que são comercializados e ambientes aquáticos contaminados a longo prazo.

É de suma importância o desenvolvimento de novos métodos analíticos aplicados a detecção da inibição de ChEs com maior rapidez, sensibilidade e seletividade é baseada no produto da reação de ChE carbamylada ou fosforilada, que é impedida de hidrolisar o substrato (ADREESCU, 2006). No caso de um biossensor, a diminuição da atividade enzimática é quantificada por um transdutor apropriado (SNEJDARKOVA, 2004). Desta forma vale salientar a importância dos estudos de purificação e caracterização de ChE, pois além dos métodos empregados para imobilização de enzimas em superfícies sólidas para evitar a perda da estabilidade estrutural da enzima, a pureza de ChE é o fator primordial para iniciação de testes de imobilização e desenvolvimento de protótipos até o processo de fabricação do biossensor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contaminação em ambientes aquáticos

Os ambientes aquáticos tem sido os depósitos de diferentes tipos de descargas antropogênicas, no caso de escoamento provenientes de lavouras, onde foram aplicados pesticidas, resulta num sério problema de envenenamento, para peixes e outras formas de vida aquática causando efeitos ambientais em longo prazo, além de comprometer a saúde da população local. Dependendo das características físico-químicas, esses resíduos de agrotóxicos tanto podem se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos (MARTINS & BIANCHINI, 2011; VAN DER OOST, 2003). A contaminação de ambientes aquáticos por agrotóxicos pode não ser percebida pelo fato de muitos desses compostos permanecerem em níveis subletais no ambiente aquático por períodos curtos e por serem pouco estudados por não causarem morte imediata nos peixes (FANTA, 2003). No entanto, a contaminação subletal pode alterar significativamente vários processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos ao penetrarem nos órgãos dos organismos aquáticos (SANCHO, 1992; LINS, 2010).

2.2 *Prochilodus brevis*

As espécies do gênero *Prochilodus*, no caso do peixe curimatã (*Prochilodus Brevis* – **Figura 1**), são encontradas nas principais bacias hidrográficas sul-americanas, tem grande importância comercial em todas as regiões do Brasil, em especial do Nordeste brasileiro, além de seu valor econômico, são importantes componentes ecológicos dos rios devido a sua possibilidade de adaptação em diferentes ambientes aquáticos, grande facilidade de fecundação artificial, alta precocidade e prolificidade, regime alimentar e, principalmente pela sua grande aceitação pelos habitantes. *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875), é um peixe reofílico que migra vários quilômetros rio acima até as áreas reprodutivas, onde desova em áreas abertas (MAIA, 1999; PESSOA, 2015).

Figura 1. *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875).



Fonte: Oliveira, 2010

Em geral apresentam hábito alimentar iliófago, consumindo matéria orgânica: lodo, lama, algas (especialmente diatomáceas), detritos vegetais e partículas de areia, provavelmente presente em maior quantidade e diversidade na época da chuva, depositadas no fundo dos açudes e viveiros. Esta característica permite usá-las em policultivo, junto espécies que se alimentam de frutas, sementes e organismos aquáticos de pequeno porte, que são onívoras. Trabalhos publicados apontam que o habitat tem pouca influência sobre o teor de proteína dos peixes do gênero *Prochilodus*, por outro lado a diversidade sazonal de alimentos pode causar uma pequena variação na proteína. (LOPES, 2006; MAIA, 1999; PESSOA, 2015).

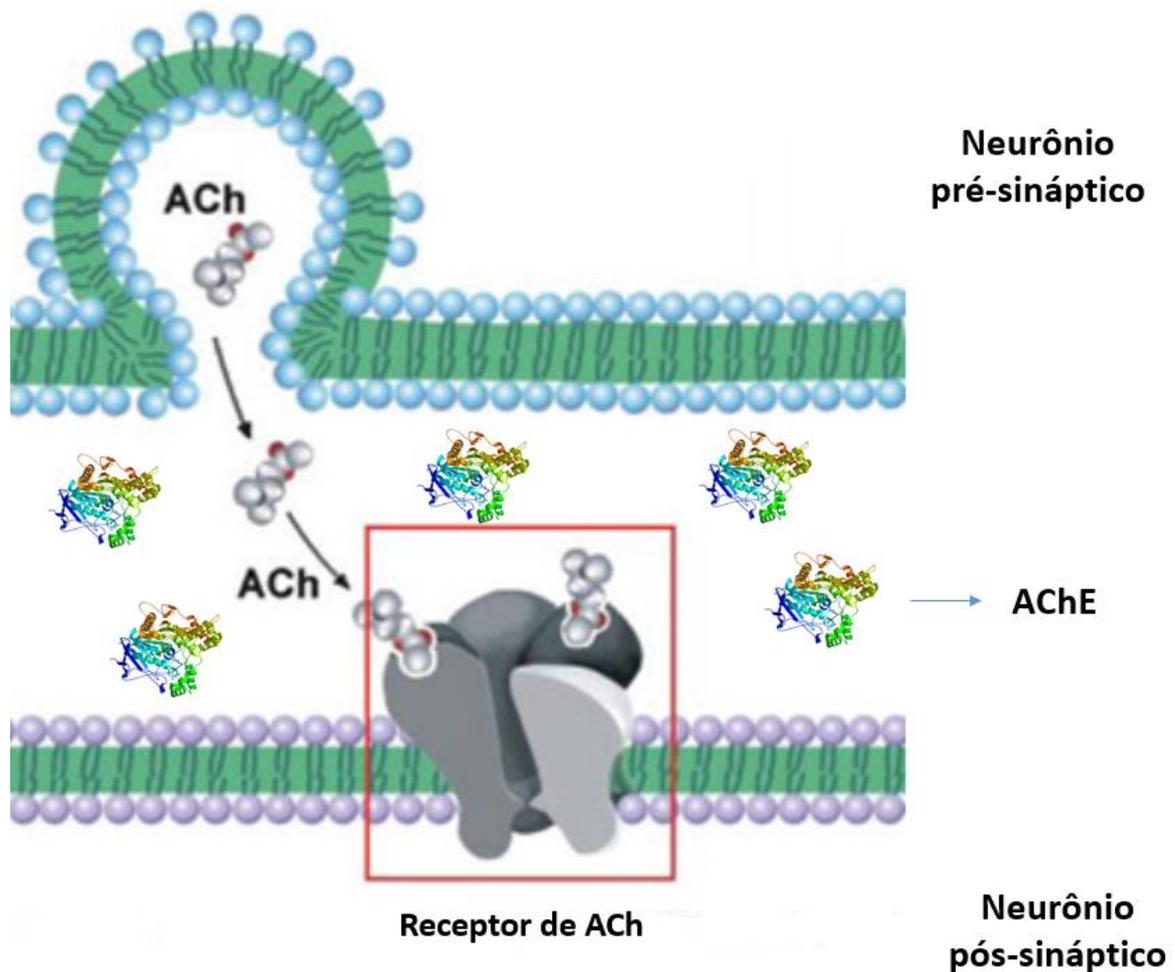
2.3 Enzimas Colinesterases e sua função fisiológica

As Colinesterases (ChEs) são serina hidrolases que envolvem dois tipos: acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8), com base nas preferências de substrato, ACh e BCh, respectivamente. Acetilcolinesterase tem função fisiológica na terminação das sinapses colinérgicas do sistema nervoso central e periferal. ACh é sintetizada é sintetizada no corpo da célula neural ou no axônio a partir de três fontes de colina: a glicerofosforilcolina, a fosforilcolina e a

fosfatidilcolina. Uma vez sintetizada, parte da ACh é transportada e armazenada em vesículas sinápticas. Esse processo é realizado por um transportador vesicular de ACh (VAChT), capaz de elevar em até 100 vezes sua concentração no interior dessas vesículas (VENTURA, 2010).

A liberação de ACh na fenda é resultado do sinal elétrico produzido pelo fluxo de íons através da membrana plasmática do neurônio. Na parte interna do neurônio contém uma alta concentração de K^+ e uma baixa concentração de Na^+ . Em virtude da formação do gradiente eletroquímico formado através da membrana plasmática, os íons Na^+ começam a fluir para dentro da célula aumentando a despolarização e levando a mudança do potencial de membrana de $-60mV$ para cerca de $+30mV$ em um milissegundo. Assim a membrana torna-se espontaneamente menos permeável ao Na^+ e mais permeável a K^+ , o nível de repouso $-60mV$ é restaurado. Quando a onda de despolarização chega aos canais de Ca^{2+} , logo são abertos pela voltagem. A elevação do $[Ca^{2+}]$ citoplasmático desencadeia a mobilização das vesículas e direção ao terminal sináptico, seguido de fusão das vesículas e exocitose de acetilcolina na fenda sináptica que difunde-se para célula pós-sináptica, na qual ela se liga aos receptores da ACh (**Figura 2**). Dessa forma, a mensagem é passada para a próxima célula no circuito. A finalização da sinapse colinérgica ocorre pela ação de AChE, essencial no sistema nervoso, que termina rapidamente a ação de ACh liberada na fenda através da hidrólise, gerando como produtos colina e ácido acético (BERG, 2014; LEHNINGER, 2005).

Figura 2. Liberação de ACh pelo neurônio pré-sináptico, liga-se ao receptor da membrana pós-sináptica abrindo os canais iônicos. AChE atua como regulador da concentração de ACh na fenda sináptica.

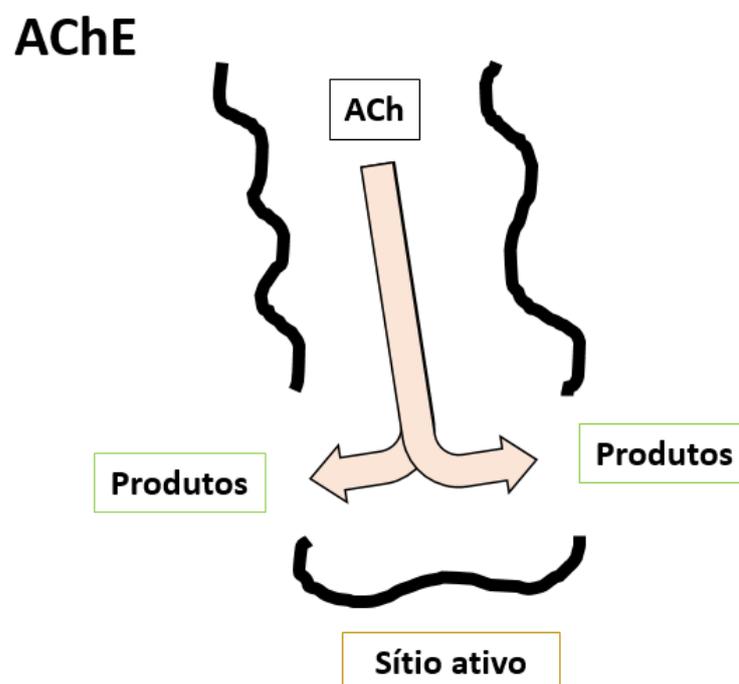


Fonte: Waymaire, 1997.

AChE tem seletividade para ACh enquanto BuChE é menos seletiva, hidrolisando acetilcolina e butirilcolina. O grau de homologia de AChE e BuChE apresentam aproximadamente 50% dos aminoácidos e das estruturas terciárias globais semelhantes. A diferença crucial encontra-se nos resíduos de aminoácidos característicos do sítio ativo: bolso acilo, localizado na parte inferior da garganta catalítica; no sítio periférico, situado na entrada da garganta; bolso oxiânion e na região hidrofóbica de interação da colina (YANG, 2013; PAZZEMENTI, 2011).

Observa-se também em termos de estabilidade geral e flexibilidade, que os resíduos modificados por mutagênese localizado nestas regiões alteram a sensibilidade AChE. Isto sugere que a atividade catalítica e a especificidade para o substrato depende da dinâmica de movimentos dentro da estrutura da proteína e não simplesmente refletir uma adaptação estática entre o sítio ativo e seus ligantes. A alta rotatividade da AChE e o forte dipolo eletrostático causada pela distribuição da carga assimétrica mostra que provavelmente o produto gerado pela hidrólise (colina) não deixa o local do sítio ativo através do mesmo caminho pelo qual o substrato foi introduzido. Por esta razão, o mecanismo de "porta dos fundos" foi proposto (**Figura 3**), a fim de levar em conta essas propriedades. Tem sido proposto, com base na dinâmica molecular e mutagênese de sitio dirigido, que o processo ocorre através da abertura da parte inferior do sítio ativo de AChE para fornecer um canal através do qual os produtos podem passar, assim permitindo um fluxo parcial de substrato através do sítio ativo (HOUGHTON, 2006; SHAFFERMAN, 2008).

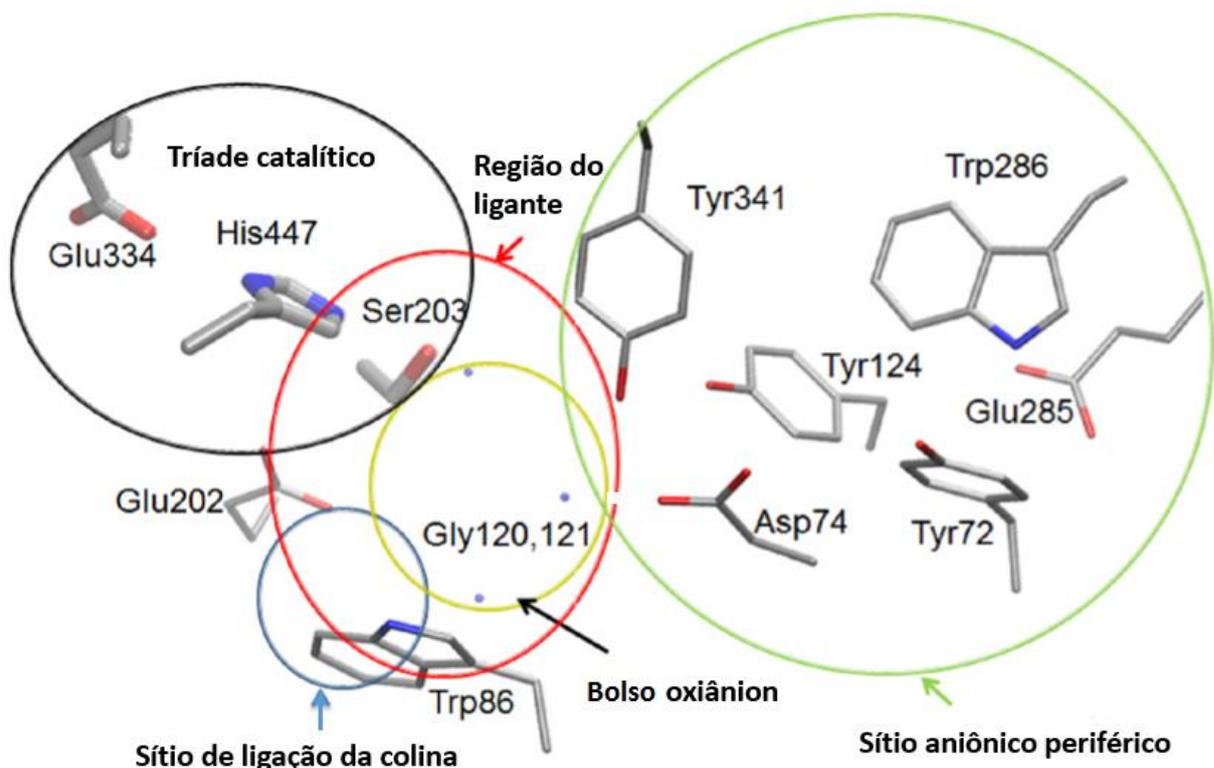
Figura 3. Mecanismo de "porta dos fundos": liberação dos produtos de hidrólise de ACh no fundo do sítio ativo de AChE.



2.4 Diferenças estruturais e mecanismo de hidrólise

A estrutura de AChE em mamíferos é muito semelhante ao da arraia elétrica *Torpedo californica* (TcAChE). A AChE de *Torpedo californica* possui o gorge (garganta) hidrofóbico, cerca de 20Å de profundidade. O substrato ACh tem orientações favoráveis na formação de estados de transição no fundo do gorge, conduzido principalmente pelo tríade catalítico: serina, histidina e glutamato. Embora o processo de hidrólise ocorra no fundo do gorge, a ligação inicial de ACh é concebida na borda exterior chamada de sítio aniônico periférico (SAP) contendo mais resíduos aromáticos do que aniônicos. Outros subsítios no fundo do gorge são de suma importância para o aumento da especificidade de ACh: bolso oxianion, bolso hidrofóbico (sítio de ligação acil), sítio cátion- π (sítio de ligação da colina) e sítio aniônico catalítico (tríade catalítico) como mostrados na **Figura 4** a seguir (LEGLER, 201; ZHOU, 2010).

Figura 4. Sítio ativo de AChE em humano (*HuAChE*) (PDBID1B41)

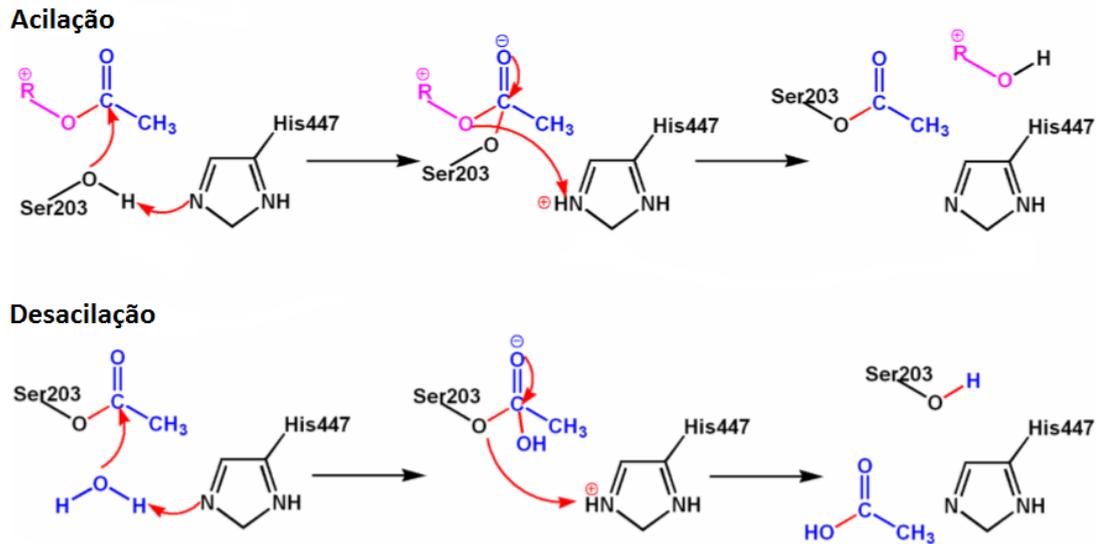


Fonte: Bennion, 2013.

SAP é descrito topograficamente para funcionar como um local de efeito alostérico de moléculas que modulam a atividade de esterase. Em *TcAChE*, consiste de ácidos carboxílicos e resíduos aromáticos de Asp72, Tyr70, Tyr121, Trp279, e Phe290, formando uma superfície de carga negativa que pode facilmente ligar-se a colina, acetilcolina e butirilcolina devido ao amônio quaternário (carga positiva) presente na estrutura, sugerindo um alinhamento do momento dipolo com o SAP que aumenta a taxa da constante de associação dos ligantes catiônicos, fortalecendo o campo eletrostático do sítio ativo. Esta aceleração tende a variar de acordo com a força iônica, o ligante catiônico e a espécie de AChE envolvida. Outro indício está na interação com o ligante, promovendo mudanças conformacionais nas regiões do sítio ativo que favorecem a catálise (HOUGHTON, 2006; SZEGLITES, 1998).

O bolso oxiânion está localizado entre o tríade catalítico e o sítio de ligação da colina, composto por Gly 121, Gly122 e Ala204. Quando o substrato se introduz no bolso hidrofóbico, os resíduos de N-H do bolso oxiânion estabilizam o oxigênio da carbonila (intermediário tetraédrico) por ligações de hidrogênio. Essa estabilidade contribui para a mudança na conformação do intermediário, aprofundando sua entrada no bolso hidrofóbico promovido pelo alinhamento com N-H. Paralelamente, outra contribuição para a ligação do grupo acil está na região de ligação da colina, onde o resíduo de triptofano pode formar uma carga positiva que repele o centro de rotação do substrato, saindo da posição vertical para a horizontal. Isto contribui para hipótese de que o grupo amônio quaternário do substrato já entra no bolso hidrofóbico em um determinado ângulo de ligação para adequar-se ao sítio de ligação do grupo acil. No bolso hidrofóbico de AChE, os anéis de Phe295 e Phe297 restringi o grau de liberdade do substrato ligado, que impede a reação do substrato se posicionado de forma errada, contribuindo pela seletividade da ACh. Por fim, o sítio aniônico catalítico constituído da triade Ser203, His447 e Glu334, localizado no fundo do desfiladeiro. É responsável pela catálise do substrato em etapas de acilação e desacilação (**Figura 5**), que apenas é possível pela estabilidade fornecida pelo bolso oxiânion e o sítio de ligação acil (LIANG, F).

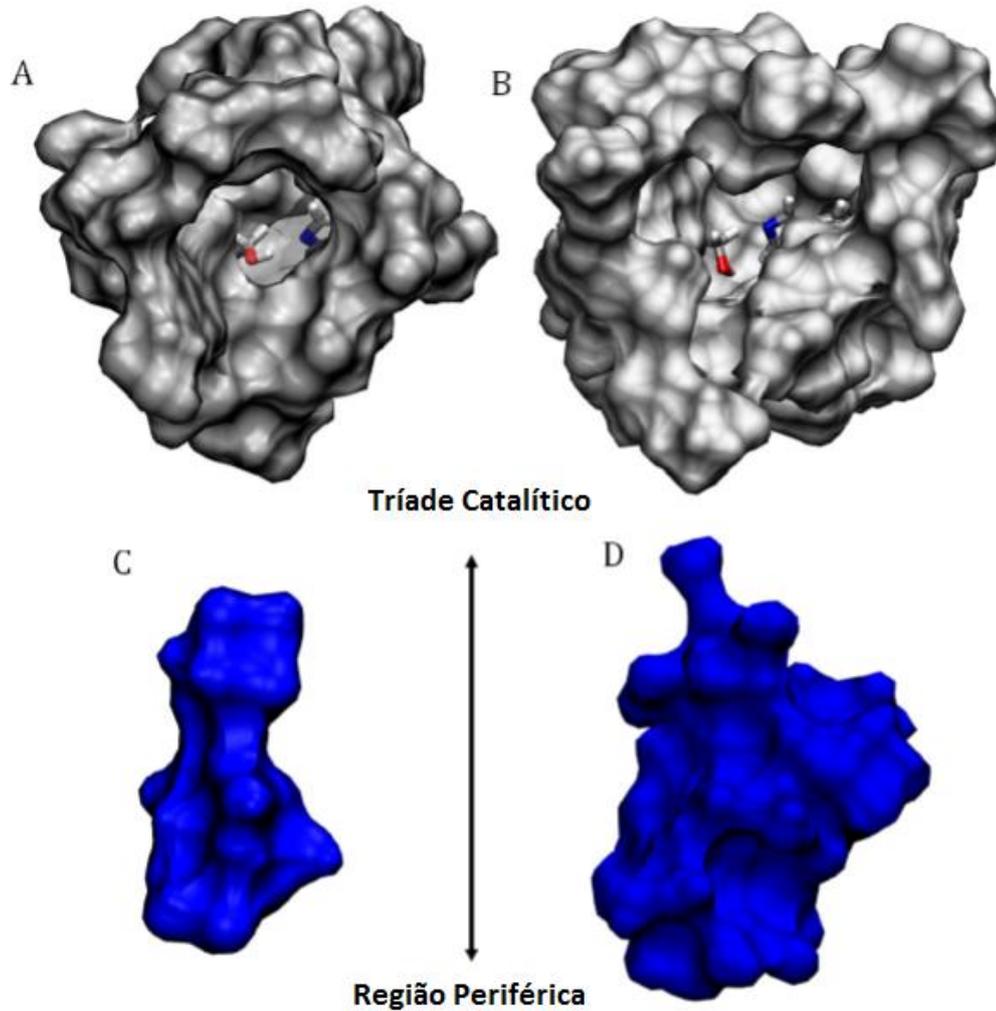
Figura 5. Mecanismo de reação da hidrólise de ACh em etapas de acilação e desacilação.



Fonte: Zhou, 2010

A comparação mais próxima para BuChE está na estrutura humana de BuChE (*HuBuChE*), paralelamente ao de *TcAChE* com a tríade catalítica que consiste em Ser198-His438-Glu325 e no buraco oxianion composto por Gly 116, Gly117 e Ala199 em BuChE. As principais diferenças residem no bolso hidrofóbico e o SAP. *TcAChE* contém Phe288 e Phe290, já em *HuBuChE* são substituídos por Leu286 e Val288 e estes resíduos alifáticos têm dimensões menores do que os resíduos aromáticos, de modo que o bolso hidrofóbico na BuChE tem um volume maior do que aquele em *TcAChE*. A outra grande diferença diz respeito ao SAP, os grupos aromáticos da *TcAChE*: Tyr70, Tyr121 e Trp279 são substituídos por resíduos alifáticos. Deste modo, pelo conceito de impedimento estérico, BuChE permite que os substratos maiores se liguem ao sítio ativo, podendo ser a razão pela qual BuChE pode hidrolisar a butirilcolina (substrato volumoso) e ACh (**Figura 6**). O papel da BuChE não está claro, tradicionalmente pensava-se que BuChE desempenhava pouca função na transmissão colinérgica, mas hoje sabe-se da capacidade de hidrolisar ésteres tóxicos tais como a cocaína, tendo um papel desintoxicante (HOUGHTON, 2006; LIANG, F).

Figura 6. Estrutura de AChE (A) e BuChE (B). AChE comporta até 24 moléculas de água correspondendo a um volume de aproximadamente de 276\AA^3 (C), enquanto BuChE comporta 47 moléculas de água que representam um volume de 541\AA^3 (D).



Fonte: Bennion, 2013

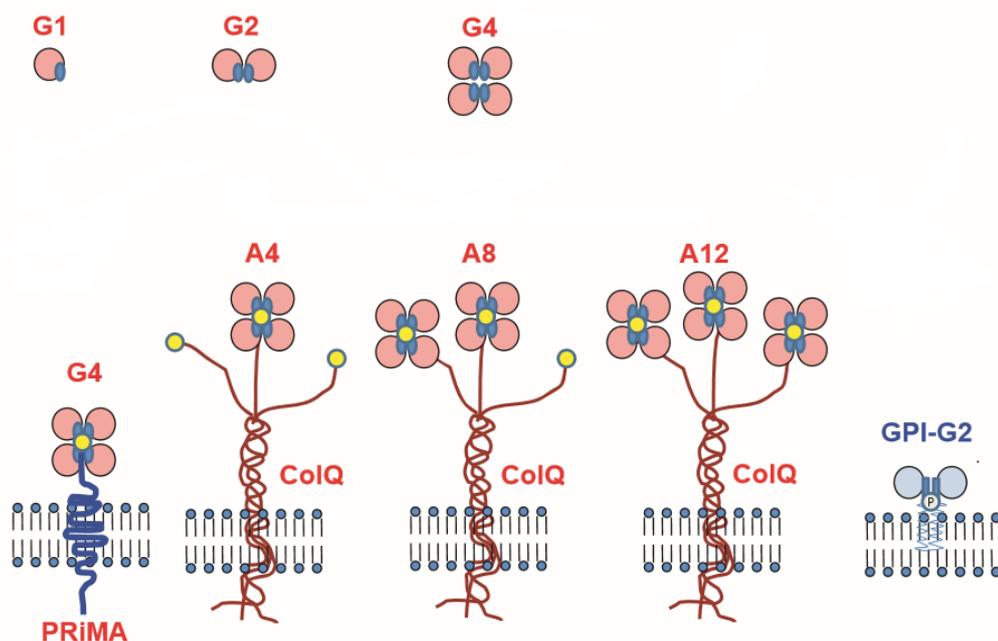
2.5 Isoformas, sequência e homologia

A abundância conhecida de AChE está em cérebro, músculo e membrana dos eritrócitos, enquanto que a BuChE tem maior atividade no fígado, intestino, coração, pulmão e rim. Ambas as enzimas são polimórficas e ocorrem em estados solúvel e ligada à membrana. Apresentam-se formas moleculares homólogas, possuindo características de estrutura quaternária e propriedades de interação,

apesar de serem produtos de diferentes genes nos cromossomos humanos (ADRESI, 2003; MASSOULIÉ, 2002).

As enzimas estão distribuídas em diferentes tecidos e em diferentes formas moleculares solúveis e anfifílicas, encontra-se formas hetero e homo-oligoméricas. Formas de cauda ligadas a colágeno e as moléculas globulares sem cauda, designados como forma G e A, respectivamente, no qual o subscrito indica o número de subunidades catalíticas, descrevendo moléculas de estrutura quaternária. A cauda contendo cerca de 50nm contém um, dois, ou três grupos de subunidades tetraméricas correspondente a 4, 8, e 12 sítios ativo (chamadas A4, A8 e A12), respectivamente (**Figura 7**). A existência dessas moléculas implica que há apenas interações fracas entre os próprios tetrâmeros: isso é consistente com a facilidade de sua liberação após a digestão da cauda de colágeno ligada. Diferentes formas de degradação podem produzir formas de cauda menos ativa (ADRESI, 2003).

Figura 7. Acima: formas solúveis (mono-, di- e tetramérica) de AChE (G1 e G2 anfifílicos, e G4 não anfifílico; respectivamente). Abaixo: formas ligadas à membrana de AChE são representadas pela forma G4 globular não anfifílico ancorada na membrana por meio da proteína rica em prolina (PRiMA) ou pela subunidade do colágeno Q. O último a direita representa uma forma dimérica hidrófoba (G2) de AChE ligado à membrana celular por meio de uma âncora de GPI.



Tetrâmeros de cauda hidrofóbica ancorados a membrana plasmática por uma subunidade do polipeptídeo são abundantes para AChE no SNC de mamíferos. O dímero anfifílico do tipo I ancorado a membrana plasmática por glicofosfatidilinositol (GPI) é encontrado em músculo de mamíferos, eritrócitos e linfócitos, abundante na forma de AChE. Já os dímeros e monômeros anfifílicos do tipo II diferenciado do tipo I por desprover da âncora de glicolípido, são encontrados em cérebro de mamífero, músculo e intestino tanto para AChE quanto BuChE, ambos os tipos são apenas solubilizados por detergentes. Também existem outras formas assimétricas com cauda ligado a colágeno ancorado a lâmina basal, formado pela estrutura helicoidal tripla de três subunidades de colágeno Q, sendo mais abundantes para AChE do que BuChE nas junções neuromusculares (ADRESI, 2003).

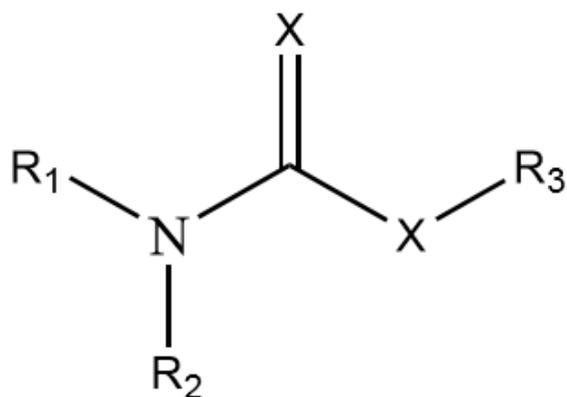
2.6 Inibidores de ChE

Os inibidores de ChE podem ser divididos em dois grupos: irreversível e reversível. Os inibidores reversíveis, competitivos e não competitivos, normalmente envolvem aplicações terapêuticas, enquanto os irreversíveis estão associados aos estudos de efeitos tóxicos mais severos, ambas contribuem para caracterização de ChE's em estudos de purificação. Os carbamatos e organofosforados são os inibidores mais utilizados para AChE, ambos provocam efeitos tóxicos agudos semelhantes e sintomas derivados e envenenamento. A principal diferença está na estabilidade do complexo formado (AChE-carbamato/AChE-organofosforado). Organofosforados são capazes de fosforilar o resíduo de serina em AChE de forma irreversível, enquanto a serina carbamylada tem menor estabilidade, pois o radical carbamyl formado pode ser separado de AChE por hidrólise espontânea com tempo de descarboxilação entre 30 a 40 minutos (COLOVIC, 2013).

Os carbamatos são os compostos orgânicos derivados de ácido carbâmico (NH_2OH). A estrutura de carbamatos biologicamente ativos é apresentada na **Figura 8**, em que X pode ser oxigênio ou enxofre (tiocarbamato), R_1 e R_2 são geralmente substituintes orgânicos ou alquil, mas R_1 ou R_2 podem também ser hidrogênio, e R_3 é principalmente um substituinte orgânico ou um metal. Em adição à sua utilização como drogas terapêuticas em medicina humana (Doença de Alzheimer (DA),

miastenia grave, glaucoma, corpos de Lewy, doença de Parkinson), estes inibidores de AChE reversíveis têm sido aplicados também como pesticidas (COLOVIC, 2013).

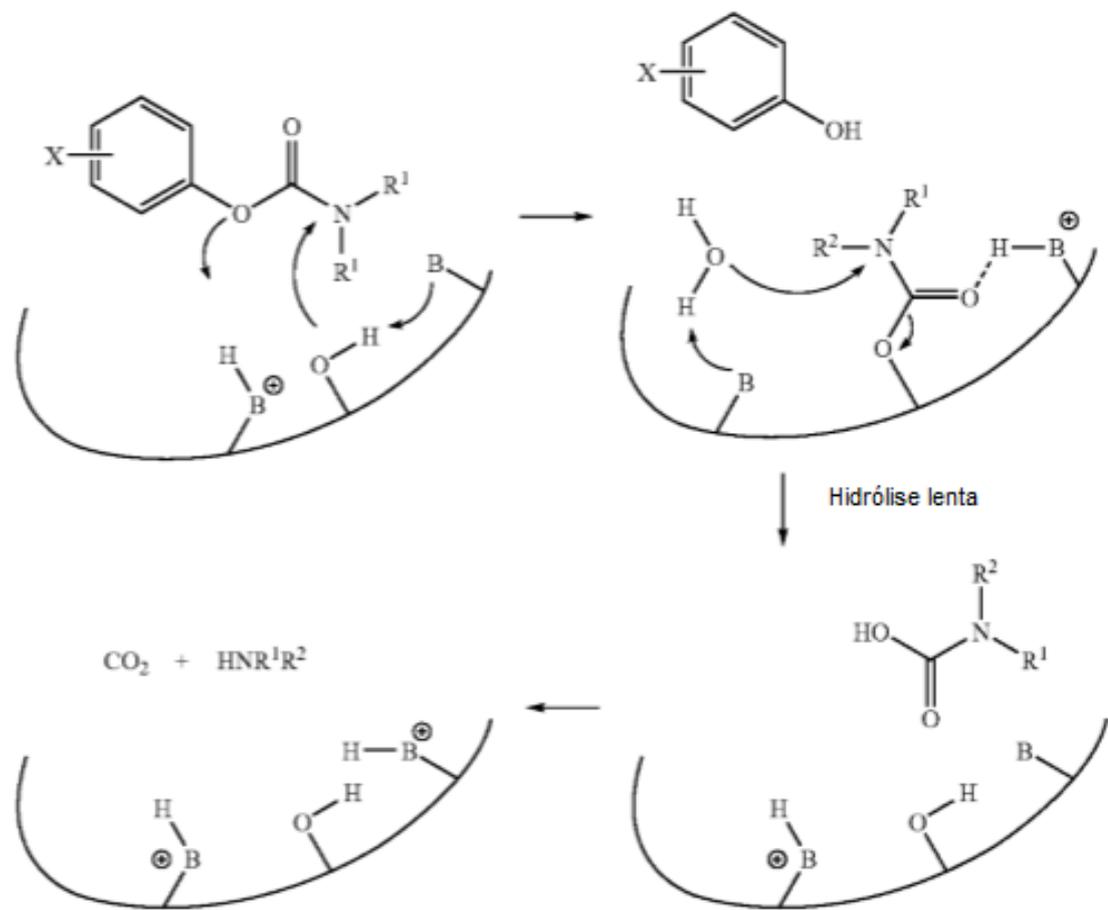
Figura 8. Fórmula estrutural geral de carbamatos.



Fonte: Colovic, 2013

No mecanismo de reação para carbamato ligado covalentemente ao sítio ativo de AChE (**Figura 9**) inicia-se pelo ataque nucleofílico da serina de AChE na amina terciária da molécula de carbamato, favorecida pela de desprotonação da serina. O complexo formado é lentamente hidrolisado para reconstituir a enzima ativa. Durante este processo, um ácido carbâmico é liberado que, por sua vez se dissocia em dióxido de carbono e uma amina. Em stigminas, esta amina é uma pequena molécula que é considerada farmacologicamente inativa (DU, S. Et al. 2010).

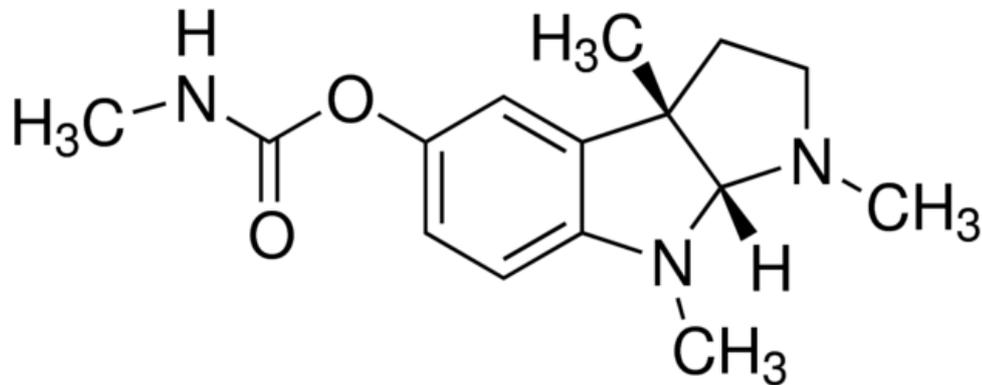
Figura 9. Mecanismo esquemático da ação de carbamatos como inibidores ChE.



Fonte: Du, 2010

A fisostigmina (**Figura 10**), também conhecido como carbamato de Eserina, foi o primeiro inibidor da AChE investigado para o tratamento da DA. O composto é isolado das sementes de *Physostigma venenosum* como um alcalóide vegetal, embora seja capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, ela tem uma meia-vida curta e um estreito índice terapêutico. Experimentos com Eserina comprovaram efeitos similares de características não específicas em AChE e BuChE (MARQUES, L. A. et al., 2011; MOHAMED, M. A. et al., 2016).

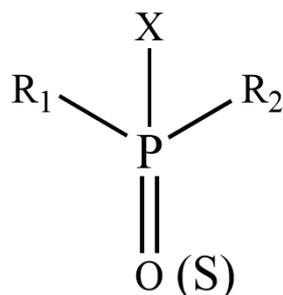
Figura 10. Molécula de Fisostigmina, primeiro composto anticolinesterásico utilizado em DA.



Fonte: Sigma-aldrich

Os organofosforados tem efeitos mais severos do que os carbamatos, devido a propriedades de interação e ligações químicas mais efetivas. A estrutura química dos organofosforados mostrada na **Figura 11**, estão ligados ao átomo de fósforo, os grupos R_1 e R_2 que podem ser, aril ou grupos alquil. Em alguns casos, R_1 está ligado diretamente ao átomo de fósforo e R_2 está ligado a um átomo de oxigênio ou enxofre (formando fosfonatos ou tiofosfonatos). Em fosforamidatos, pelo menos, um destes grupos é $-NH_2$, e o átomo de ligação dupla com o fósforo é oxigênio ou enxofre. O grupo $-X$, é um bom grupo abandonador quando hidrolisado pela interação com a enzima, também pode pertencer a grupos halogêneos, grupos alifáticos, aromáticos ou heterocíclicos (COLOVIC, 2013).

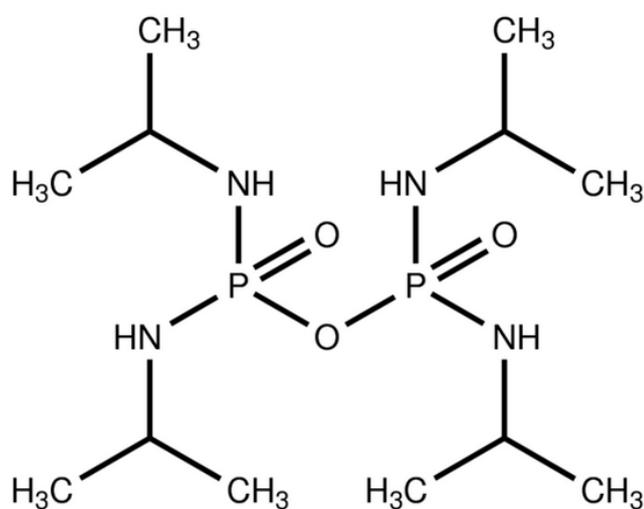
Figura 11. Fórmula Estrutural geral de organofosforados



Fonte: Colovic, 2013

Da classe do organofosforados, a **Figura 12** apresenta o composto orgânico Iso-OMPA (Tetraisopropilpirofosforamida), um dos mais utilizados para caracterização de ChE, pois tem alta especificidade para BuChE, principalmente em BuChE humano (MOHAMED, M. A. et. al. 2016).

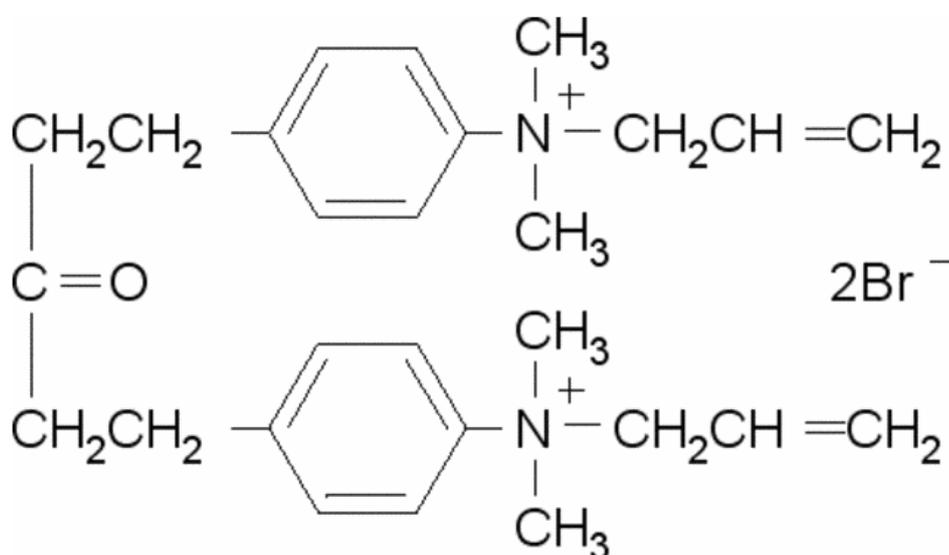
Figura 12. Molécula de Iso-OMPA (Tetraisopropil pirofosfoforamida), inibidor específico de BuChE.



Fonte: Sigma-aldrich

Outra classe de inibidores de ChE são os ambenônios, compostos quaternários de amônia. A **Figura 13** apresenta o composto orgânico BW 284c51 (1,5-Bis(4-alildimetilamôniofenil)3-pentanona dibrometo), um potente específico inibidor de AChE.

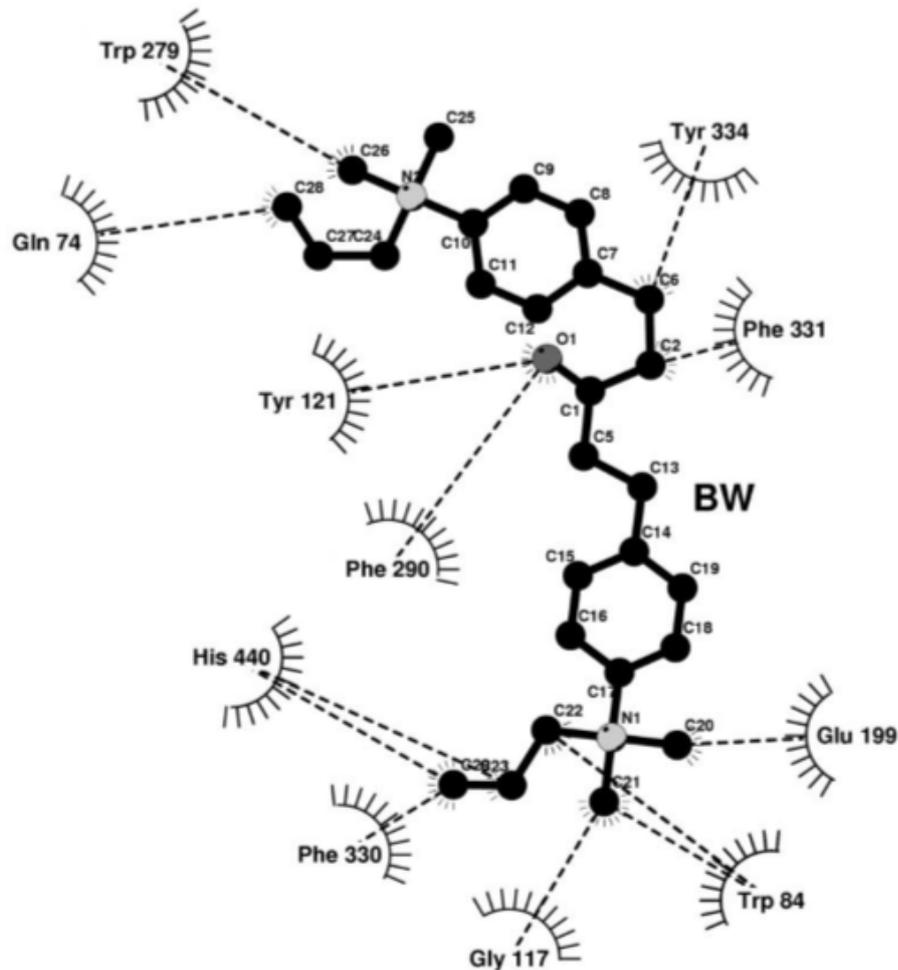
Figura 13. Molécula de BW 284c51, inibidor específico de AChE.



Fonte: Sigma-aldrich

O complexo formado AChE-BW 284c51 dentro da garganta do sítio ativo de TcAChE apresentado na **Figura 14** mostra a quantidade de interações formadas. No topo do sítio ativo o grupo quaternário do inibidor forma interação com Trp279 e outra aromática com Tyr334. Na parte mediana do sítio há ligações de hidrogênio fracas entre a carbonila da molécula e a hidroxila de Tyr121, bem como interação alquil e Phe331, grupamento alilo e Gln74. Na parte inferior do sítio ativo predominam as interações aromático-aromático entre anel fenil de BW 284c51 e His440, cátion-aromático entre grupo quaternário de Trp84; bem como também interações estrostatísticas entre o mesmo grupo quaternário e Glu199, enquanto o grupo alil faz interação hidrofóbica com Phe330 (FELDER, C. E. et. al. 2002).

Figura 14. Esquema de interações entre BW 284c51 e resíduos adjacentes (ausência de água) no interior do sítio ativo de *TcAChE*.



Fonte: Felder, 2002

2.7 Purificação de AChE

Purificação de AChE é alvo de estudo para muitos grupos de pesquisa utilizando diferentes técnicas de purificação. O isolamento da enzima através da ruptura da membrana celular, precipitação salina e cromatografia, devem ser cuidadosamente controladas em todo o processo de purificação: pH e força iônica, através da escolha de tampões adequados durante todas as etapas; temperatura e tempo de armazenamento, sobre condições de aclimação da amostra proteica tendo conhecimento sobre estabilidade estrutural e térmica da AChE estudada. O protocolo de purificação varia de acordo com propriedades químicas e físicas de AChE (tamanho, carga, hidrofobicidade, solubilidade). Para cada fonte de AChE estudada é observado solubilidades diferentes para sulfato de amônio. Yang, Y et al. (2013)

isolou maior atividade AChE de zooplâncton em fracionamento 60-100%, já Ding, Y. et al. (2011) trabalhou em fracionamento de 35-50% para cérebro do peixe Tilápia, para nematóide de *Heterorhabditis bacteriophora*, Mohamed, M. A et al (2016) teve melhor aproveitamento em fração 80-100%. Esta etapa tem vantagem na possibilidade de refinamento, pois isola parcialmente materiais biológicos com propriedades de solubilidade similares, agrupando de maneira geral as isoformas de colinesterases presentes no extrato bruto.

A técnica mais refinada para o protocolo de purificação para AChE, é sem dúvida a cromatografia líquida, no qual ultimamente, colunas de afinidade, troca iônica e gel filtração tem sido utilizadas em combinação para obtenção de maior pureza de AChE de diferentes fontes. O bio reconhecimento de grupos específicos em colunas de afinidade tem alta eficiência na purificação a partir de interações químicas fracas. Jin Q. H. et al. (2002) isolou AChE de fibroblasto do pulmão humano com cromatografia de afinidade utilizando procainamida, tacrina, metilaminofelinalimina e metilacridina específica com anticorpos purificados acoplados a CNBr-sepharose. AChE foi retida na coluna de afinidade e eluída com o ligante procainamida que em seguida foi separado por cromatografia de troca aniônica através de interações adsorptivas na matriz carregada, neste caso, positivamente. Em outro estudo (Askar, K. A. et al. 2011) AChE foi purificada a partir de fígado de ovelha utilizando duas etapas de cromatografia de afinidade com colunas de concanavalina A-sepharose 4B e endrônio Sepharose 6B. O isolamento seletivo, explora as propriedades biológicas de especificidade e reversibilidade de AChE, no entanto, apesar de boa resolução, são métodos mais caros e havendo possibilidade de mudanças conformacionais e até inibição irreversível da enzima.

Combinações de cromatografia de gel filtração (separação por tamanho) e troca iônica também são muito utilizados em purificação de AChE. Sagane, Y. et al. (2005) purificou AChE a partir de sementes de milho aplicando extrato bruto em coluna sephadex G-200, a fração ativa foi aplicada em coluna Poros HQ/20 (troca aniônica) em seguida em uma coluna de troca catiônica Poros HS/20, finalizando em coluna de gel filtração Hiload Superdex 200pg. Também na sequência de colunas de gel filtração e troca aniônica foi desenvolvida por Mohamed, M. A et al (2016) um protocolo no qual obteve dois picos com alta atividade AChE a partir de nematóide *Heterorhabditis bacteriophora* com apenas uma etapa cromatográfica de gel filtração Sephacryl S-200, coluna de alta resolução para proteínas de tamanho médio. Cada pico aplicado

isoladamente em DEAE-sepharose (troca aniônica) resultou em dois picos, um de alta atividade AChE e outro equivalente a pouco mais de 10% da atividade deste, obtendo fator de purificação e recuperação de até 17,5 e 49,4%, respectivamente. Este método proposto é atrativo para pesquisadores com interesse na separação de isoformas ChE (AChE e BuChE, por exemplo).

Em geral, o protocolo de purificação adotado deve considerar os fatores de capacidade, velocidade, resolução e recuperação. A fonte de AChE deve passar por etapas escolhidas estrategicamente para suportar a quantidade de material biológico, afim de evitar perdas em cada etapa de purificação (capacidade). Especialmente para isoformas mais instáveis, a velocidade do processo é outra via de interesse para AChE, pois mesmo com o armazenamento adequado, observa-se queda na atividade ChE, possivelmente relacionado com a perda da integridade estrutural. A escolha da coluna ou da combinação delas, envolve a separação mais eficiente que implica em uma boa resolução, eluindo a isoforma em um número menor de frações coletadas. É de suma importância a recuperação da atividade no final da purificação, pois mostra a viabilidade do método proposto para diferentes aplicações biotecnológicas.

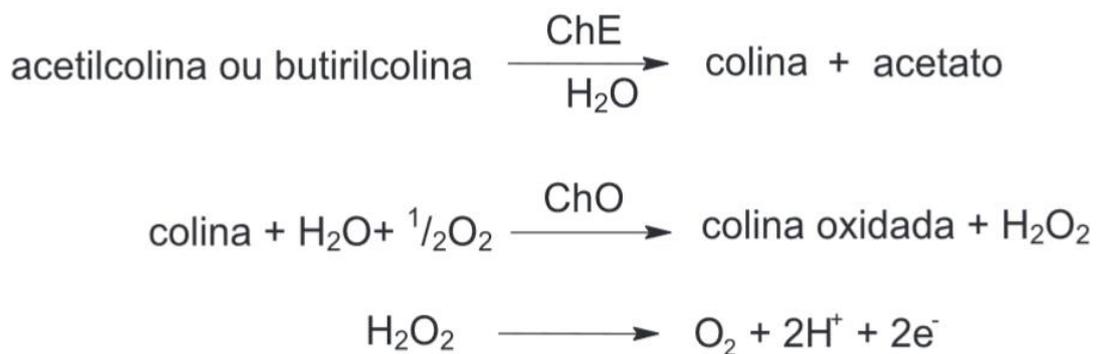
2.8 Aplicação de ChE em biossensores

Nas últimas duas décadas, a pesquisa no campo dos biossensores baseados nos mecanismos de inibição de enzimas ChE vem sendo muito empregado, pois são sistemas rápidos, seletivos, sensíveis, de fácil uso, com tempo de resposta bastante curto e necessitando de mínimo de tratamento de amostra, além das possibilidades de efetuar análises quantitativas e qualitativas em tempo real (ADREESCU, 2006). A metodologia possui possibilidades de automação e miniaturização. Como suportes, estes arranjos de sensores tem utilizado grafite, carbono, carbono vítreo, pasta de carbono, nanotubos de carbono, além de metais nobres, como o ouro, entre outros (MARQUES, 2008). O processo de desenvolvimento das metodologias atualmente aplicadas, passaram por três gerações de biossensores para a obtenção de métodos mais modernos desde a imobilização de ChE até a regeneração da sua atividade catalítica.

A primeira geração de biossensores de colinesterases empregava sensores amperométricos bi-enzimáticos baseados em colinesterase e colina oxidase (ChO).

Inicialmente, a enzima ChE hidrolisa o substrato ACh, então a segunda enzima, colina oxidase, era usada para produzir peróxido de hidrogênio, que é facilmente detectado por amperometria (+650mV versus Ag/AgCl). A problemática envolvida no processo é que os potenciais de estudo aplicados são muito elevados, o que torna este tipo de biossensor muito sujeito à interferência de outras espécies eletroativas indesejadas, que possam estar presentes no meio. O segundo processo envolvia o uso do eletrodo de Clark para medir o consumo de oxigênio na reação catalisada pela ChO de acordo com a **Reação 1** a seguir:

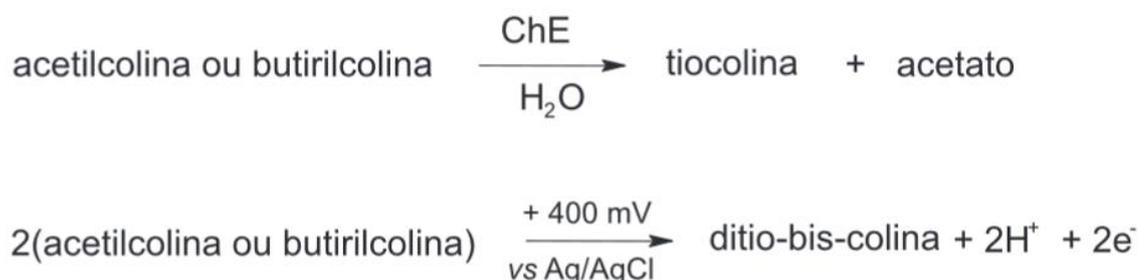
Reação 1



Fonte: Marques, 2008.

A segunda geração de biossensores à base de colinesterases empregava apenas uma enzima imobilizada e fazia uso de substratos não específicos, baseando-se na direta detecção da tiocolina produzida no meio reacional, pela técnica de amperometria (**Reação 2**). Neste tipo de arranjo, o uso de apenas uma enzima facilita a construção e o desenho do biossensor, além de que o potencial de trabalho aplicado é mais baixo, em torno de 450mV, comparado com aquele aplicado para o peróxido de hidrogênio, minimizando assim, efeitos de interferentes.

Reação 2



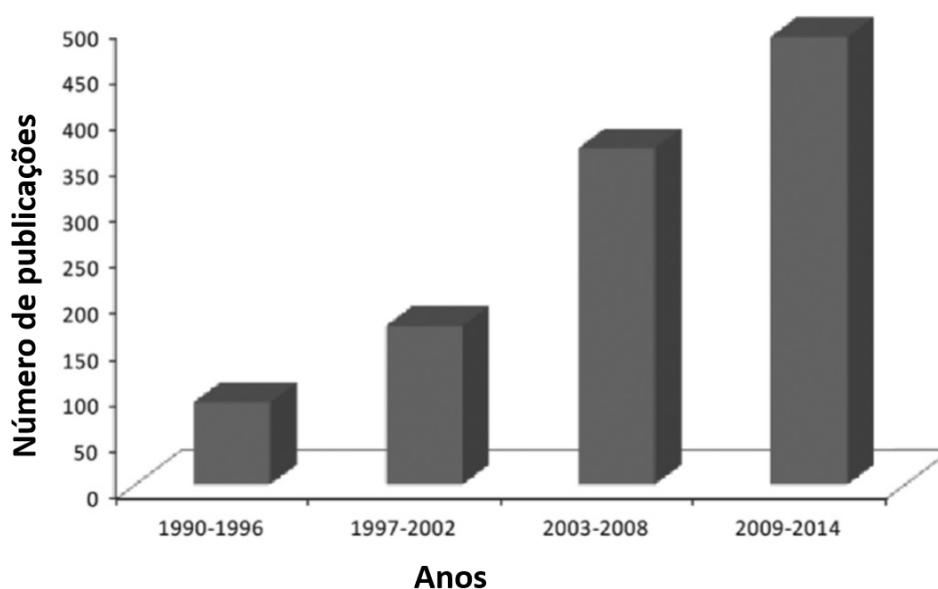
Fonte: Marques, 2008.

Já na terceira geração faz uso de mediadores eletroquímicos levando a um melhoramento significativo na versatilidade de construção destes sistemas, visto que o potencial de trabalho passou então a ser função deste mediador são menos susceptíveis a interferentes, pois o potencial de oxidação aplicado é menor. Os mediadores são imobilizados na superfície do eletrodo, na mesma matriz que a enzima que será inibida, ou em matriz diferente, objetivando uma rápida transferência eletrônica (MARQUES, 2008).

Os sistemas recentes fazem uso da transferência eletrônica direta do sítio catalítico da enzima para com o eletrodo, sendo este próprio eletrodo o mediador do processo eletroanalítico. Estas configurações de biossensores baseados no processo de inibição de enzimas colinesterases vem sendo estudadas ao longo das duas últimas décadas, com variações nos mediadores utilizados, bem como nos substratos relativos a enzimas colinesterases. Também tem aumentado o interesse de biossensores a base de nanomateriais. Diferentes nanomateriais tem sido utilizados na preparação de biossensores enzimáticos, sem dúvida os NTCs são os mais empregados. A vantagem no uso de NTCs foi estabelecido pela detecção do produto da tiocolina em um menor potencial de aproximadamente +150 mV comparado com o sistema sem NTC de +750mV, beneficiando a análise evitando interferentes de espécies eletroativas (ZHANG, 2014; LIU, 2006).

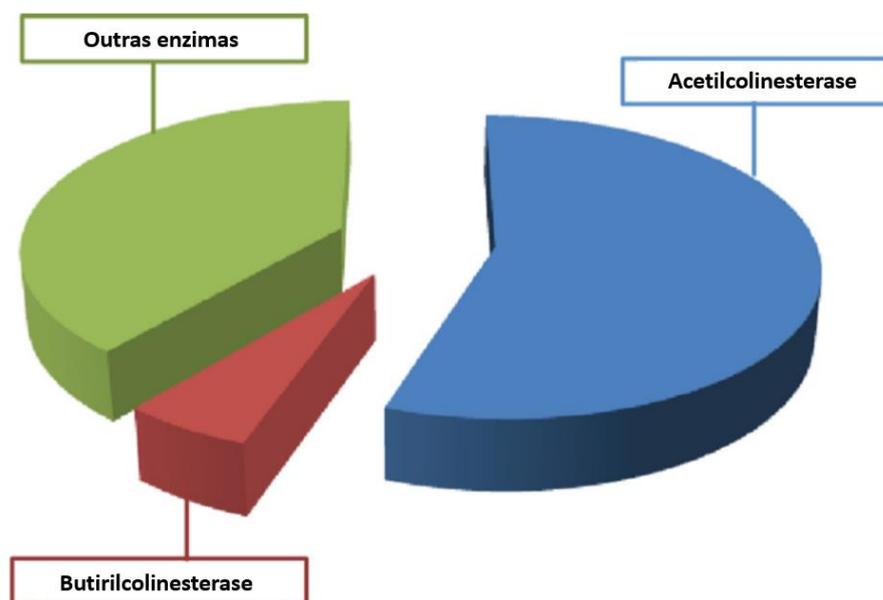
O tipo de transdutor, bem como a metodologia de detecção a ser empregada na construção destes sensores à base de colinesterases possuem dependência da escolha do substrato, do sistema enzimático e da aplicação final deste sistema, que está associada, na sua grande maioria, à detecção de pesticidas organofosforados e carbamatos e de metais pesados, tanto na área ambiental, quanto na de alimentos. Estes poluentes/contaminantes tem sido detectados em baixos limites, em distintas matrizes, tais como águas naturais (rio, mar, oceano, lagos), água de abastecimento, sedimentos, solos, além de diversos vegetais e alimentos. Áreas como a saúde e militar são também potenciais de aplicação destes biossensores. Devido as diversas aplicações, houve um grande aumento no número de publicações desde a década de 1990 até 2014 com tema de biossensores a base de inibição enzimática (**Figura 15**), no qual a maior parcela do design destes biossensores são a base de ChE (**Figura 16**) (Amine, 2016).

Figura 15. Número de papers publicados durante o período de 1990 a 2014. Dados obtidos por pesquisa de papers utilizando como palavras-chave “biosensors” and “enzyme” and “inhibition” no banco de dados de Web of knowledge, Thomson Reuters and Scopus.



Fonte: Amine, 2016.

Figura 16. Distribuição de enzimas usadas em design de biosensores baseados em inibição.



Fonte: Amine, 2016

Existem limitações para o uso de pesticidas organofosforados, pois bloqueiam a serina no sítio ativo das enzimas colinesterases, através de ataque nucleofílico. Dentro deste contexto, estudos tem buscado a regeneração deste material biológico imobilizado na superfície do transdutor, visando uma maior versatilidade destes sistemas, efetivando a possibilidade de várias detecções em um único dispositivo. Para a reativação da atividade catalítica da AChE, estudos com fluoreto de sódio e oximas [2-aldoxima metiliodeto piridina (2-PAM) e 4-formilpiridinium dioxima brometo (TMB-4)] tem sido efetuados, obetendo-se até 60% de regeneração da atividade enzimática inicial. O uso de agentes quelantes, como o EDTA, também podem regenerar a atividade catalítica de ChE (MARQUES, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Purificar e caracterizar acetilcolinesterase de cérebro de *P. brevis* e avaliar o emprego desta preparação purificada em testes eletroquímicos para biossensores.

3.2 Objetivos específicos

Caracterizar a atividade colinesterásica presente no extrato de cérebro de *P. brevis* quanto a temperatura, pH e força iônica.

Desenvolver um protocolo para purificação de colinesterase de *P. brevis*.

Caracterizar a preparação purificada de colinesterase por eletroforese e frente a inibidores específicos.

Avaliar a estabilidade e atividade da preparação de colinesterase purificada por testes eletroquímicos.

4. METODOLOGIA

4.1 Preparo do extrato livre de células

Os exemplares da espécie *Prochilodus brevis* (Curimatã) foram coletados na piscicultura da CHESF (Companhia Hidroelétrica do São Francisco) em Paulo Afonso – BA. Os cérebros foram extraídos e armazenados em tubos, imediatamente imersos em nitrogênio líquido e em seguida congelados no freezer até o preparo do extrato bruto.

Os cérebros foram pesados e macerados em cadinho com tampão de suspensão (Tris-HCl 20mM, pH 7,5 em Triton 0,1%) na proporção de 80 mg/mL seguido de homogeneização em homogenizador de vidro. O extrato bruto foi submetido a 5 ciclos em aparelho de ultrassom (Fisher Scientific Sonic Dismembrator Model 100) por 15 segundos cada ciclo, com intervalos de 15 segundos em banho de gelo. Durante 20 minutos à 4°C o material foi centrifugado (Sigma 3k30) a 10.000 r.p.m.. O sobrenadante (extrato livre de células) foi coletado e armazenado a 4°C até a etapa de precipitação salina.

4.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteína foi determinada segundo método de Bradford *et al* (1976). No preparo do reagente de Bradford, dissolveu-se 102,4 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%, a solução foi agitada durante 60 minutos, seguido de adição de 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução obtida completou-se para 1 L com água deionizada e manteve-se sobre agitação durante 10 minutos. Após duas filtrações em papel de filtro, o reagente de Bradford foi armazenado protegido da luz. A curva de calibração de proteínas foi construída empregando-se albumina de soro bovino (1mg/mL) como padrão na faixa de concentração de 5µg/100µL à 55µg/100µL. Adicionou-se 2500µL de reagente de Bradford em cubeta de 3 mL, seguido de 100µL de solução padrão de albumina, incubando por 5 minutos. A leitura de absorvância a 595 nm foi determinada em espectrofotômetro, utilizando 100 µL água em lugar de solução padrão para referência.

4.3 Atividade Enzimática

A atividade das enzimas AChE e BuChE foram determinadas segundo o método de Ellman *et al.* (1961). A mistura reacional na cubeta continha: 93mM de tampão fosfato de potássio (K₂HPO₄) 0,1M, pH 8,0; 100 µL de amostra diluída em tampão de suspensão; 3,3 mM de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,01M; 0,5mM dos substratos, iodeto de acetiltiocolina (ATCh) para atividade ChE e iodeto de butiriltiocolina (BTCh) para atividade BChE, 0,075M. As leituras de absorbância foram lidas à 412 nm utilizando espectrofotômetro UV/VIS (Specord 200 Plus) por um período de 5 minutos. Atividade enzimática foi expressa em µmol de substrato hidrolisado por minuto(µmol.min⁻¹.mL⁻¹) e calculada conforme a **Equação 1**.

Equação 1:

$$U / mL = \frac{\Delta A / \Delta t}{\varepsilon} \times \frac{V}{Ve/D}$$

Onde:

V é o volume total da mistura reacional (V = 3 mL), **ΔA/Δt** é a inclinação da reta; **ε** é o coeficiente de extinção molar do DTNB (ε = 14,15 mM⁻¹.cm⁻¹), **Ve** é o volume do extrato enzimático e **D** é a diluição do extrato.

4.4 Caracterização do extrato livre de células

Testou-se gradientes de pH, força iônica e temperatura do extrato livre de células nas condições reacionais descritas no item 4.3, com variações na concentração do tampão fosfato de potássio de 0,01; 0,03; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,1; 0,25; 0,35 M; no pH de 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0. Para a determinação da temperatura ótima, o meio contendo tampão fosfato de potássio e extrato livre de células foi mantido durante 10 minutos nas temperaturas: 20, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46 °C; em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro. O

mesmo procedimento foi realizado para determinação da estabilidade térmica, no entanto a variação de temperatura foi aplicada ao extrato livre de células e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos antes da mensuração da atividade.

4.5 Inibição enzimática

Para o ensaio de inibição de ChE foram utilizados inibidores específicos de AChE (BW284c51), BuChE (Iso-OMPA) e um inibidor intermediário para as duas enzimas (Eserina). O ensaio de inibição enzimática foi realizado pelo método de Ellman et al. (1961) como descrito no item 4.4, com algumas modificações: 2760 μL de tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4) 0,1 M, pH 8,0; 100 μL de cada extrato diluído em tampão de suspensão; 20 μL da solução inibidora nas concentrações 0,3, 0,7 e 1,0 μM ; a mistura reacional foi incubada durante 20 minutos. Em seguida foram adicionados 100 μL de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,1 M, 20 μL dos substratos, iodeto de acetilcolina (AcSCh). As leituras de absorvância foram lidas no comprimento de onda de 412 nm por um período de 5 minutos.

4.6 Precipitação Salina

Após o preparo do extrato livre de células mediu-se o volume da amostra para adição de sulfato de amônio de acordo com a **Tabela 1**:

Tabela 1. Quantidade de sulfato de amônio para precipitação da proteína.

Initial concentration of ammonium sulfate	Percentage saturation at 0°																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Solid ammonium sulfate (grams) to be added to 1 liter of solution																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

Fonte: Wenk, 2007.

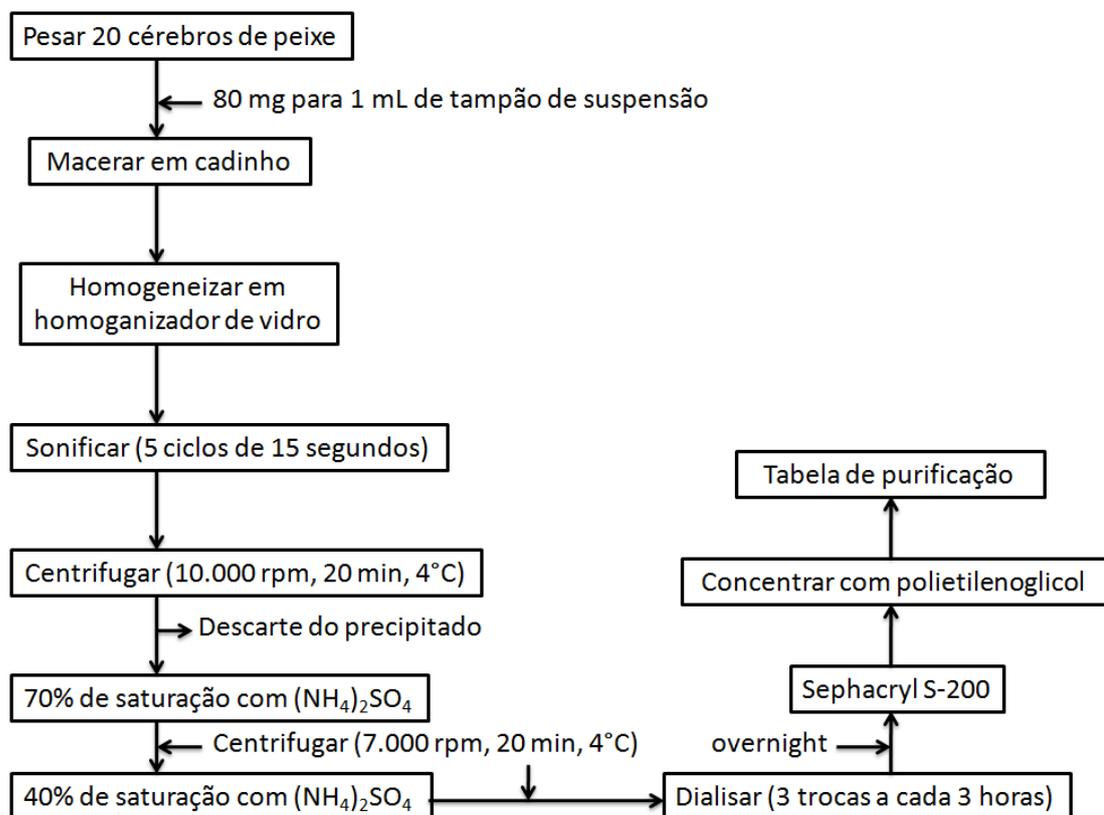
Foi adicionado sulfato de amônio em quantidade proporcional ao fracionamento de 0-70%. O sal foi adicionado lentamente na amostra em banho de gelo até a solubilização, seguido de agitação em banho de gelo por 3 horas. Durante 20 minutos a amostra foi centrifugada a 7.000 r.p.m. e temperatura de 4°C. O precipitado foi diluído em tampão de suspensão e o sobrenadante (fração 70-100%) foi armazenado. A amostra de 0-70% foi submetida novamente ao mesmo procedimento para um fracionamento subsequente de 0-40%. No sobrenadante adicionou-se sal novamente para adquirir a fração 40-80% e o sobrenadante coletado 80-100%. A fração 0-40% foi inserida na membrana de diálise, a amostra foi dialisada em 2 litros de tampão de suspensão. O tampão foi trocado três vezes a cada 3 horas e a última troca foi mantido overnight.

4.7 Protocolo de purificação 1

4.7.1 Cromatografia de Filtração em Gel (Sephacryl S-200)

A coluna cromatográfica foi empacotada com a resina sephacryl S-200 e lavada com 3 volumes de coluna de água deionizada (18 MΩ cm). Equilibrou-se com 3 volumes de coluna de Tris-HCl 20mM em Triton x100 (0,1%), NaCl 0,25M a uma taxa de fluxo de 0,28 mL/min. Carregou-se a coluna com 1000 µL (4% do volume da resina; $V_{resina} = 25$ mL) de amostra dialisada do fracionamento salino de 0-40%. As proteínas foram identificadas por absorção a 280nm. Cada tubo coletou 2,5 mL, totalizando 40 tubos mantidos em banho de gelo. A seguir o fluxograma do protocolo de purificação 1 (**Figura 17**).

Figura 17. Fluxograma do protocolo de purificação 1



Fonte: Autor, 2016.

4.8 Protocolo de purificação 2

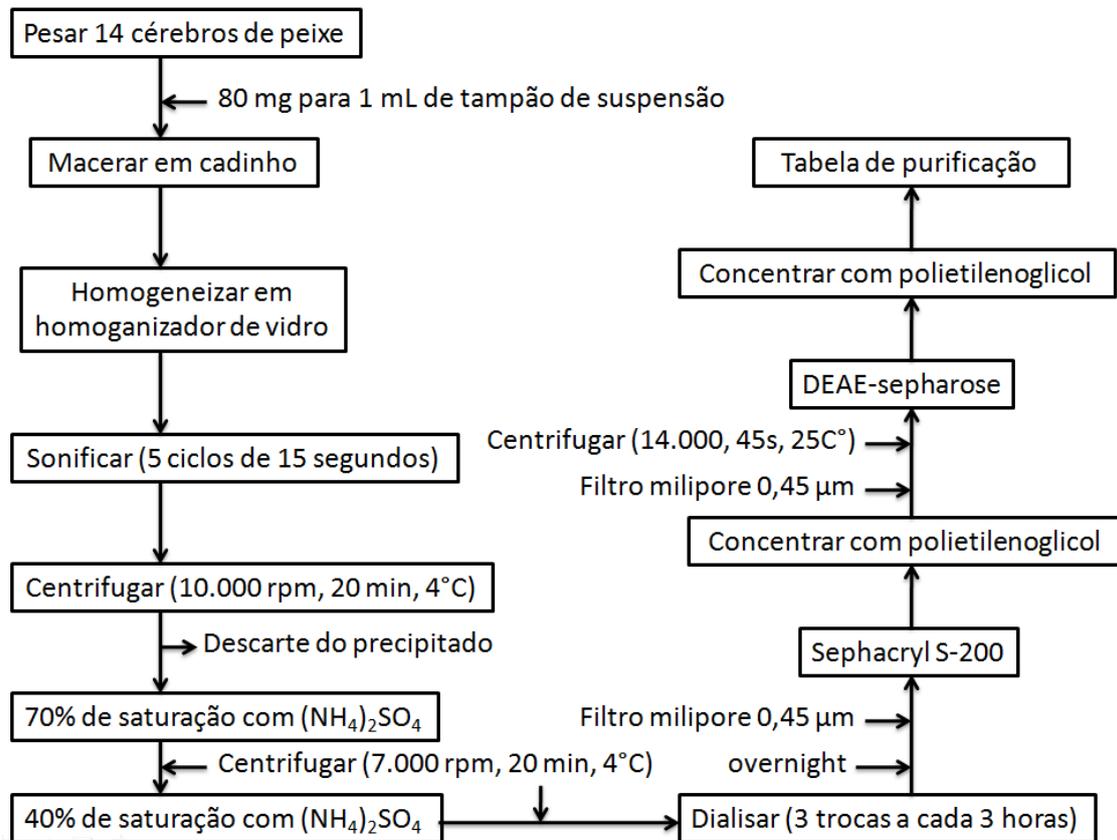
4.8.1 Cromatografia de Filtração em Gel (Sephacryl S-200)

A coluna cromatográfica foi empacotada com a resina sephacryl S-200 e lavada com 3 volumes de coluna de água deionizada (18 MΩ cm). Equilibrou-se com 3 volumes de coluna de Tris-HCl 20mM em Triton x100 (0,1%), NaCl 0,3M a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min. Carregou-se a coluna com 700 µL (4,05% do volume da resina; $V_{resina} = 17,27$ mL) da amostra dialisada de 0-40%, previamente filtrada em filtro milipore 0,45µm antes da injeção. As proteínas foram identificadas por absorção a 280nm. Cada tubo coletou 3 mL, totalizando 55 tubos mantidos em banho de gelo.

4.8.2 Cromatografia de Troca Iônica (DEAE-Sepharose)

A coluna cromatográfica foi empacotada com a resina DEAE-Sepharose e lavada com 3 volumes de coluna de água deionizada (18 MΩ cm). Equilibrou-se com 3 volumes de coluna de Tampão A (Tris-HCl 20mM em Triton x100 (0,1%)) a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min. Carregou-se a coluna com 5 mL (8,84% do volume da resina; $V_{resina} = 56,52$ mL) de amostra dialisada de 0-40%, previamente filtrada em filtro milipore 0,45µm. Ao início da corrida cromatográfica foi aplicado gradativamente o Tampão B (Tris-HCl 20mM em Triton x100 (0,1%), NaCl 0,5M). As proteínas foram identificadas por absorção a 280nm. Cada tubo coletou 3 mL, totalizando 55 tubos mantidos em banho de gelo. A seguir o fluxograma do protocolo de purificação 2 (**Figura 18**).

Figura 18. Fluxograma do protocolo de purificação 2



Fonte: Autor, 2016.

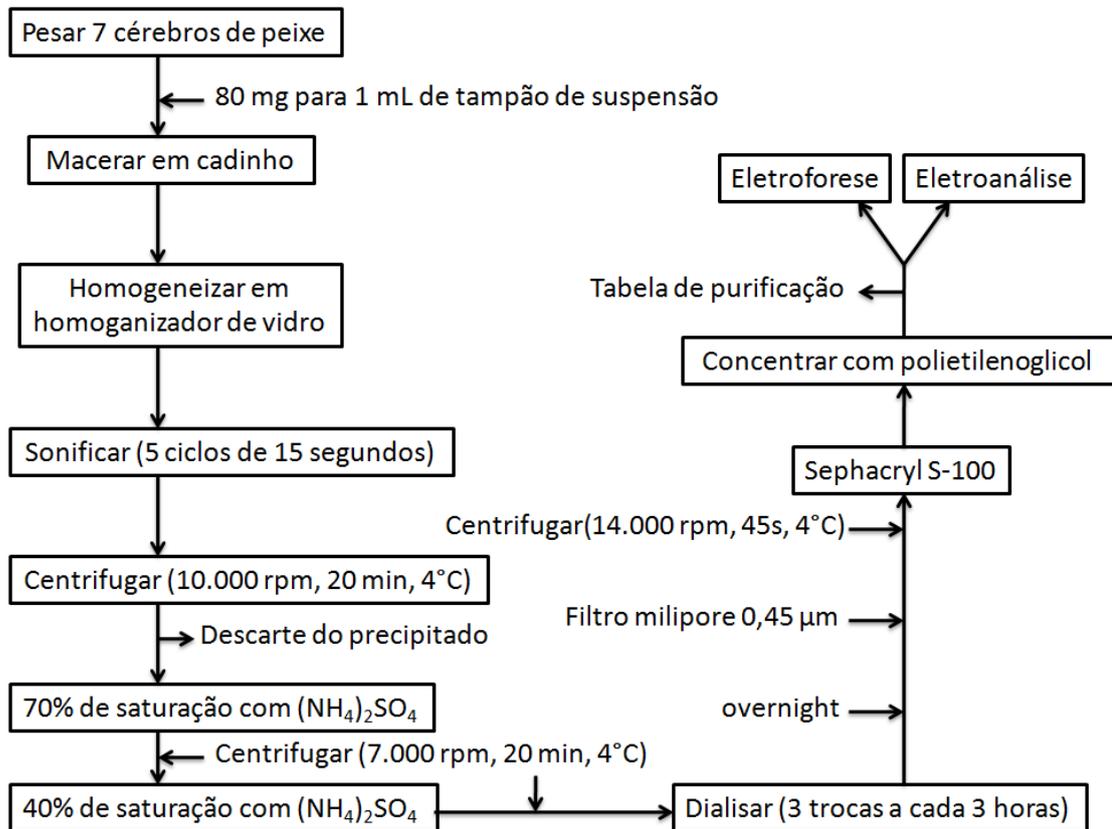
4.9 Protocolo de purificação 3

4.9.1 Cromatografia de Filtração em Gel (Sephacryl S-100)

A coluna cromatográfica foi empacotada com a resina sephacryl S-100 e lavada com 3 volumes de coluna de água deionizada (18 MΩ cm). Equilibrou-se com 3 volumes de coluna de Tris-HCl 20mM em Triton x100 (0,1%), NaCl 0,25M a uma taxa de fluxo de 0,009 mL/min. Carregou-se a coluna com 570 µL (2% do volume da resina, Vreseina = 28,5 mL) de amostra previamente filtrada em filtro milipore 0,45µm e em seguida submetida a um pico de centrifugação de 14.000 r.p.m. por 45s à 25°C. A taxa de fluxo foi 0,125 mL/min programado no equipamento AKTA Pure M1 (GE), as proteínas foram identificadas por absorção a 280nm. Cada tubo coletou 1,5 mL,

totalizando 44 tubos mantidos em banho de gelo. A seguir o fluxograma do protocolo de purificação 2 (**Figura 19**).

Figura 19. Fluxograma do protocolo de purificação 3.



Fonte: Autor, 2016.

4.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Preparou-se o gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) segundo Laemmli (nature, v 227, 1970) resolução a 12%. Foi misturado as amostras proteicas com tampão de amostra e submersos em banho-maria a 100 °C por 5 minutos para desnaturar, em seguida centrifugou-se durante 40 segundos, 14000 r.p.m. Foi aplicada uma voltagem constante de 90 V. Para detecção das bandas correspondentes as proteínas foi usado coloração com Azul de Comassie (Comassie

Brilhant Blue G-250) em um dia de agitação e posteriormente lavado com solução descorante (50% metanol e 10% ácido acético).

4.11 Modificação do eletrodo

Inicialmente submeteu-se o eletrodo de carbono vítreo a um pré-tratamento da sua superfície, uma etapa mecânica e em seguida uma etapa eletroquímica.

Na etapa mecânica a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi polida utilizando uma lixa seguida de um polimento em suspensão de alumina até que a superfície apresentar um aspecto espelhado. Após cada etapa de polimento do eletrodo foi lavado com água deionizada e submetido à limpeza por ultrassom durante 30 segundos, no qual a superfície do eletrodo permaneceu imersa em etanol para remoção das partículas residuais.

O grau de limpeza do eletrodo foi avaliado na etapa eletroquímica, montou-se o sistema em cela de 10 mL: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar. Adicionou-se 10 mL da solução de ferro cianeto de potássio ($K_4 [Fe(CN)_6]$) na cela e fez-se a corrida de potencial no método de voltametria de pulso diferencial. Foi subtraído o valor do pico de redução pelo valor do pico de oxidação, o valor obtido de 75 provou a reversibilidade do sistema permitindo a continuidade do experimento.

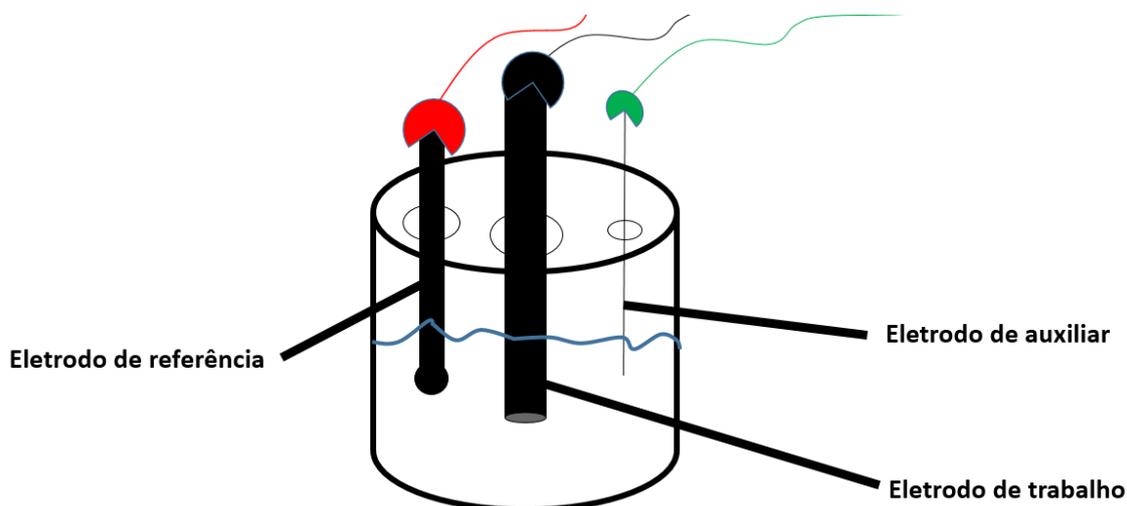
Adicionou-se 1 μ L de nanotubo de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) na superfície do eletrodo a cada 2 minutos mantido em estufa a 70°C até completar 10 μ L. Em seguida adicionou-se 10 μ L da amostra enzimática de extrato livre de células, dialisado, pico 1 (ChE1) e pico 2 (ChE2), representando atividade específica de $1,07 \times 10^{-4}$ U/mg, $9,40 \times 10^{-4}$ U/mg, $9,7 \times 10^{-4}$ U/mg, $4,3 \times 10^{-4}$ U/mg; respectivamente. Após a adição da amostra enzimática, o eletrodo foi mantido na geladeira por 1 hora, logo, o eletrodo modificado foi testado em cela eletroquímica (item 4.12).

4.12 Eletroanálise

Montou-se o sistema eletroquímico em cela com 10 mL de tampão fosfato pH 7,0 e introduziu-se os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar. No equipamento AUTOLAB, escolheu-se o método de voltametria de pulso diferencial (VPD) e os parâmetros eletroquímicos foram ajustados nas condições mostradas a seguir.

A fim de evitar o oxigênio no meio reacional borbulhou-se gás nitrogênio sobre agitação durante 5 minutos para a varredura de referência. Foram adicionados volumes crescentes de 10 μ L do substrato acetiltiocolina 0,05 M totalizando 17 adições. Após cada adição o meio foi submetido ao borbulhamento de gás nitrogênio e leve agitação durante 3 minutos, para evitar o desprendimento da enzima na superfície do eletrodo, em seguida deixou-se a solução em repouso por 1 minuto. Inicializou-se a varredura de potencial de oxidação em voltametria de pulso diferencial. O sistema eletroquímico montado está esquematizado na **Figura 20**.

Figura 20. Sistema eletroquímico montado.



Fonte: Autor, 2016

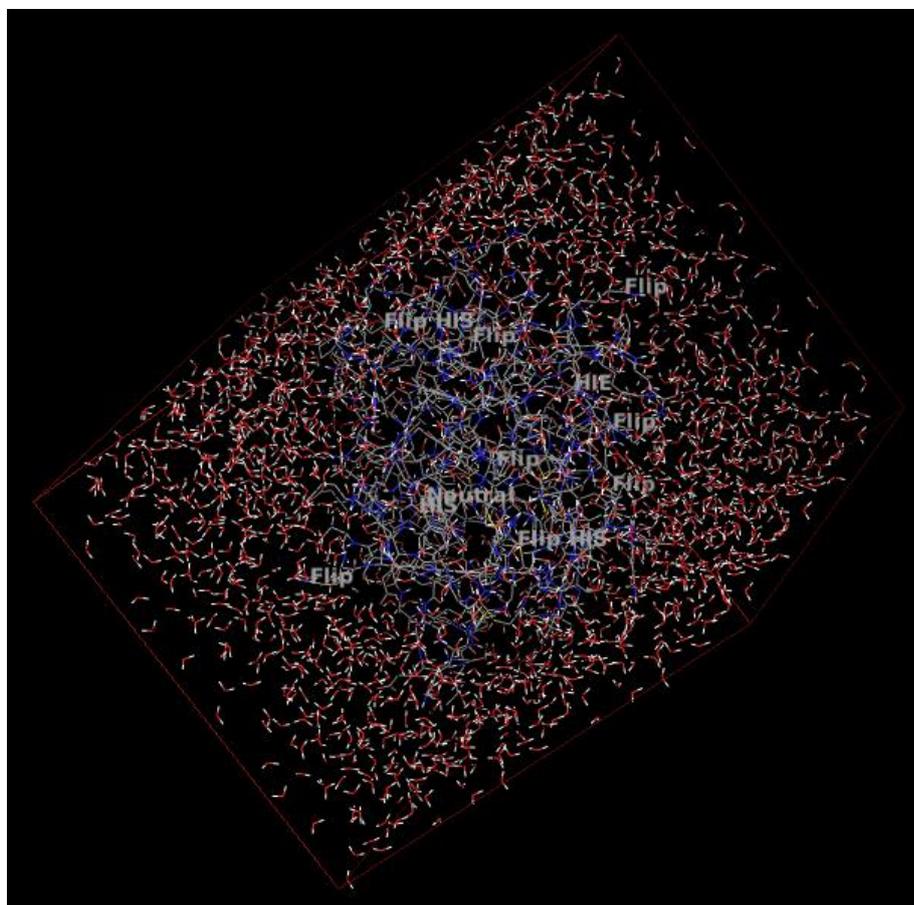
4.13 Modelo computacional

Nas Simulações de Dinâmica Molecular (DM), as coordenadas iniciais foram construídas a partir da estrutura cristalográfica de raio-X de *TcAChE* e *HuBuChE*,

obtida no Protein Data Bank (PDB), sob o código: 1U65 e 4BDS, respectivamente. Todos os átomos de hidrogênio foram adicionados às estruturas usando o *software* DESMOND (www.deshawresearch.com/downloads/download_desmond.cgi/), com interface do Maestro[®] (<http://www.schrodinger.com/>). Os valores de pK_a para a estrutura cristalina foram calculadas via *empirical* PROPKA 3.1 *software*, com a finalidade de atingir as condições fisiológicas, ou seja, pH de 7,4 Jensen *et al.* (BAS; ROGERS; JENSEN, 2008; OLSSON *et al.*, 2011). Um total de 3 contra-íons (Cl⁻) foram adicionados ao sistema em posições eletrostaticamente favoráveis à obtenção da neutralidade deste.

Finalmente, o sistema foi colocado em uma caixa ortorrômbica (caixa d'água), com 100 Å³ (**Figura 21**). A enzima e as moléculas de água foram otimizadas através da aplicação do campo de força *Optimized Potential for Liquid Simulations* (OPLS), implementado pelo DESMOND *software*. O sistema final foi relaxado durante 20 nanosegundos (ns) à 300 K, pressão constante (1 atm), usando o modelo *Simple Point Charge* (SPC) e NaCl a uma concentração de 0.15 M.

Figura 21. TcAChE inserida na caixa d'água.



Fonte: Autor, 2016.

As alterações conformacionais do sistema durante a dinâmica molecular foram monitoradas por *Root Mean Square Deviation* (RMSD), como mostrada na **Equação 2**.

Equação 2

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N m_i (r_i - r_i^0)^2}{\sum_{i=1}^N m_i}}$$

onde m_i representa a massa do átomo, e r_i^0 e r_i são as coordenadas do átomo i no estado inicial e durante a dinâmica molecular, respectivamente (AJLOO et al., 2015). Após a identificação da estrutura da TcAChE mais estável dentro o respectivo tempo de simulação, esta foi selecionada para a realização dos experimentos de docagem.

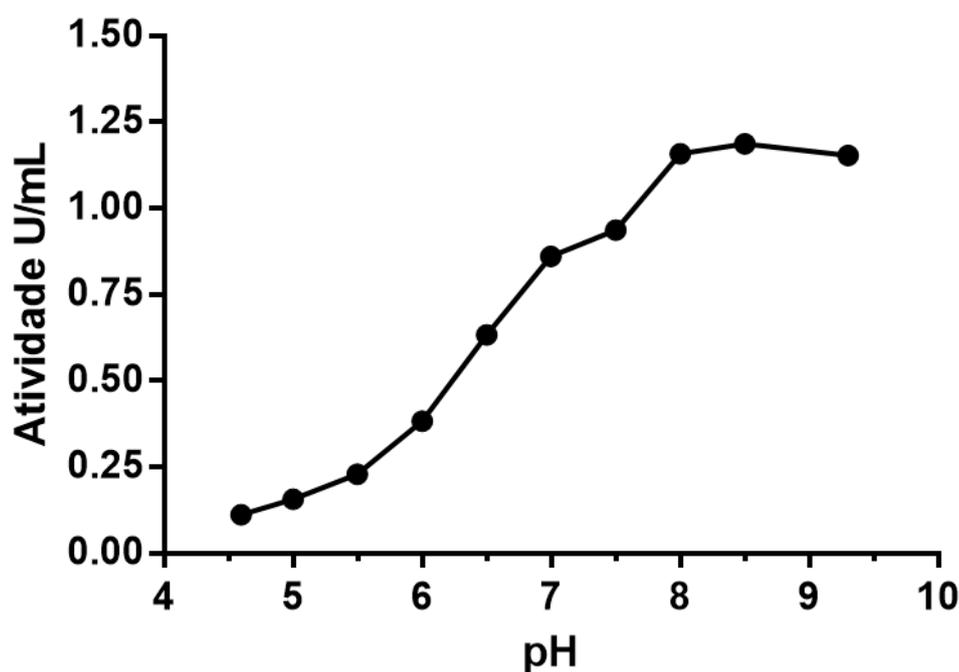
Na docagem, a estrutura do NTCPM foi desenhado no formato SMILES, e esta foi convertida em formato tridimensional MOL2, usando o CORINA (Molecular Networks, <http://www.molecular-networks.com/>) (MARTINY et al., 2015). O Modelo de *Austin* (AM1) foi empregado como método de minimização da energia interna, usando o *software* ARGUSLAB v4.0.1 (<http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>). A estrutura final do NTCPM foi convertida no formato .pdbqt* pelo *software* AUTODOCK TOOLS v. 1.5.6 (<http://autodock.scripps.edu/downloads>). Usando o *software* AUTODOCK VINA (TROTT; OLSON, 2010), uma caixa de busca foi maximizada no centro da enzima em sua conformação nativa (obtenção por dinâmica). Esta caixa de busca (x= -0,2506; y= -0,113; z= -0,1454) foi usada para avaliar o volume estérico e interações de Van der Waals entre o NTCPM e as duas ChEs (DU et al., 2000). Cargas parciais atômicas foram adicionadas pelo método matemático de *Kollman* (CORREA-BASURTO et al., 2007). Por fim, o experimento de *docking* molecular foi executado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização do extrato livre de células

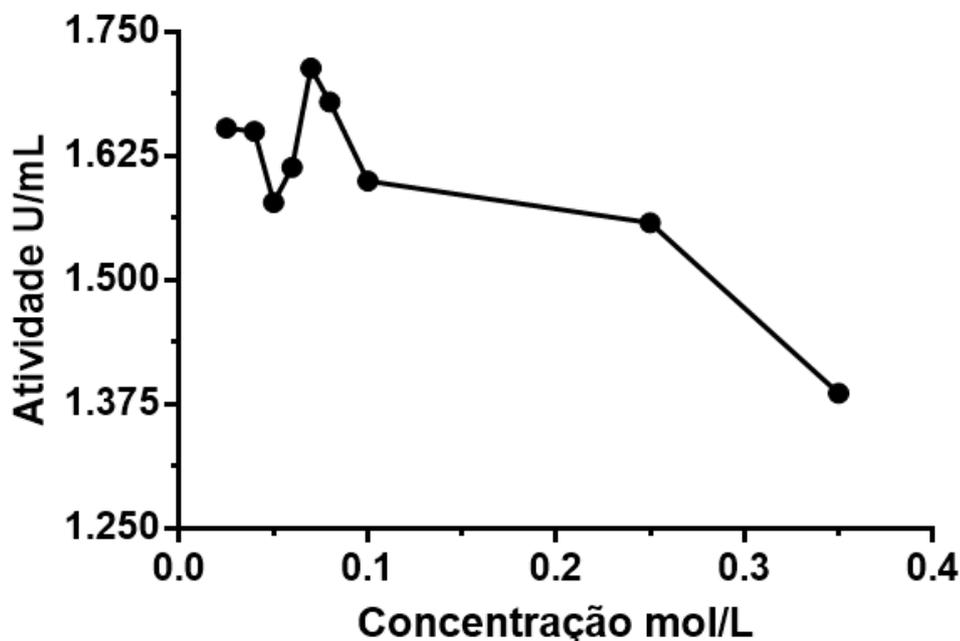
Inicialmente, foi realizado a caracterização da atividade colinesterásica presente no extrato livre de células cerebrais de *Prochilodus Brevis* em busca de valores, de pH, temperatura e força iônica que resultasse em maior atividade enzimática. De acordo com o método de Ellman (Item 4.3), foi utilizado um gradiente de tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4) com variação de pH e concentração. O gradiente de pH variou de 4,5 a 9,0 (**Figura 22**). O gradiente de concentração empregado no tampão variou de 0,01M a 0,35M (**Figura 23**).

Figura 22. Variação da atividade de ChE presente no extrato de cérebro de *P. brevis* em função do pH de K_2HPO_4 .



Fonte: Autor, 2016

Figura 23. Variação da atividade de ChE presente no extrato de cérebro de *P. brevis* em função da concentração de K_2HPO_4 .



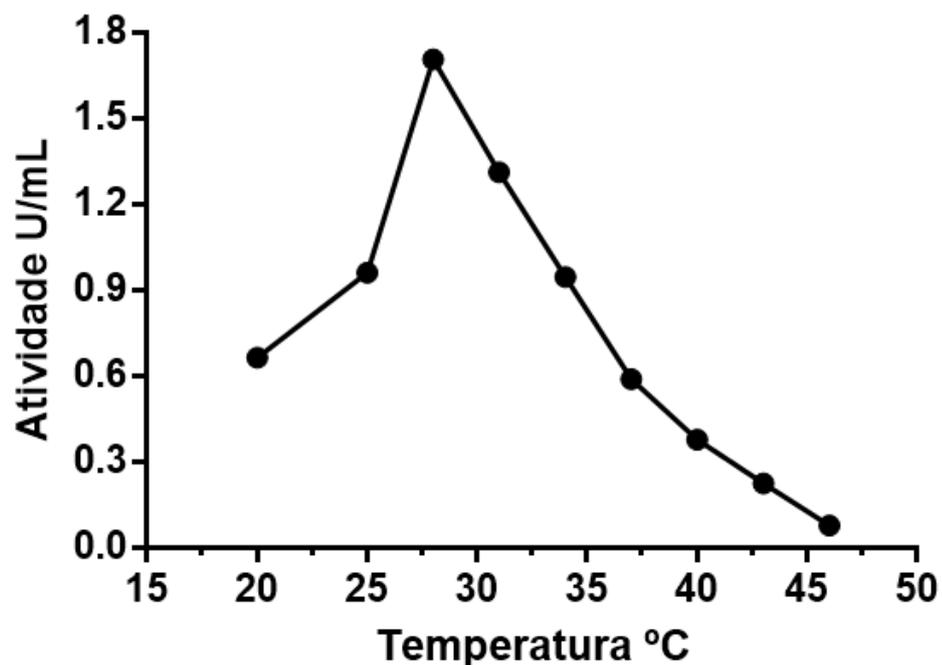
Fonte: autor, 2016

O extrato livre de células de *P. Brevis* teve maior atividade em pH 8,5 e força iônica de 0,08M. Em pH 8,5 o SAP de AChE forma uma superfície negativa que pode facilmente ligar-se a ATCh devido ao amônio quaternário (carga positiva), levando a um alinhamento do momento dipolo com SAP que aumenta a taxa de associação dos ligantes catiônicos. Enquanto os resíduos da tríade catalítica (Ser-His-Glu) tem carga negativa no pH ótimo encontrado, o que possivelmente fortalece o campo eletrostático do sítio ativo favorecendo o ataque nucleofílico da serina na carbonila de ATCh e a captura de prótons pela histidina, deste modo aumentando a velocidade da reação e consequentemente a atividade catalítica neste pH. Assim é encontrado na literatura de ChE em condições de experimento, tampão na faixa de pH de 7,5 a 8,5 e força iônica de 0,05M a 0,1M.

Já em condições de variação de temperatura foram analisadas a temperatura ótima e a estabilidade térmica, a faixa de temperatura analisada foi de 20°C a 46 °C.

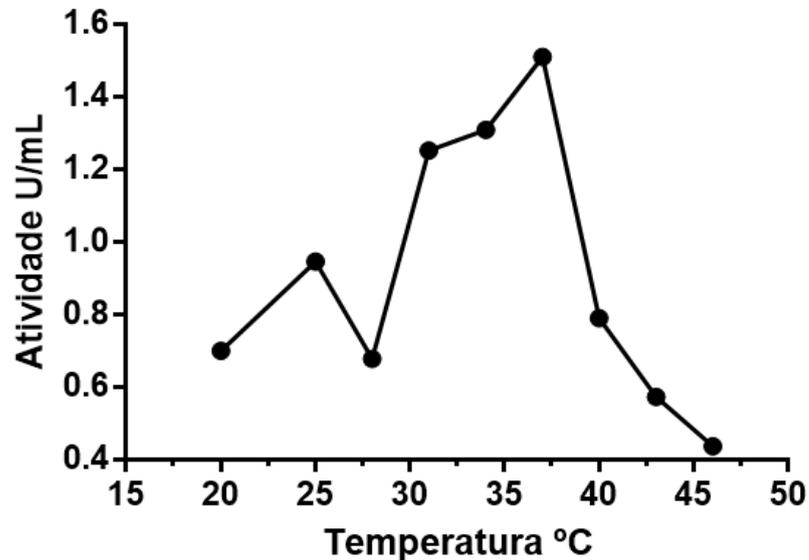
Para temperatura ótima, o meio reacional contendo tampão fosfato e extrato livre de células foi mantido na temperatura durante 10 minutos, em seguida adicionou-se DTNB e ATCh para a medição de atividade (**Figura 24**). Para estabilidade térmica, o meio reacional contendo tampão fosfato e extrato livre de células foi mantido na temperatura durante 10 minutos, em seguida manteve-se o meio reacional a temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se DTNB e ATCh para a medição de atividade (**Figura 25**).

Figura 24. Variação da atividade de ChE presente no extrato de cérebro de *P. brevis* em função da temperatura (Temperatura ótima).



Fonte: Autor, 2016

Figura 25. Variação da atividade de ChE presente no extrato de cérebro de *P. brevis* em função da temperatura (Estabilidade térmica).



Fonte: Autor, 2016

A temperatura ótima de 28°C, logo em seguida observa-se a queda brusca de atividade a partir de 31°C a 46°C. Mohamed M. A. et al. 2007 obteve maior atividade colinesterásica a 35°C em *Heterorhabditis bacteriophora*. Visto que peixes são animais pecilotérmicos, no qual a temperatura corporal se adapta a temperatura do ambiente, os ambientes aquáticos são mais frios, possivelmente correspondendo a uma adaptação evolutiva de enzimas com alta atividade em temperaturas menores. A estabilidade térmica foi um método aplicado afim de caracterizar a desnaturação de ChE com análise a temperatura ambiente. Na temperatura de 28°C, no qual foi evidenciado temperatura ótima, na estabilidade térmica houve uma queda. Em seguida as temperaturas subsequentes onde observou-se queda de atividade, para análise de estabilidade térmica obteve um comportamento de aumento de atividade. Este fato pode estar relacionado com um tipo de desnaturação reversível, pois a perturbação sofrida pela enzima beneficiou a atividade catalítica de 31 a 37°C, após 37°C é observado a queda de atividade de aproximadamente 80% até 46°C,

sugerindo instabilidade estrutural da enzima a nível de uma desnaturação irreversível.

5.2 Protocolo de purificação 1

O extrato livre de células foi submetido a duas precipitações salina com sulfato de amônio, como método adotado para aumentar a eficiência da cromatografia líquida, melhorando o fator de purificação da enzima, pois é um método de solubilidade simples e de baixo custo para a purificação. Nesta etapa fez-se necessário o controle do tempo, agitação lenta e temperatura para todos os fracionamentos do processo. A **Tabela 2** mostra os fracionamentos de 0-70%, seguido de 0-40%. Os outros fracionamentos de 70-100%; 40-80% e 80-100%, não foram incluídos na tabela pois apresentaram valores negativos ou apresentaram um valor muito baixo de atividade de ChE.

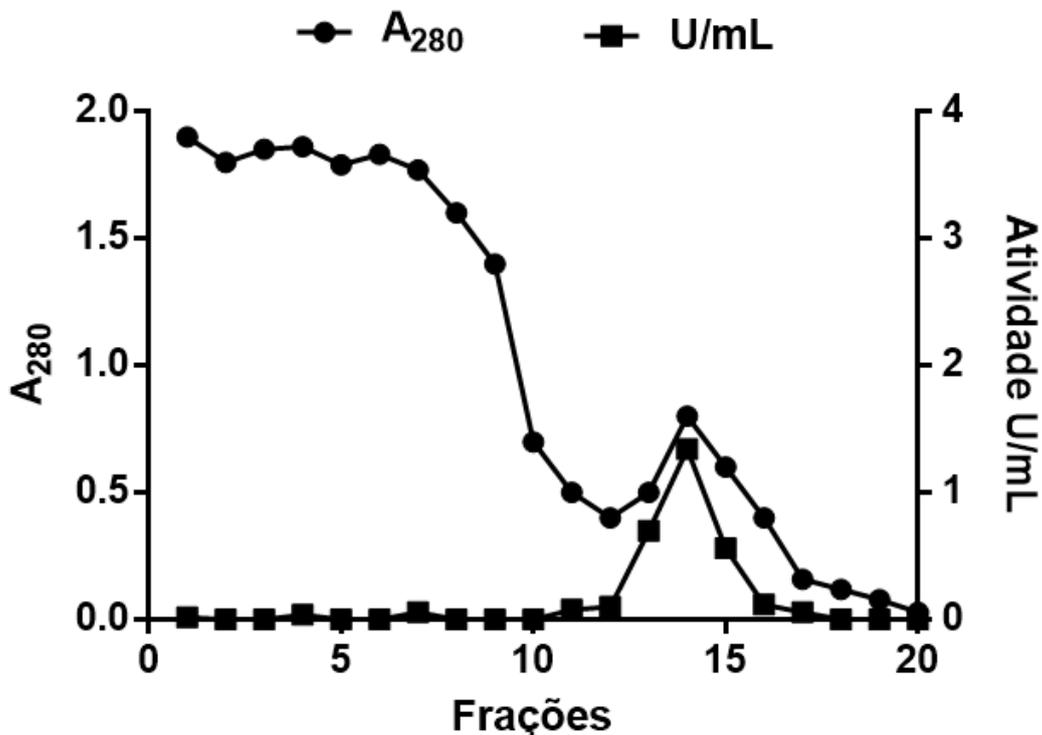
Tabela 2. Precipitação fracionada de colinesterase em diferentes saturações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Atividade U/mL	Volume de amostra	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Recuperação
Extrato Livre de Células	0,862	29	25	81,49	0,310	1	100
70% sedimento de saturação	3,14	5	15,70	11,10	1,41	4,55	62,80
40% sedimento de saturação	4,45	3,6	16,03	8,24	1,94	6,27	64,12

Fonte: Autor, 2016

A fração com maior atividade foi de 0-70% (1,41U/mg) com fator de purificação de 4,55 e recuperação de 62,80%. Esta por sua vez foi submetida a mais uma precipitação com sulfato de amônio levando a um aumento na atividade de ChE na fração 0-40% (1,94 U/mg) com fator de purificação de 6,27 e recuperação de 64,12%. Portanto, observou-se um aumento de uma fração para outra de 37,59% na atividade específica. Após a aplicação da amostra 0-40%, o cromatograma da **Figura 26** mostra o perfil de eluição de proteínas a 280nm, no qual as frações 13, 14 e 15 correspondem ao pico com atividade ChE coincidindo com o segundo pico de proteína.

Figura 26. Perfil de eluição para a cromatografia de AChE de *Prochilodus Brevis* em Sephacryl S-200 (1,0x32,7 cm) previamente equilibrado com 20mM de Tris-HCl, pH 7,5 e NaCl 0,3M com uma taxa de fluxo de 0,28 mL/min e 2,5mL por fração. Absorbância a 280nm (●—●) e atividade AChE (■—■).



O perfil do cromatograma inicia a 280nm uma alta absorbância sem indício de atividade ChE. Visto que há uma queda na absorbância para novamente o aparecimento de outro pico em atividade ChE e absorbância a 280nm, descarta a possibilidade de ser causa do uso de tritron x100 (detergente). Possivelmente a proteína eluída no início do cromatograma seja de proteínas já aderidas a resina que eluíram com a força iônica do tampão em processo isocrático. Logo em seguida o pico de atividade ChE é apresentado nas frações 13, 14 e 15, foram reunidos e concentrados com PEG. Foram feitos os ensaios de atividade do pico concentrado. A **Tabela 3** mostra as propriedades de atividade do extrato livre de células após as etapas de purificação frente a ATCh, com atividade específica final de 0,128 U/mg, fator de purificação de 0,41 e recuperação de 0,45%.

Tabela 3. Protocolo de purificação 1 de acetilcolinesterase cerebral de *Prochilodus brevis*.

Solução proteica	Atividade (U/mL)	Volume total (mL)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Recuperação
Extrato livre de células	0,862	29	25	81,49	0,310	1	100
40% sedimento de saturação	4,45	3,6	16,03	8,24	1,94	6,27	64,12
Sephacryl S-200	0,056	2	0,112	0,876	0,128	0,412	0,45

A unidade de atividade AChE é definida pela catálise da hidrólise de 1 μmol de ATCh por segundo sobre as condições padrões do ensaio.

Fonte: Autor, 2016

5.3 Protocolo de purificação 2

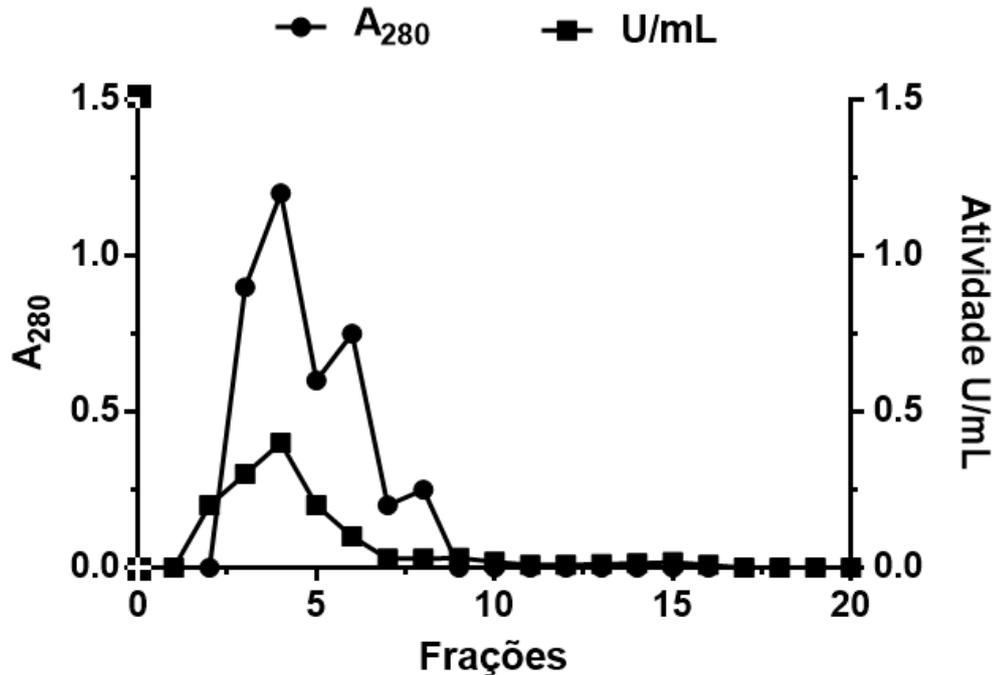
Empregou-se o mesmo perfil de saturação do protocolo 1 (**Tabela 4**). A fração 0-70% com atividade específica de 0,31 U/mg, fator de purificação de 0,49 e 26,09% de recuperação. Observou-se aumento considerável na atividade específica de 0-40% que foi de 1,77 U/mg, fator de purificação de 2,8 e 22,67% de recuperação. Que resulta em um aumento de 472,26% na atividade específica. Em seguida na atividade específica de 0-40% dialisado diminuiu para de 0,436 U/mg, fator de purificação de 0,69 e 4,55% de recuperação. Esta fração dialisada foi aplicada em Sephacryl S-200 apresentando um pico de atividade nos primeiros tubos coincidente com o pico de proteína a 280 nm (**Figura 27**).

Tabela 4. Precipitação fracionada de colinesterase em diferentes saturações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Atividade U/mL	Volume de amostra	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Recuperação
Extrato Livre de Células	0,2740	23,5	6,44	10,16	0,634	1	100
70% sedimento de saturação	0,2799	6	1,68	0,912	0,310	0,49	26,09
40% sedimento de saturação	0,2916	5	1,46	0,822	1,774	2,80	22,67

Fonte: Autor, 2016

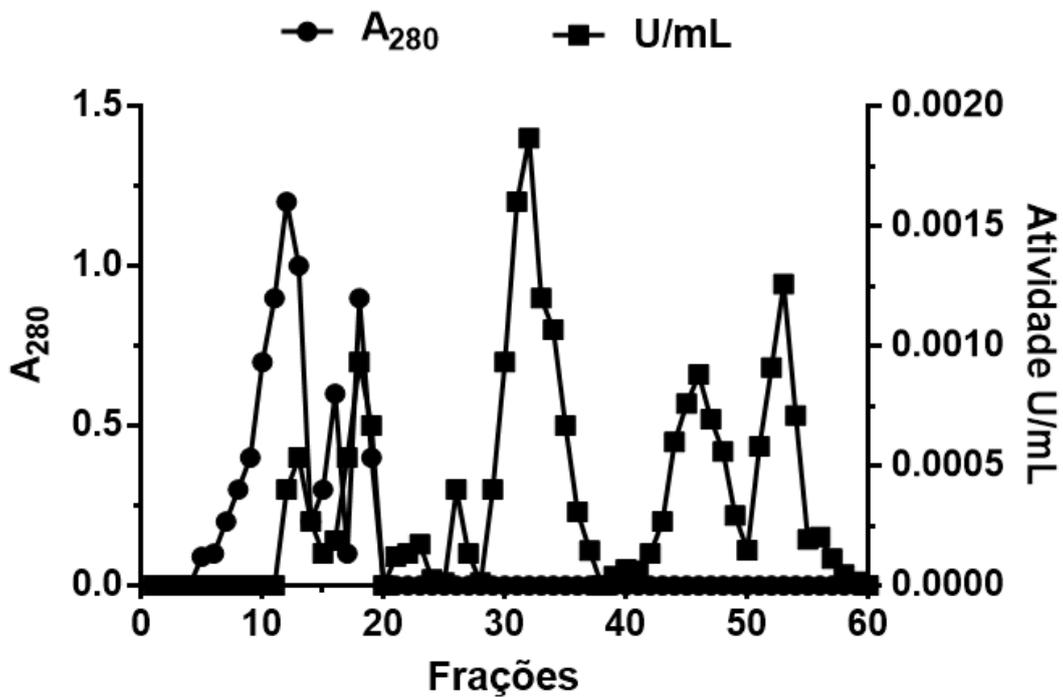
Figura 27. Perfil de eluição para a cromatografia de AChE de *Prochilodus Brevis* em Sephacryl S-200 (1,0x22 cm) previamente equilibrado com 20mM de Tris-HCl, pH 7,5 e NaCl 0,3M com uma taxa de fluxo de 0,40 mL/min e 3,0 mL por fração. Absorbância a 280nm (●—●) e atividade AChE (■—■).



Fonte: Autor, 2016

A resina Sephacryl S-200 teve similaridade nos protocolos de purificação 1 e 2 apresentando eluição de um pico de atividade ChE sobre a absorbância a 280nm. Embora o pico eluído para este protocolo não apresentou aderência na resina, pois foi eluído nos primeiros tubos diferentemente do protocolo 2 que apresentou característica adsortiva. As frações que compõem o pico (frações 3, 4, 5 e 6) foram reunidos, concentrou-se com PEG, seguida de centrifugação (14.000 r.p.m., 45s, 25°C) e por último filtrada em filtro milipore 0,45µm. Atividade desta amostra apresentou atividade específica de 0,287 U/mg, fator de purificação de 0,45 e 8,06% de recuperação. Afim de melhorar a resolução e caracterizar o pico reunido, aplicou-se a amostra em uma trocadora de ânions (DEAE-sepharose) com grupos dietilaminoetil (**Figura 28**).

Figura 28. Perfil de eluição para a cromatografia de AChE de *Prochilodus Brevis* em DEAE-Sepharose (1,5x32 cm) previamente equilibrado com 20mM de Tris-HCl, pH 7,5 com uma taxa de fluxo de 0,125 mL/min e 5 mL por fração. Absorbância a 280nm (●—●) e atividade AChE (■—■).



Fonte: Autor, 2016

O cromatograma mostra o desprendimento de ChE após o tubo 10 e assim durante toda a eluição, que evidencia a importância desta coluna pois tem capacidade de isolar a partir de características estruturais e químicas da enzima. A boa separação dos picos e com atividades ChE sem absorbância a 280nm teria alto fator de purificação pelo aumento da atividade específica, no entanto o desregulamento do carrossel coletou 15 mL de cada fração, tornando inviável devido a utilização de grandes quantidades de PEG para concentrar, visto que o mesmo tem causado diminuição na atividade. A escala de atividade mostra baixo valor do maior pico no tubo 32, com valor de atividade de 0,0018 U/mL. Apesar disto, foram reunidos os tubos 31 e 32, concentrados com PEG, apresentou atividade específica de 0,0133U/mg, fator de purificação de 0,021 e recuperação de 0,0031%, apresentados

na **Tabela 5**. No entanto, não foi possível obter atividade ChE satisfatória de *P. Brevis* neste protocolo. *Heterorhabditis bacteriophora* (Mohamed M.A. et al., 2007 e 2016) isolou dois picos com Sephacryl S-200, refinando um dos picos em DEAE-sepharose resultando em duas isoformas de ChE.

Tabela 5. Protocolo de purificação 2 de acetilcolinesterase cerebral de *Prochilodus brevis*.

Solução proteica	Atividade (U/mL)	Volume total (mL)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Recuperação
Extrato livre de células	0,2740	23,5	6,44	10,16	0,634	1	100
Dialisado de 40%	0,05052	5,8	0,293	0,672	0,436	0,69	4,55
Sephacryl S-200	0,2598	2	0,5196	1,811	0,2869	0,45	8,06
DEAE-Sepharose	0,00010	2	0,00020	0,01508	0,01326	0,02093	0,0031

A unidade de atividade AChE é definida pela catálise da hidrólise de 1 μ mol de ATCh por segundo sobre as condições padrões do ensaio.

Fonte: Autor, 2016

5.4 Protocolo de purificação 3

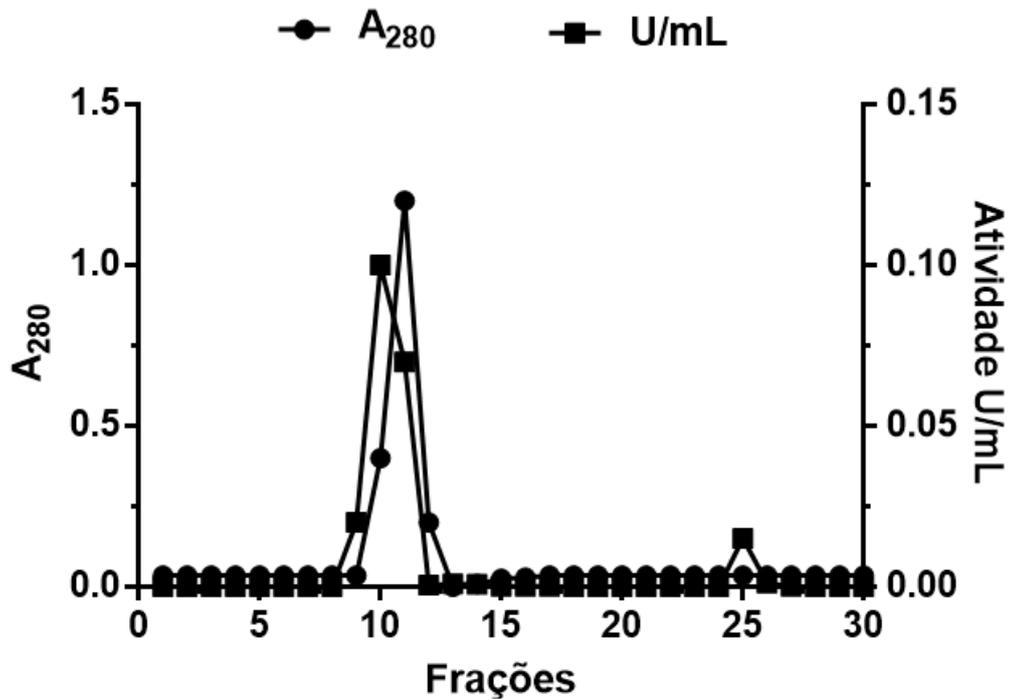
A **Tabela 6** apresenta o perfil de precipitação salina, método também empregado nos protocolos anteriores. A fração 0-70% apresentou atividade específica de 0,223 U/mg, fator de purificação de 1,04 e 67,51% de recuperação. A fração seguinte, 0-40%, apresentou atividade específica de 0,233 U/mg, fator de purificação de 1,08 e recuperação de 48,36%. Que resulta em um aumento de 4,48% na atividade específica. Em seguida na atividade específica de 0-40% dialisado diminuiu para de 0,395 U/mg, fator de purificação de 1,08 e 48,36% de recuperação. Esta fração foi aplicada na coluna de gel filtração, empacotada com Sephacryl S-100. Cromatograma (**Figura 27**) apresenta o perfil de eluição.

Tabela 6. Precipitação fracionada de colinesterase em diferentes saturações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Atividade U/mL	Volume de amostra	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Recuperação
Extrato Livre de Células	0,305	27	8,25	38,44	0,215	1	100
70% sedimento de saturação	1,14	5	5,57	24,96	0,223	1,04	67,51
40% sedimento de saturação	1,05	3,8	3,99	17,14	0,233	1,08	48,36

Fonte: Autor, 2016

Figura 29. Perfil de eluição para a cromatografia de AChE de *Prochilodus Brevis* em Sephacryl S-100 (1,5x16,19 cm) previamente equilibrado com 20mM de Tris-HCl, pH 7,5 com uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min e 3 mL por fração. Abasorbância a 280nm (●—●) e atividade AChE (■—■).



Fonte: Autor, 2016

Foi possível separar com a coluna Sephacryl S-100 um pico de maior resolução do que nos protocolos anteriores com Sephacryl S-200, pois esta resina tem maior capacidade em separar proteínas de peso molecular próximos, resultando em uma menor largura do pico. No cromatograma é observado dois picos. O pico 1 (será chamado de ChE1) entre os tubos 9, 10 e 11 e o outro no tubo 25 (será chamado de ChE2). Reuniu-se os picos individualmente. O primeiro pico apresentou atividade específica de 0,194 U/mg, fator de purificação 0,62 e recuperação de 4,88%. Já o segundo pico apresentou atividade específica de 0,087 U/mg, fator de purificação de 0,28 e 1,10% de recuperação. Os valores apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Protocolo de purificação 3 de acetilcolinesterase cerebral de *Prochilodus brevis*.

Solução proteica	Atividade (U/mL)	Volume total (mL)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Recuperação
Extrato livre de células	0,862	29	25	81,49	0,310	1	100
Dialisado de 40%	0,738	4,2	3,105	7,853	0,395	1,27	12,42
Sephacryl S-100 [*]	0,271	2	1,22	6,27	0,194	0,62	4,88
Sephacryl S-100 ^{**}	0,184	2	0,276	3,16	0,0873	0,28	1,10

A unidade de atividade AChE é definida pela catálise da hidrólise de 1 μ mol de ATCh por segundo sobre as condições padrões do ensaio. A tabela mostra resultados para o primeiro pico ^{*} e o segundo ^{**} de acordo com o perfil de eluição.

Fonte: Autor, 2016

O protocolo de purificação 3 com Sephacryl S-100 mostrou menos perda de atividade específica para ChE cerebral de *P. Brevis*. O perfil de eluição apresentou dois picos de atividade ChE, quando medidos frente aos substratos análogos. O segundo pico apresentou 46,96% de atividade BuChE, comparado com apenas 17,53% do pico mais intenso no início da eluição (**Tabela 8**).

Tabela 8. Porcentagem relativa da atividade específica de BuChE.

Fração	AChE (%)	BuChE (%)
ChE1	82,47	17,53
ChE2	53,04	46,96

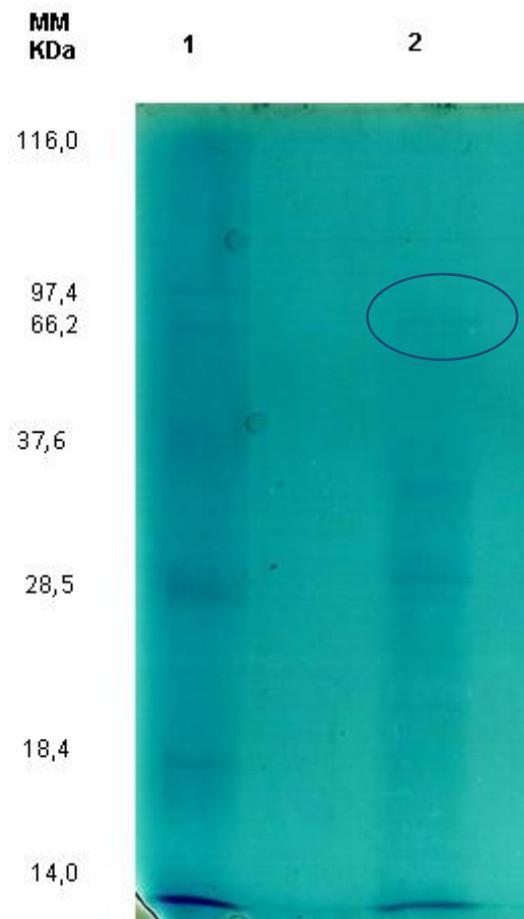
A unidade de atividade BuChE é definida pela catálise da hidrólise de 1 μmol de BTCh por segundo sobre as condições padrões do ensaio.

Fonte: Autor, 2016

5.5 Eletroforese SDS-PAGE

A amostra referente aos pico 1 (ChE1) do protocolo de purificação 3 foi aplicada em gel de eletroforese. A eletroforese SDS-PAGE de ChE1 com 0,031 mg proteína aplicados na canaleta 2 mostra uma banda de aproximadamente 67 KDa (**Figura 30**).

Figura 30. Eletroforese SDS-PAGE a 12%. As canaletas abaixo: (1) Marcador, (2) 0,031 mg proteína de ChE1 (pico 1 – protocolo de purificação 3). A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas coradas com Comassie.



Fonte: Autor, 2016

Comparando a massa molecular de ChE1 (67 KDa) e a **Tabela 9**, no qual mostra dados da literatura com a faixa de massa molecular de 65KDa a 94KDa para colinesterases purificadas de diferentes tecidos e espécies no qual pode ser visto uma variação, ChE1 apresenta banda em aproximadamente 67KDa também observada em cerebelo de humano (Zhang et., 1999) e plântulas de milho (Sagane e Nakagawa, 2005).

Tabela 9. Massa Molecular de subunidades de ChE de diferentes fontes.

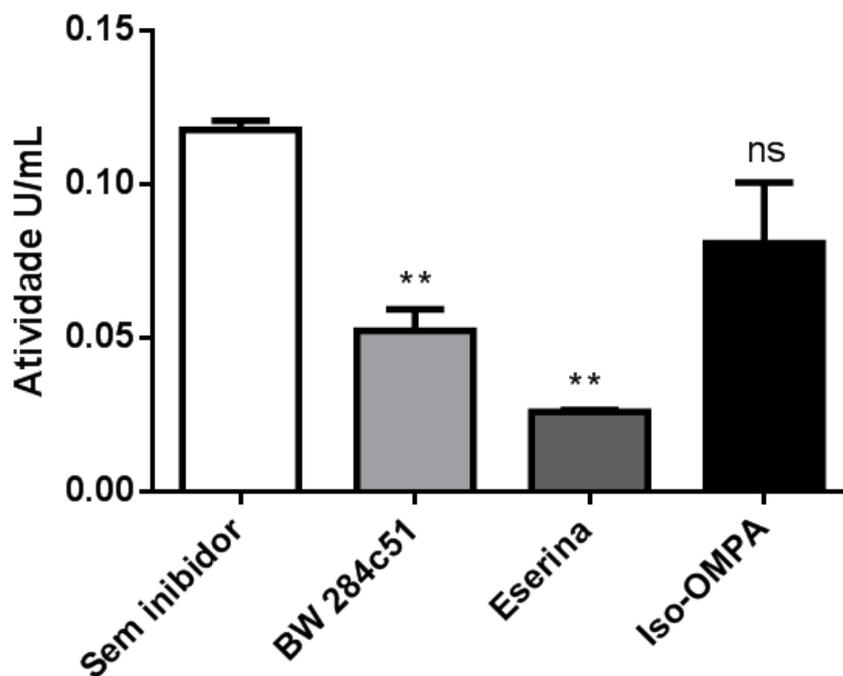
Espécie	Fonte	Massa molecular da subunidade (KDa)	Referência
Bicho de seda <i>Bombyx mori</i>	Cabeça	77,8	Peng et al., 2008
Peixe <i>Scomberomorus niphonius</i>	Cérebro	85	Zhu et al., 2006
Cavalo	Soro	72	Li et al., 2006
Nematóide <i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	Todo Corpo	66	Zhang e Yang, 2006
Cigarra <i>Nephotettix cincticeps</i>	Todo Corpo	75	Kato et al., 2004
Humano	Cerebelo	67	Zhang et., 1999
Besouro da batata do colorado <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Todo Corpo	65	Zhu e Clark, 1994
Pombo <i>Columba livia</i>	Soro	84	Khatab et al., 1993
Vagem <i>Lygus hesperus</i>	Todo Corpo	79-94	Zhu and Brindley, 1992
Nematóide <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Todo Corpo	65-70	Mohamed e Mahdy, 2016
Eritrócito Humano	Soro	70	Kaya e Ozcan, 2013
Milho	Plântulas	67-88	Sagane e Nakagawa, 2005
Peixe <i>Prochilodus Brevis</i>	Cérebro	67	Este trabalho

Fonte: Autor, 2016

5.6 Ensaio de inibição

A caracterização de enzimas também se dá pelo uso de inibidores específicos, o decaimento da taxa de hidrólise do substrato é a evidencia do efeito do inibidor. Foi analisado ChE1 referente ao protocolo de purificação 3. Foram testados três inibidores: BW284c51, Eserina e Iso-OMPA, em três concentrações (0,3 μ M, 0,7 μ M e 1,0 μ M) apresentados nas **Figuras 31, 32 e 33**, respectivamente.

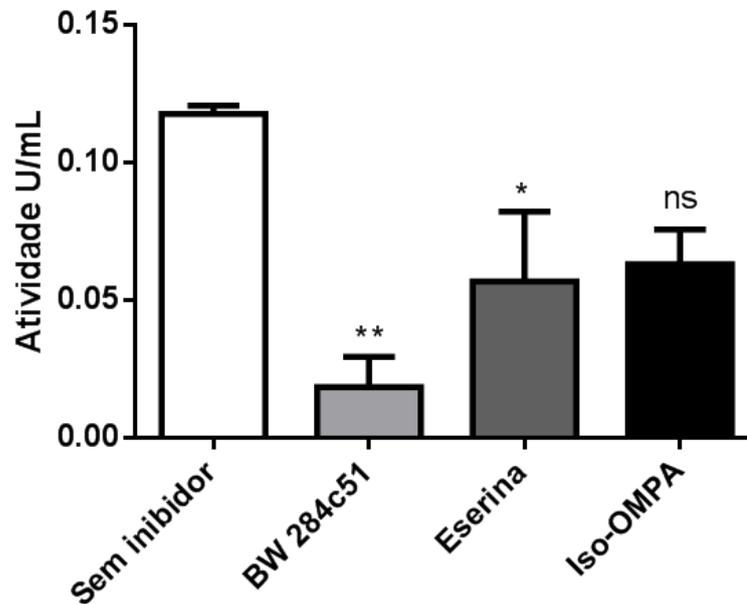
Figura 31. Efeito dos inibidores em ChE1 de *P. Brevis*. BW 284c51, Eserina e Iso-OMPA a 0,3 μ M.



A análise estatística utilizada foi ANOVA seguido do teste de SNK *($p < 0,05$)

Fonte: Autor, 2016

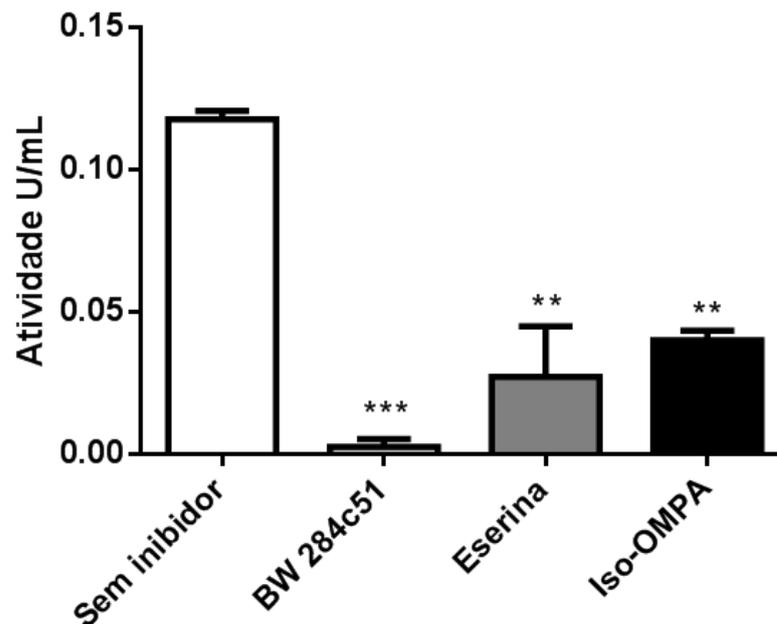
Figura 32. Efeito dos inibidores em ChE1 de *P. Brevis*. BW 284c51, Eserina e Iso-OMPA a 0,7 μ M.



A análise estatística utilizada foi ANOVA seguido do teste de SNK *($p < 0,05$)

Fonte: Autor, 2016

Figura 33. Efeito dos inibidores em ChE1 de *P. Brevis*. BW 284c51, Eserina e Iso-OMPA a 1,0 μ M.



A análise estatística utilizada foi ANOVA seguido do teste de SNK *($p < 0,05$)

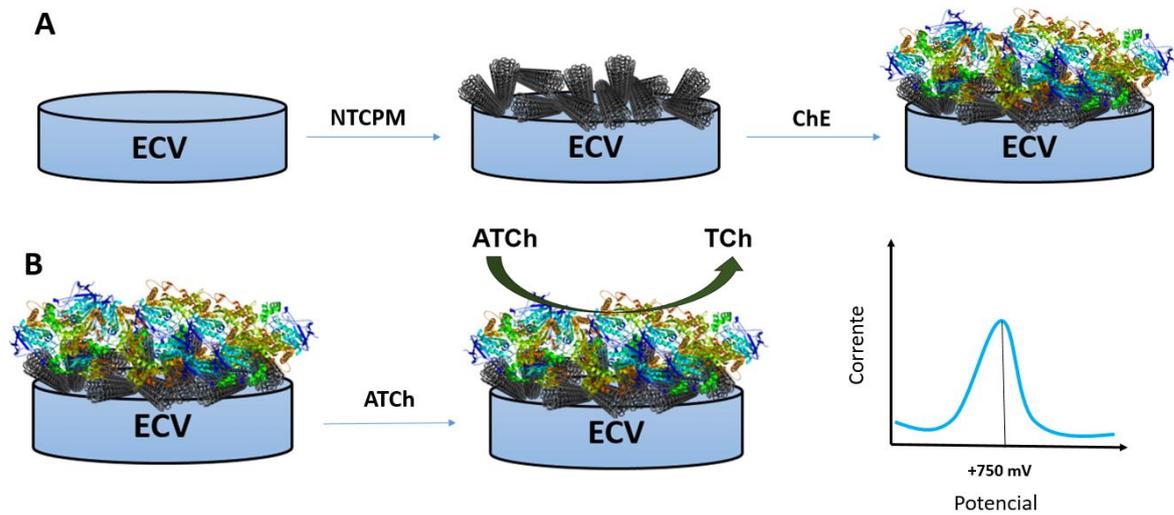
Fonte: Autor, 2016

De acordo com os estudos de inibição para ChE elucidada em SDS PAGE, a **Figura 31** mostrou um alto potencial de inibição de Eserina a $0,3\mu\text{M}$ em seguida BW 284c51, iso-OMPA não apresentou valores significativos; corroborando para admitir maior presença de AChE do que BuChE, nesta concentração. Apesar da alta especificidade de BW 284c51 pela AChE, o carbamato de Eserina teve maior efeito, possivelmente devido a fatores estéricos, pois Eserina tem pouco menos de 40% do peso molecular de BW 284c51, tendo assim maior difusão no meio reacional. Em concentração de $0,7\mu\text{M}$ (**Figura 32**) confirma uma competitividade maior pelo sítio ativo de AChE em BW 284c51 do que Eserina. O inibidor específico de BuChE (Iso-OMPA) não apresentou resultado significativo para as duas concentrações, corroborando com o resultado de comparação da taxa de hidrólise entre ambos substratos (ATCh e BTCh) mostrando preferência para ATCh. A **Figura 33** apresenta inibição significativa para os três inibidores na concentração de $1,0\mu\text{M}$. O decaimento da atividade ChE em 65,9% para Iso-OMPA, 76,7% para Eserina e 97,8% para BW284c51. A alta sensibilidade a BW284c51 caracteriza maior presença de AChE no isolamento de ChE1 em cérebro de *P. Brevis*. Estudos anteriores (LEONCINI, 2014) com extrato livre de células de *P. Brevis* apresentaram sensibilidade semelhante ($\text{IC}_{50} = 0,7\mu\text{M}$) para Eserina, o IC_{50} teórico para este estudo foi de $0,65\mu\text{M}$.

5.7 Eletroanálise

Os ensaios eletroquímicos com imobilização de ChE com nanotubo de carbono de paredes múltiplas em eletrodo de carbono vítreo (ECV/NTCPM/ChE), esquema demonstrado na **Figura 34**, já era esperado um sinal de oxidação em +750mV e o aumento da corrente diretamente proporcional com adições sucessivas de ATCh.

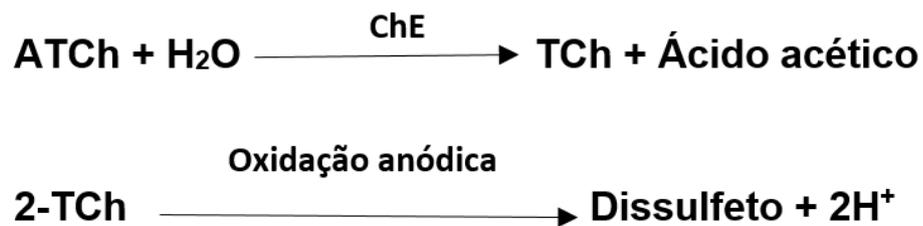
Figura 34. Esquema de modificação do eletrodo (A) e mecanismo de detecção do sinal de oxidação de TCh a +750mV (B).



Fonte: Autor, 2016

A atividade enzimática é medida pela oxidação anódica da tiocolina (TCh), monitorada na faixa de potencial dos compostos sulfidríla cerca de +750mV (LIU, 2006). TCh é produzida pela hidrólise enzimática de ATCh por ChE (**Equação 3**).

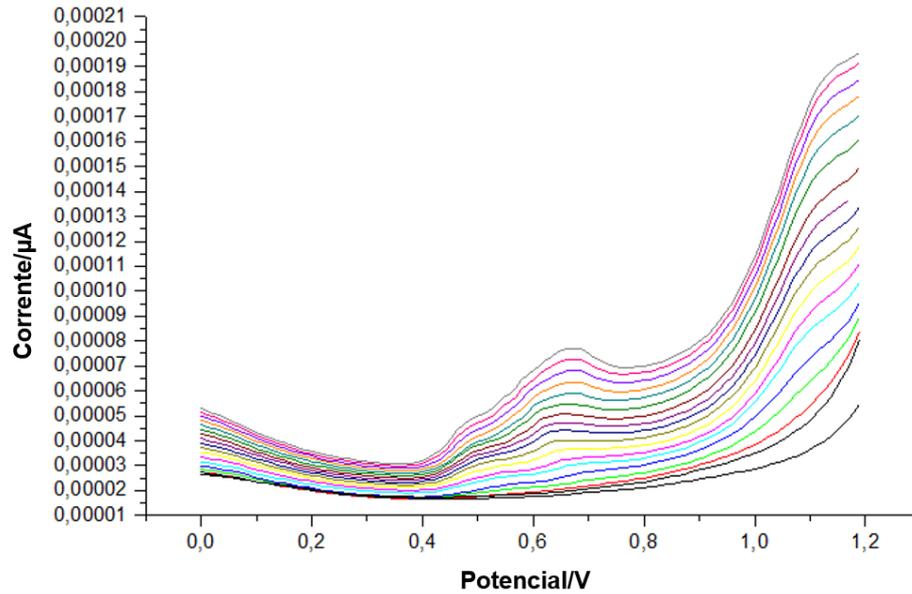
Equação 3



Fonte: Dong, 2013

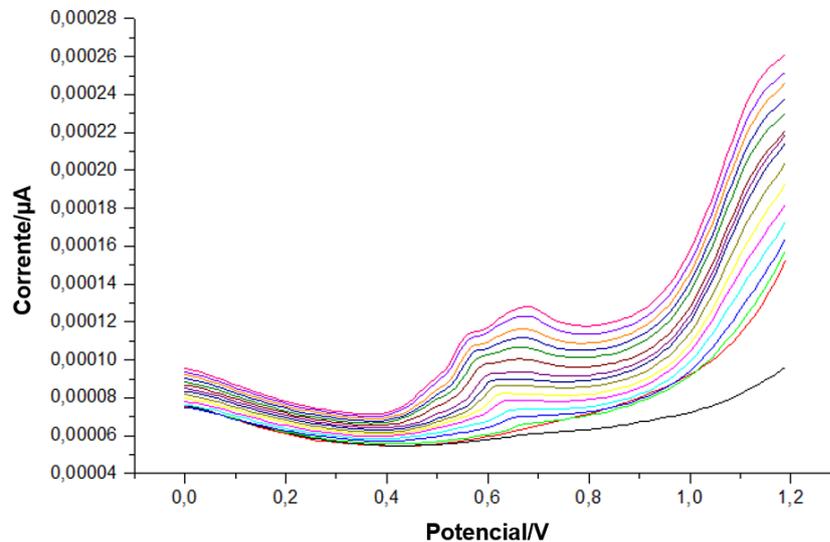
A varredura de potencial na faixa da oxidação permite a medição da oxidação da tiocolina que aumenta a corrente a cada adição do substrato. As amostras testadas foram do extrato livre de célula, dialisado, ChE1 e ChE2 (**Figuras 35, 36, 37 e 38**; respectivamente). Também com as respectivas atividade específicas: $1,07 \times 10^{-4}$ U/mg, $9,40 \times 10^{-4}$ U/mg, $9,7 \times 10^{-4}$ U/mg, $4,3 \times 10^{-4}$ U/mg.

Figura 35. Resposta VPD em ECV/NTCPM/Extrato livre de células (atividade específica = $1,07 \times 10^{-4}$ U/mg) para adições sucessivas de ATCh (0,05, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25, 0,3, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85 mM) em tampão fosfato pH 7.



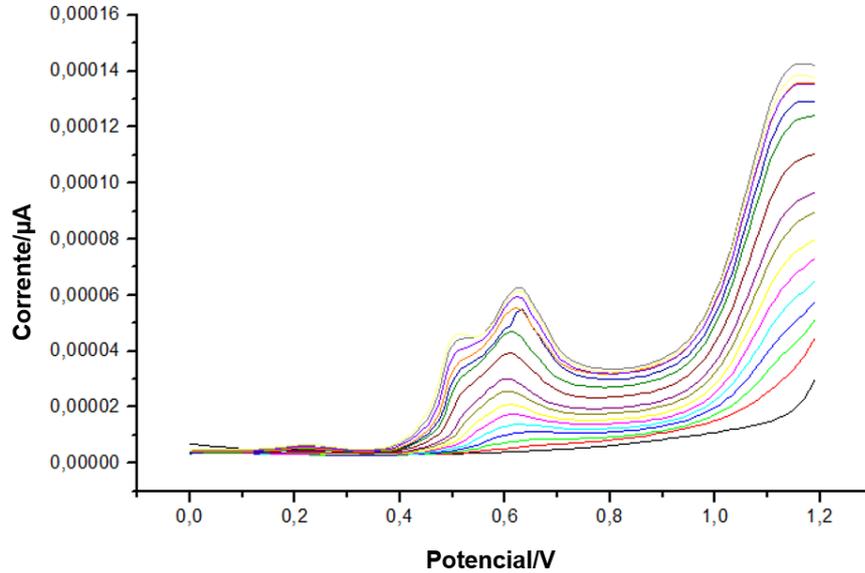
Fonte: Autor, 2016

Figura 36. Resposta VPD em ECV/NTCPM/Dialisado (atividade específica = $9,40 \times 10^{-4}$ U/mg) para adições sucessivas de ATCh (0,05, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25, 0,3, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85 mM) em tampão fosfato pH 7.



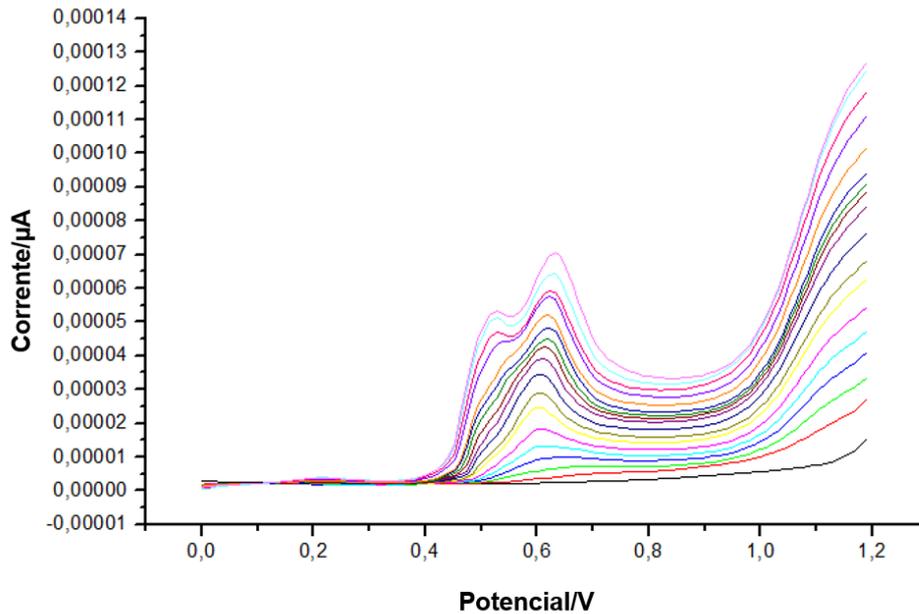
Fonte: Autor, 2016

Figura 37. Resposta VPD em ECV/NTCPM/ChE1 (atividade específica = $9,7 \times 10^{-4}$ U/mg) para adições sucessivas de ATCh (0,05, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25, 0,3, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85 mM) em tampão fosfato pH 7.



Fonte: Autor, 2016

Figura 38. Resposta VPD em ECV/NTCPM/ChE2 (atividade específica = $4,3 \times 10^{-4}$ U/mg) para adições sucessivas de ATCh (0,05, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25, 0,3, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85 mM) em tampão fosfato pH 7.

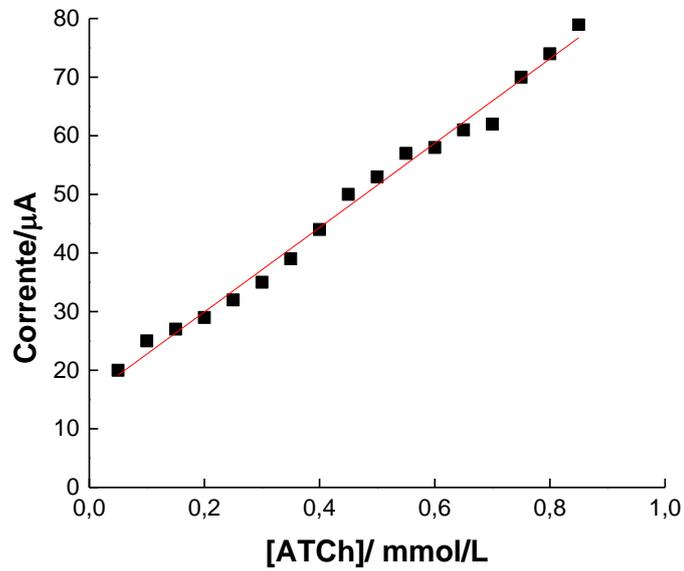


Fonte: Autor, 2016

É possível observar nas amostras proteicas mais complexas do extrato livre de células e o dialisado, amostras que não passaram por cromatografia, o sinal de tiocolina aparece em aproximadamente +690mV. Após a cromatografia (ChE1 e ChE2) o sinal de TCh está em torno de +600mV. Possivelmente o efeito do deslocamento de NTC para potenciais menores (DU, D. et al, 2009) foi mais evidente em amostras menos complexas, o que favorece a detecção diminuindo a quantidade de interferentes eletroativos. Observa-se também uma maior corrente de ChE2 do que em ChE1, talvez correlacionado a quantidade de BuChE imobilizada, pois tem sítio ativo mais volumoso (**Figura 6**) o que pode ser mais eficiente para hidrólise de ATCh em altas concentrações. A primeira onda na faixa de potencial entre +0,5V e 0,57V não é encontrado na literatura de biosensores a base de ChE. Visto que as amostras em estudo não tem um alto grau de pureza, pois ambas (ChE1 e ChE2) contem atividade AChE e BuChE. A amostra com maior quantidade de BuChE (53,04%) tem melhor resolução no primeiro sinal.

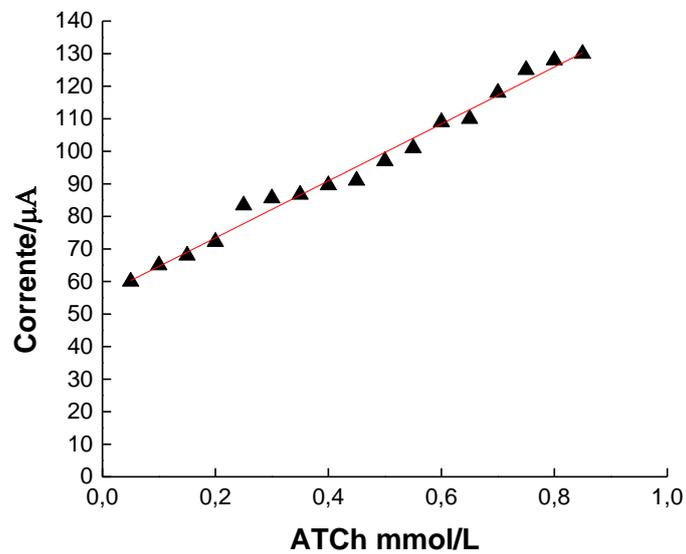
Para a determinação dos parâmetros analíticos dos resultados apresentados de Potencial/V vs Corrente μ A, foram plotados as curvas analíticas de ATCh/mmol/L vs Corrente μ A em ECV/NTCMP/Extrato livre de célula (**Figura 39**), Dialisado (**Figura 40**), ChE1 (**Figura 41**) e ChE2 (**Figura 42**).

Figura 39. Curva analítica ATCh/mmol/L vs Corrente μ A em ECV/NTCMP/Extrato livre de célula.



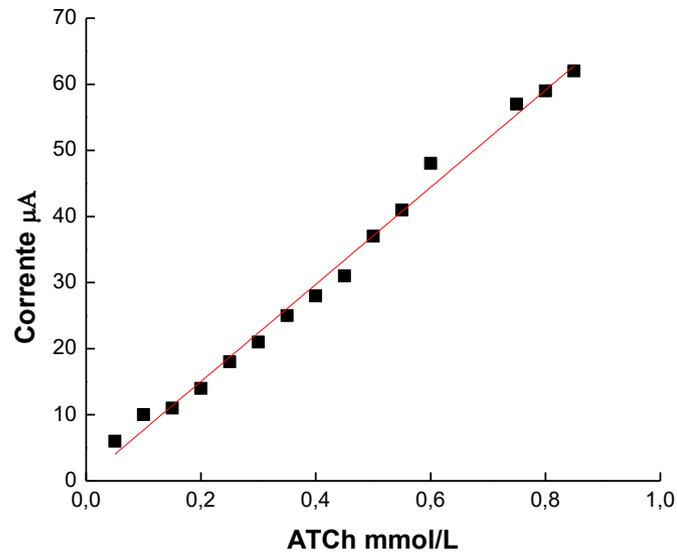
Fonte: Autor, 2016

Figura 40. Curva analítica ATCh/mmol/L vs Corrente μ A em ECV/NTCMP/Dialisado.



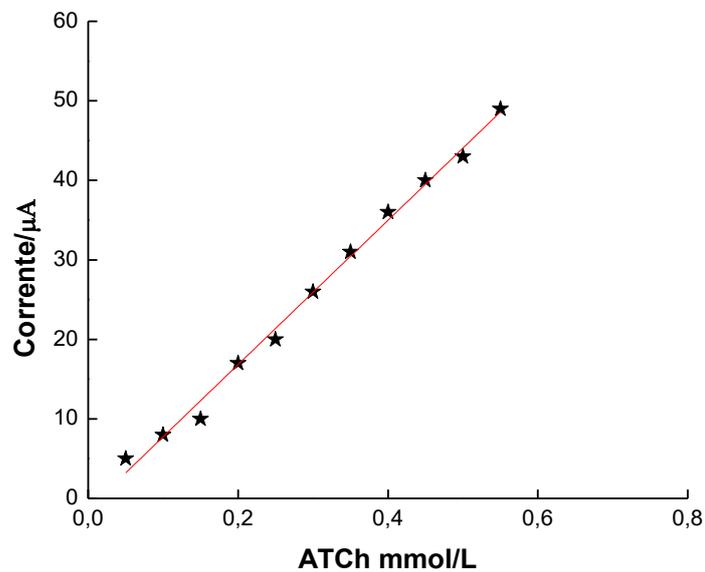
Fonte: Autor, 2016

Figura 41. Curva analítica ATCh/mmol/L vs Corrente μA em ECV/NTCMP/ChE1.



Fonte: Autor, 2016

Figura 42. Curva analítica ATCh/mmol/L vs Corrente μA em ECV/NTCMP/ChE2.



Fonte: Autor, 2016

As curvas analíticas apresentaram os valores de limite de detecção (LD) que expressam a menor concentração de TCh detectada e limite de quantificação (LQ)

expressando a concentração que pode ser determinada quantitativamente. A **Tabela 10** apresenta a equação da reta, LQ, LD e R de cada fração analisada.

Tabela 10. Resultados obtidos a partir das curvas analíticas para ATCh em ECV/NTCPM/Fração. A varredura se deu na faixa de potencial de 0,0 a +1,2V. Utilizando a técnica de VPD.

Fração	R	LD/mM	LQ/mM	Equação da reta ($y=a+bx$)
Livre de células	0,989	0,075	0,26	$1,55 \times 10^{-5} + 7,196 \times 10^{-5}x$
Dialisada	0,985	0,091	0,30	$5,589 \times 10^{-5} + 8,748 \times 10^{-5}x$
ChE1	0,991	0,073	0,24	$3,50 \times 10^{-7} + 7,344 \times 10^{-5}x$
ChE2	0,994	0,073	0,25	$-1,36 \times 10^{-6} + 9,072 \times 10^{-5}x$

Fonte: Autor, 2016

As curvas analíticas calculadas é um método analítico para determinar e discriminar a TCh de outros compostos que possam estar presentes no meio reacional como impurezas, produtos de degradação, metabólitos, ou outros componentes da matriz. A escolha do método para obter a resposta analítica quanto a especificidade baseia-se essencialmente, na habilidade do método para responder a uma única substância de interesse presente. Nos métodos eletroquímicos em particular, este parâmetro pode ser avaliado através da identificação do analito através dos valores de potenciais (E) eletroquímicos. Os valores das corrente de pico são diretamente proporcionais as concentrações das espécies analisadas podendo-se ser construídas curvas de calibração.

Analisando os gráficos de corrente de pico vs concentração do substrato ATCh (padrão), utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) para os eletrodos modificados com cada uma das frações, podemos observar que as correntes de pico aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração de TCh, apresentando linearidade em toda faixa de concentração estudada e que as frações referentes a ChE1 e ChE2, apresentaram uma maior linearidade. Os coeficientes de correlação de todas as frações estão representadas na **Tabela 10**, sendo ChE1 e ChE2 os que apresentaram valores de R mais altos. O limite de detecção (LD) e o

limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico, expressam as menores quantidades da espécie de interesse que podem ser detectadas e determinadas quantitativamente, respectivamente. Como pode-se observar, os resultados foram satisfatórios permanecendo as frações de ChE1 e ChE2 as que apresentaram menores valores.

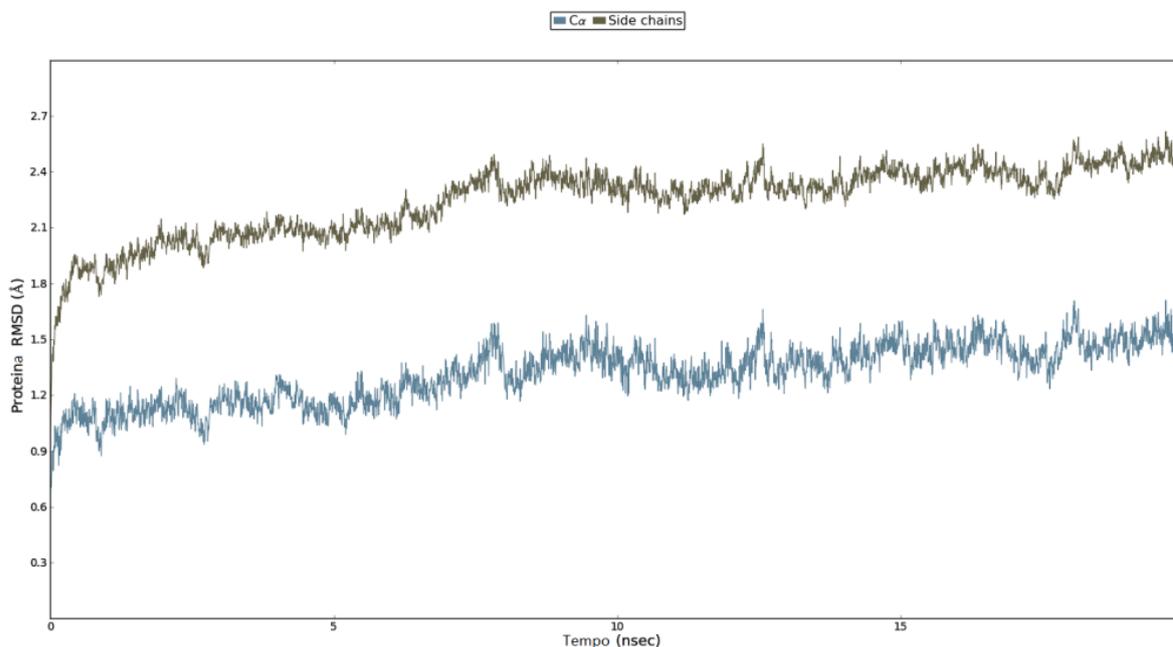
5.8 Modelo computacional

Afim de compreender melhor o uso de NTCPM como meio de imobilização de ChE por interações adosortivas, foram feitos estudos computacionais combinando simulações de dinâmica molecula com *docking* molecular, pois tem sido amplamente empregado como método de estudo das interações ligante-alvo (AJLOO et al., 2007, 2008, 2013, 2015).

5.8.1 Simulação computacional (*TcAChE*-NTCPM)

Para estabilidade de *TcAChE* em função do tempo de simulação, os valores de $C\alpha$ -RMSD e o movimento das cadeias laterais foram plotados para a avaliar a qualidade da trajetória da DM (**Figura 43**). A estrutura da *TcAChE* sofreu mudanças conformacionais, sendo uma maior oscilação observada para as cadeias laterais (1,2-2,6 Å).

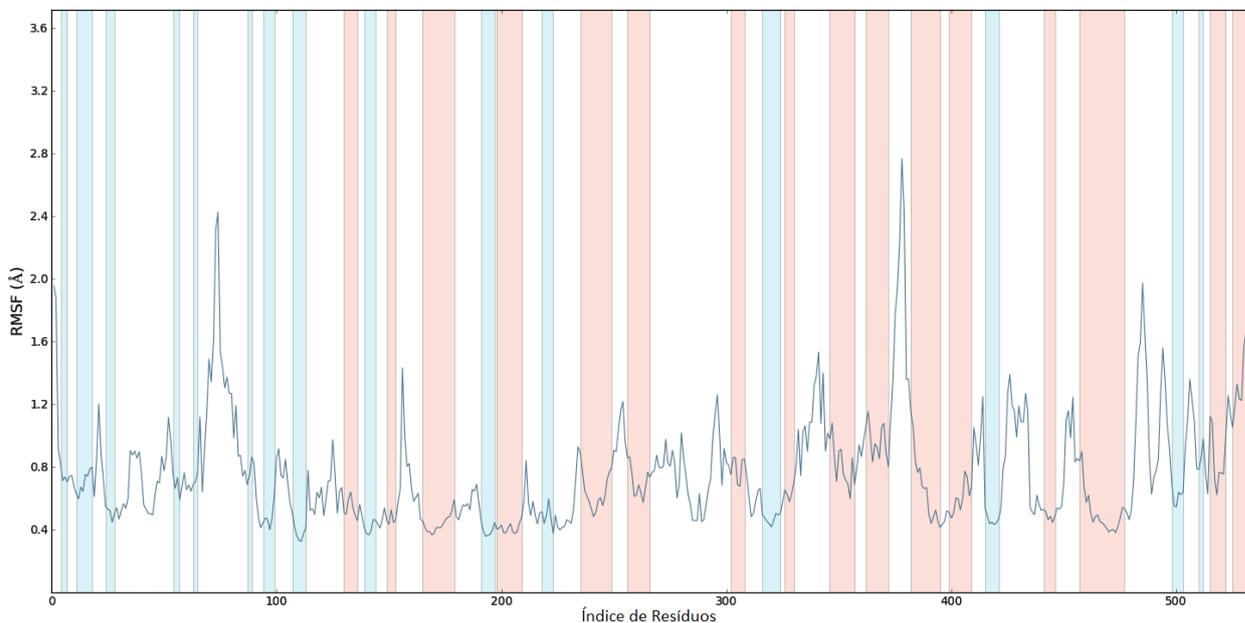
Figura 43. Evolução do tempo de simulação e sua influência sobre as cadeias laterais e carbonos alfa ($C\alpha$) para *TcAChE*. Em azul, deslocamento $C\alpha$; em castanho, deslocamento das cadeias laterais.



Fonte: Autor, 2016.

Em geral, é possível observar que com o avanço do tempo há maiores modificações conformacionais na enzima. Porém, observa-se que a certa estabilização das estruturas laterais e carbonos-alfas durante o período de 1 a 5 ns. Como consequência, pode ser afirmado que 5 ns de simulação é um tempo adequado para se obter uma estrutura nativa para a *TcAChE* e, posteriormente, realização de experimentos de docagem com segurança. Dessa forma, foi gerado um gráfico para observar a influência no tempo sobre as flutuações dos resíduos de aminoácidos pertencentes à *TcAChE* (*Root Mean Squared Fluctuations* - RMSF) (**Figura 44**). Basicamente, estas flutuações quantificam (em Å) o grau de liberdade que alguns aminoácidos apresentam em função do tempo de simulação, quando comparada com a estrutura original obtida no PDB. De modo geral, as zonas em branco significam que tais regiões não sofreram nenhuma alteração em relação à estrutura cristalina; zonas rosadas, alterações ocorridas, porém retornam ao estado original (estrutura cristalina); e por fim, as zonas azuladas mostram que ocorreram alterações significativas e que estas diferem do estado cristalino de *TcAChE*.

Figura 44. Flutuações dos aminoácidos observadas para *TcAChE* em função do tempo.

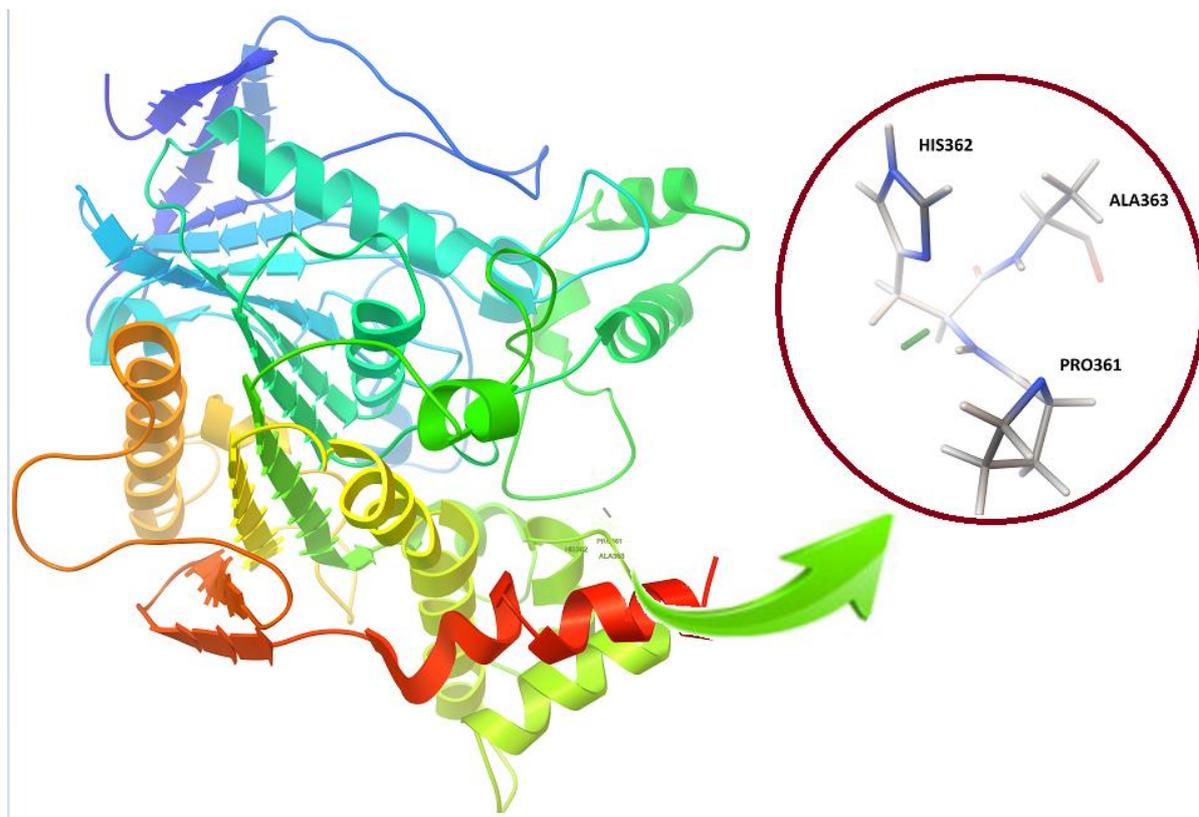


Fonte: Autor, 2016.

O gráfico acima fornece a valiosa informação da existência ou não de modificações relacionadas ao sítio ativo da enzima. Nesse caso, não foi observada nenhuma modificação estrutural nos aminoácidos que compõem o sítio catalítico da *TcAChE*, garantido uma maior segurança nos experimentos de *docking* molecular.

No *docking* molecular, após a obtenção da estrutura nativa da AChE por métodos de dinâmica molecular, o local da interação *TcAChE*-NTCPM foi determinada pelo AUTODOCK VINA. Foi observado que o NTCPM preferencialmente interage com uma região hidrofóbica composta por Pro361, His362 e Ala363 (Figura 4).

Figura 45. Complexo formado NTCPM (verde) e região de *TcAChE*.



Fonte: Autor, 2016.

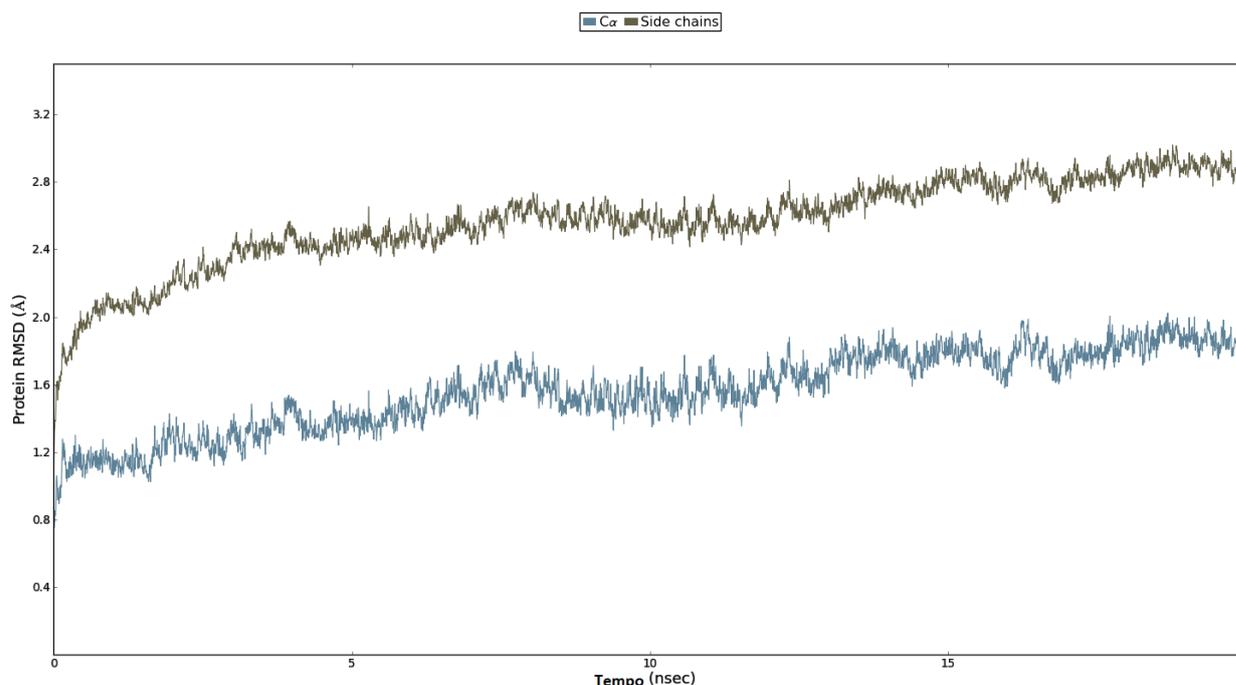
A região de interação Pro361, His362 e Ala363 (**Figura 45**) foi a região de maior probabilidade dentre outras possíveis interações. Na **Figura 44** é possível observar que tal região de interação é dominada pelas cores rosa e branco na estrutura de *TcAChE* nativa, sugerindo uma região de interação relativamente estável, favorecendo a cadeia polipeptídica em termos termodinâmicos, onde a entropia da molécula é mínima. Pois toda interação envolve o aumento de entropia do meio podendo causar perturbação estrutural da enzima, segundo Shemetov *et al.* 2012 a energia adicional pode ser reversível se a entropia adicional é menor do que a entropia do estado nativo da enzima, por outro lado se torna irreversível se o valor de entropia atinge o valor máximo crítico em que a enzima é desnaturada e pode formar agregados ou fibrilas. Desse modo a região de interação com NTCPM é favorável em termos energéticos, para a função de adsorção da enzima na superfície do eletrodo de trabalho. Além disso, NTCPM por ter superfície com um elevado grau de curvatura pode estabilizar enzimas em um ambiente fortemente desnaturante do que superfícies planas. A explicação desse fenômeno é que as interações laterais entre enzimas adjacentes (enzima-enzima) contribuem para a desativação da mesma,

essas interações são desfavorecidas por partículas com uma determinada curvatura (SHEMETOV, 2012).

5.8.2 Simulação computacional (*HuBuChE*-NTCPM)

Para estabilidade de *HuBuChE* em função do tempo de simulação, os valores de $C\alpha$ -RMSD e o movimento das cadeias laterais foram plotados para avaliar a qualidade da trajetória da DM (**Figura 46**). A estrutura da *HuBuChE* sofreu mudanças conformacionais, sendo uma maior oscilação observada para as cadeias laterais (1,5-2,9Å).

Figura 46. Evolução do tempo de simulação e sua influência sobre as cadeias laterais e carbonos alfa ($C\alpha$) para *HuBuChE*. Em azul, deslocamento $C\alpha$; em castanho, deslocamento das cadeias laterais.

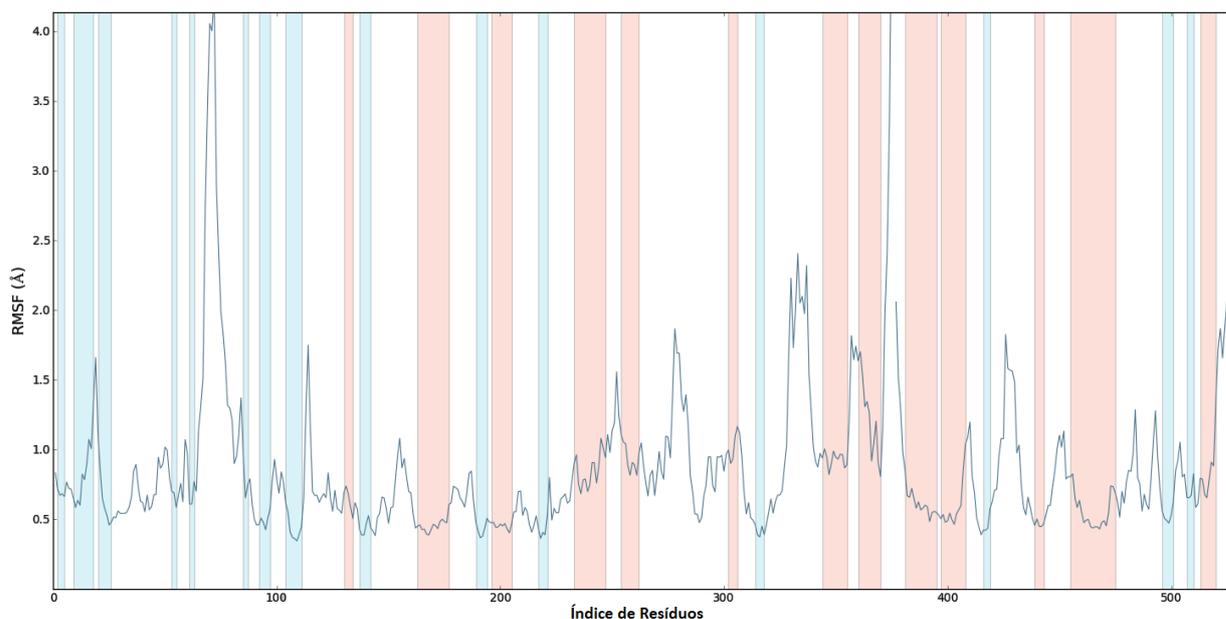


Fonte: Autor, 2016.

A estabilização das estruturas laterais e carbonos-alfa durante o período de 8 a 10 ns é o tempo adequado para se obter a estrutura nativa de *HuBuChE*, para seguir com o experimento de docagem. Foi gerado o gráfico para observar a influência no tempo sobre as flutuações dos resíduos de aminoácidos pertencentes à *HuBuChE* (*Root Mean Squared Fluctuations* - RMSF) (**Figura 47**). O grau de liberdade que os aminoácidos apresentam em função do tempo de simulação, são representadas por regiões no qual: zonas em branco significam que tais regiões não sofreram nenhuma

alteração em relação à estrutura cristalina; zonas rosadas, alterações ocorridas, porém retornam ao estado original (estrutura cristalina); e por fim, as zonas azuladas mostram que ocorreram alterações significativas e que estas diferem do estado cristalino de *HuBuChE*.

Figura 47. Flutuações dos aminoácidos observadas para *HuBuChE* em função do tempo.

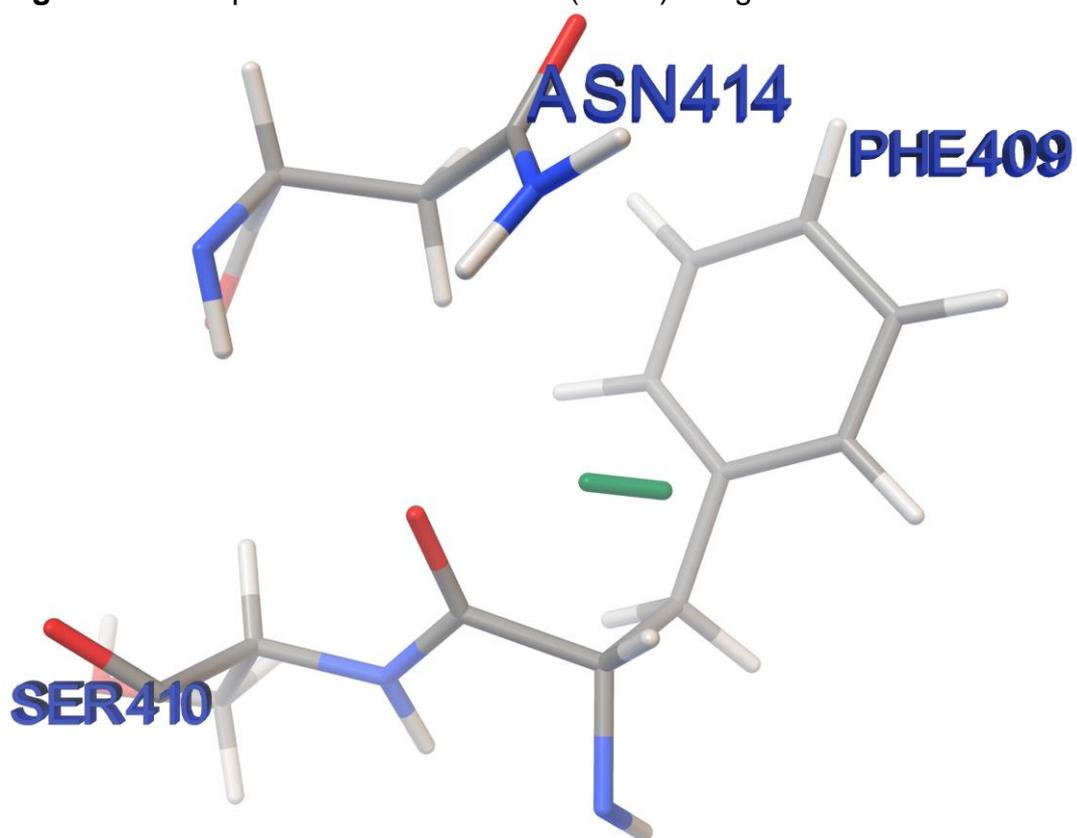


Fonte: Autor, 2016.

No gráfico acima não foi observada nenhuma modificação estrutural nos aminoácidos que compõem o sítio catalítico da *HuBuChE*, garantido uma maior segurança no experimento de *docking* molecular.

No *docking* molecular, após a obtenção da estrutura nativa da *HuAChE* por métodos de dinâmica molecular, o local da interação *HuAChE*-NTCPM foi determinada pelo AUTODOCK VINA. Foi observado que o NTCPM preferencialmente interage com a região Asn414, Phe409 e Ser410 (**Figura 48**), foi a região de maior probabilidade dentre outras possíveis interações. Na **Figura 47** é possível observar que tal região de interação está nas cores rosa e branco na estrutura de *HuBuChE*, sugerindo uma região com relativa estabilidade.

Figura 48. Complexo formado NTCPM (verde) e região de *HuBuChE*.



Fonte: Autor, 2016.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os estudos realizados foi possível mostrar vantagens na aplicação de dois métodos subsequentes de precipitação salina para ChE em cérebro de *P. Brevis*. O isolamento de ChE em Sephacryl S-100 foi caracterizada com atividade catalítica para as duas enzimas, AChE e BuChE, através da hidrólise dos substratos específicos, da sensibilidade por BW 28c51 nos estudos de inibição e elucidando uma banda da subunidade AChE de 67KDa.

Os testes eletroquímicos da imobilização de ChE nas etapas de purificação confirmaram que não é viável a aplicação de amostras complexas na superfície do eletrodo, pois foi evidente a melhora do sinal com amostras que passaram pela cromatografia. Também foi relatado que o uso de nanotubos de carbono na modificação do eletrodo beneficiou as análises eletroquímicas com deslocamento do potencial para valores menores, evitando interferentes eletroativos, mais evidente em ChE1 e ChE2. Corroborando com estes resultados a modelagem computacional de AChE e BuChE interagindo com NTCPM, mostrou ser um nanomaterial de adsorção favorável em termos energéticos e de estabilidade estrutural.

O desenvolvimento do protótipo de biosensor mostrou ser uma via atrativa para monitoramento ambiental, pois apresentou melhores limites de detecção em amostras mais puras, tornando o método mais rápido e econômico. Também não foi necessário o sacrifício de muitos espécimes de *P. Brevis* para o desenvolvimento do teste, contando com a possibilidade de regeneração de ChE, o biossensor pode ser aplicado diversas vezes para a detecção de contaminantes em ambientes aquáticos e alimentos.

REFERÊNCIAS

ANDREESCU, S.; MARTY, J. L.; Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications, **Biomolecular Engineering**, n. 23, p. 1-15, 2006.

ADRESI, Y. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance, **Turk J. Biochem**, v. 28, n. 2, p. 54-61. 2003.

AJLOO, D. *et al.* Kinetic, thermodynamic and statistical studies on the inhibition of adenosine deaminase by aspirin and diclofenac. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 22, n. 4, p. 395–406, 2007.

AJLOO, D. *et al.* Effects of surfactant, salt and solvent on the structure and activity of adenosine deaminase: Molecular dynamic and spectrophotometric studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 2, p. 151–158, 2008.

AJLOO, D. *et al.* Effect of two imidazolium derivatives of ionic liquids on the structure and activity of adenosine deaminase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, p. 47–61, 2013.

AJLOO, D. *et al.* Synthesis, characterization, spectroscopy, cytotoxic activity and molecular dynamic study on the interaction of three palladium complexes of phenanthroline and glycine derivatives with calf thymus DNA. **Inorganica Chimica Acta**, v. 430, p. 144–160, 2015.

ALDO, C.; BRAGA, B. **Doces no Brasil** - Capital Ecológico, Uso e Conservação. 2ª Edição Revisada e Ampliada. Escrituras. Capítulo 05 - Ecossistemas de Águas Interiores. São Paulo – 2002.

AMERSHAM BIOSCIENCES GROUP, **Gel filtration** - principles and methods, 18-1022-18 Edition AI.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH GROUP, **Gel filtration** – principles and methods 8th edition, 18-1022-18, ISBN 91-97-0490-2-6.

AMINE, A.; ARDUINI, F.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G.; Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 76, p.180-194, 2016.

BAS, D. C.; ROGERS, D. M.; JENSEN, J. H. Very fast prediction and rationalization of pka values for protein-ligand complexes. **Proteins: Struct Funct Bioinf**, v. 73, p. 765–783, 2008.

BENNION, B. J., *et al.* Modeling the binding of CWAs to AChE and BuChE. **Mil. Med. Sci. Lett.** (Voj. Zdrav. Listy). v. 82, n. 3, p. 102-114. 2013.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L., **Bioquímica** 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

BIO-RESOURCE, Hydrophobic interactions chromatography – Theory and Principle, disponível em: <http://pt.slideshare.net/ajithnandanam/hydrophobic-interaction-chromatography-hic-theory-and-principle>. acesso em: 01/03/2016.

BULSSOLARO, D.; Diferentes abordagens para a avaliação da exposição de peixes de água doce ao MeHg, PCBs, pesticidas organoclorados e nanopartículas de prata. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2010.

CALDAS, L. Q. A., Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos biperidílicos e piretróides. **Centro de Controle de Intoxicações**. p.5-12, 2000.

CHOUHARY, V.; GUPTA, A.; **Polymer/Carbon Nanotube Nanocomposites**. 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/carbon-nanotubes-polymer-nanocomposites/polymer-carbon-nanotubenanocomposites>. acesso em: 17/02/2016.

CHUIKO, G.M., PODGORNAYA, V.A., ZHELIMIN, Y.Y.. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. **Comp. Biochem. Physiol.,Part B: Biochem. Mol. Biol.** n. 135, p. 55-61, 2003.

COSTA, A. C. 2005. Alimentação da pirambeba *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae; Serrasalminae) em um reservatório do Sudeste brasileiro.

CODEVASF. Aquicultura: Codevasf se arma para a revolução azul. Plataforma para o futuro. Brasília. Instituto FNP, p. 48, 2006.

CORREA-BASURTO, J. *et al.* Docking and quantum mechanic studies on cholinesterases and their inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, n. 1, p. 10–19, 2007.

DING, Y., WU, X., FANG, J., Purification and characterization of acetylcholinesterase from brain tissues of *Oreochromis aurea* and its application in environmental pesticide monitoring, **Sciences in Cold and Arid Regions**, v. 3, n. 4, p. 339–343, DOI: 10.3724/SP.J.1226.2011.00339. 2011.

DONG, J.; FAN, X., QIAO, F.; SHIYUN, A.; XIN, H.; A novel protocol for ultra-trace detection of pesticides: Combined electrochemical reduction of Ellman's reagent with acetylcholinesterase inhibition. **Analytica Chimica Acta**. n. 761, p. 78-83, 2013.

DU, X. *et al.* Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. **Chemistry and Biology**, v. 7, n. 9, p. 733–742, 2000.

EVTUGYN, G. A; SHAMAGSUMOVA, R. V.; PADNYA, P. V.; STOIKOV, I. I.; Cholinesterase sensor based on glassy carbon electrode modified with Ag nanoparticles with macrocyclic ligands. **Talanta**. n.127, p. 9-7, 2014.

FANTA, E. *et al.* Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 2, p. 119-130, 2003.

GE healthcare lifescience, Size Exclusion Chromatography - Principles and Methods, 18-1022-18 AL.

GE healthcare lifescience, Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing - Principles and Methods, 11-0004-21.

HOUGHTON, P. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi Received (in Cambridge, UK) 20th December 2005. First published as an Advance Article on the web 1st February. **Natural Product Reports**. DOI: 10.1039/b508966m. 2006.

KATO, Y., TANAKA, T., MIYATA, T., 2004. Comparison of kinetic properties of a hydrophilic form of acetylcholinesterase purified from strains susceptible and resistant to carbamate and organophosphorus insecticides of green rice leafhopper (*Nephotettix cincticeps* Uhler). **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 79, n. 2, p. 64-73. [doi:10.1016/j.pestbp.2004.02.002]. 2004.

KAYA, H. B., OZCAN, B., SISECIOGLU, M., OZDEMIR, H.; Purification of acetylcholinesterase by 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine form Human Erythrocytes. **Appl Biochem Biotechnol**. n. 170, p. 198-209, 2013.

KAUR, J.; Protein Fractionation, Departament of Food Science Nutrition. 2014. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/jaspreetmaan/protein-fractionation>. Acesso em: 01/03/2016.

KHATTAB, A.D., *et al.*, 1993. Purification and immunological characterization of pigeon serum butyrylcholinesterase: implications on environmental monitoring and toxicological testing of birds. **Biochem. Pharm.**, v. 45, n. 5, p. 991-998, 1993. [doi:10.1016/0006-2952(93)90241-N]

LEGLER, P. M.; SOOJHAWON, I; MILLARD, C. B.; A conformational change in the peripheral anionic site of *Torpedo californica* acetylcholinesterase induced by a bis-imidazoliumoxime. **Biological Crytallografhy**. Edited by Z. S. Derewenda, University of Virginia, USA. journals.iucr.org/d. 2015.

LEONCINI, G. O.; Caracterização e estudos de inibição de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase no cérebro dos peixes curimatã (*Prochilodus Brevis*) e Pirambeba (*Serrasalmus brandti*), Monografia (Trabalho de conclusão de curso), Química bacharelado, Instituto de Química e Biotecnologia, 2014.

LI, S., JI, S., WANG, L., Study on the isolation, purification and the properties of cholinesterase from horse serum. **Sci. Technol. Food Ind.**, v. 27, n. 9, p. 91-93, 2006.

LIANG, F.; Human Acetylcholinesterase, part of an assignment for a graduate course in **Advanced Biochemistry and Molecular Biology** BCMB8010 at the University of Georgia.

LINS, J.A.P.N. *et al.* Uso de peixes como biomarcadores para o monitoramento de ambientes aquáticos. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambiental**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LIU, G., LIN, Y., **Anal.Chem** 78,835–843. 2006

LOPES, J. P.; SOUZA, J. G.; ROCHA, M. C. F. R.; Nova metodologia de hipofisectomia em curimatã *Prochilodus brevis* (Pisces, Prochilodontidae). **Rev. Bras. Eng. Pesca** v. 1, n. 1, 2006.

MAIA, E. L.; Composição química e classes de lipídios em peixe de água doce Curimatã comum, *Prochilodus cearenses*, v. 19, n. 3, 1999.

MARQUES, P. R. B.; YAMANASKA, H.; Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

MARTINS, S.E. BIANCHINI, A., Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management, **J. Environ. Monit.**, n. 13, p. 1866-1875. 2011.

MARTINY, V. Y. *et al.* Blind Pose Prediction, Scoring, and Affinity Ranking of the CSAR 2014 Dataset. **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. 151001125645007, 2015.

MASSOULIÉ, J., BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. Laboratoire de Neurobiologie, Ecole Normale Supérieure, Paris, 75005, **France. Ann. Rev. NeurosciL.** 1982.

MASSOULIÉ, J., The Origin of the Molecular Diversity and Functional Anchoring of Cholinesterases, **Neurosignals**. n. 11, p.130–143. 2002.

MOHAMED, M. A., ABDEL-GAWAD, A. S., GHAZY A. E. M.; Purification and characterization of an acetylcholinesterase from the infective juveniles of

Heterorhabditis bacteriophora. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C 146, p. 314-324, 2007.

MOHAMED, M. A., *et al.*; The activity of detoxifying enzymes in the infective juveniles of Heterorhabditis bacteriophora strains: Purification and characterization of tow acetylcholinesterase. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C 180, p. 11-22. 2016.

OLIVEIRA, J. F., Estrutura populacional da Curimatã *Prochilodus brevis* Steindachner, 1875 (Pisces: Characidae, Prochilodontidae) na lagoa de Apodi, RN. 2010.

OLSSON, M. H. M. et al. PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pka predictions. **Journal of Chemistry Theory Comput**, v. 7, p. 525–537, 2011.

PASCHOALINO, M. P., MARCONE, G. P. S., JARDIM, W. F., Os nanomateriais e a questão ambiental. **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 421-430, 2010.

PESSOA, E. K. R.; *et al.*, Diversidade de peixes e relação peso-comprimento da curimatã, *Prochilodus brevis*, Capturados nos rios curimataú, outeiro e espinho, da bacia curimataú/cunhaú, Rio Grande do Norte. XII Congresso de Ecologia do Brasil. 2015.

PEZZEMENTI, L., NACHON, F., CHATONNET, A., Evolution of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Vertebrates: An Atypical Butyrylcholinesterase from the Medaka *Oryzias latipes*, **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 17396. doi:10.1371/journal.pone.0017396, 2011.

PENG, X., *et al.*, Purification and characterization of acetylcholinesterase, a kind of pesticide target. **J. Sichuan Univ. (Nat. Sci. Ed.)**, v. 45, n. 1, p. 189-193, 2008.

SAGANE, Y., *et al.*, Molecular characterization of maize acetylcholinesterase. A novel enzyme Family in the Plant Kingdom. **Plant physiology**, v. 138, p. 1359-1371, 2005.

SANCHO, E. *et al.* Organophosphorus diazinon induced toxicity in the fish *Anguilla anguilla* L. **Comparative Biochemistry and Physiology** - Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology, v. 103, p. 351-356, 1992.

SAPTARSHI, S. R., DUSCHL, A., LOPATA, A. L., Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, n. 26, 2013.

SHAFFERMAN, A; *et al.*, Flexibility versus "rigidity" of the functional architecture of AChE active center. **Chemico-Biological interactions** n. 175, p. 166-172, 2008.

SILVA, M.V., *et al.*, Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterases from brain of neotropical fishes. **Toxicol.Lett.** n. 153, p. 247-254, 2004.

SNEJDARKOVA, M.; *et al.*, Acetylcholinesterase sensors based on gold electrodes modified with dendrimer and polyaniline A comparative research. **Analytica Chimica Acta**, n. 514, p. 79-88, 2004.

SUN, X.; WANG, X.; Acetylcholinesterase biosensor based on prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorus pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**. n. 25, p. 2611-2614, 2010.

SZEGLETES, T.; *et al.*, Substrate Binding to the Peripheral Site of Acetylcholinesterase Initiates Enzymatic Catalysis. Substrate Inhibition Arises as a Secondary Effect. **Received**, 1998.

TROTT, O.; OLSON, A. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

UNWIN, N.; Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. FEBS 27719. **FEBS Letters**, n. 555, p. 91-95, 2003.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n.2, p. 57-149, 2003.

VENTURA, A. L. M., ABREU, P. A. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. Revisão da literatura. **Rev. Psiq. Clín.**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

ZHANG, X., SHI, Y., ZHANG, H., A preliminary study of the purification acetylcholinesterase from human cerebellum by immuno-affinity chromatography. **J. First Mil. Med. Univ.**, v. 19, n. 2, p. 165-167, 1999.

ZHANG, Y., YANG, B., Separation and purification of Recombinant *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholinesterase from culture medium of genetic engineering, **Chinese Journal of Chromatography**, 2006.

ZHANG, W., ASIRI, A. M., LIU, D., DU, D., LIN, Y., Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents. **Trends Anal. Chem.** n. 54, p.1-10, 2014

ZHOU, Y., WANG, S. Catalytic Reaction Mechanism of Acetylcholinesterase Determined by Born Oppenheimer Ab Initio QM/MM Molecular Dynamics Simulations. Department of Chemistry, New York University, New York, New York 10003. **J. Phys. Chem.** n. 114, p. 8817–8825, 2010.

ZHU, K.Y., BRINDLEY, W.A., Molecular properties of acetylcholinesterase purified from *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 22, n. 3, p. 253-260. [doi:10.1016/0965-1748(92)90062-J]. 1992.

ZHU, K.Y., CLARK, M., Purification and characterization of acetyl-cholinesterase from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 24, n. 5, p. 453-461. [doi:10.1016/0965-1748(94)90040-X]. 1994.

ZHU, X.S., MENG, F.P., HE, D.H., Purification and partial biochemical characterization of acetylcholinesterase from *Scomberomorus Niphonius* (Cuvier). **J. Qingdao Univ. (E&T)**, v. 21, n. 2, p. 35-40, 2006.

WAYMIRE, J. C.; Acetylcholine Neurotransmission. Department of Neurobiology and Anatomy, The UT Medical School at Houston. 1997.

WENG, M. R.; FERNANDIS, A. Z.; A Manual for Biochemistry Protocols, manuals in biochemical research – Vol. 3. Jan-Thorsten Schantz series editor. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2007.

YANG, Y., NIU, L., LI, S., Purification and studies on characteristics of cholinesterases from *Daphnia magna*, **J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)**, v. 14, n. 4, p. 325-335, 2013.

ANEXO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió - AL, 25/08/2011

Senhor (a) Pesquisador (a), Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Sonia Maria Salgueiro
Jaqueline Maria da Silva
Fatima Lucia de Brito dos Santos

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 04/08/2011 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo n° 006258/2011-21 sob o título, *Avaliação da acetilcolinesterase (AChE) como biomarcador de pesticidas e herbicidas em peixes e no sedimento do Reservatório de Itaparica - Submódulo São Francisco*, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução n° 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o (a) pesquisador (a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

Ata Extraordinária Especial

Maceió em agosto de 2012