

Biomedicina e Farmácia: Aproximações

Fabício Loreni da Silva Cerutti

Cristiane Rickli Barbosa

Lais Daiene Cosmoski

(Organizadores)

 **Atena**
Editora

Ano 2018

Fabrcio Loreni da Silva Cerutti
Cristiane Rickli Barbosa
Lais Daiene Cosmoski
(Organizadores)

Biomedicina e Farmácia: Aproximações

**Atena Editora
2018**

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

B615	Biomedicina e farmácia: aproximações / Organizadores Fabrício Loreni da Silva Cerutti, Cristiane Rickli Barbosa, Lais Daiene Cosmoski. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018. Inclui bibliografia ISBN 978-85-85107-20-8 DOI 10.22533/at.ed.208182808 1. Biomedicina. 2. Ciências médicas. 3. Farmácia. I. Cerutti, Fabrício Loreni da Silva. II. Barbosa, Cristiane Rickli. III. Cosmoski, Lais Daiene. CDD 610
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

O conteúdo do livro e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2018

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

E-mail: contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Em ciências da saúde destacam-se as áreas de Farmácia e Biomedicina. Desta forma, torna-se imprescindível o conhecimento acerca de análise clínicas e biotecnologia de fármacos.

A Coletânea Nacional “A Biomedicina e Farmácia Aproximações” é um e-book composto por 21 artigos científicos que abordam assuntos atuais, como a análise de produtos naturais, biotecnologia de fármacos, processos de isolamento, purificação caracterização de elementos biotecnológicos de fontes naturais, avaliação da utilização de novas tecnologias para fins farmacêuticos, avanços em análises clínicas, entre outros.

Mediante a importância, necessidade de atualização e de acesso a informações de qualidade, os artigos elencados neste e-book contribuirão efetivamente para disseminação do conhecimento a respeito das diversas áreas da farmácia e da biomedicina, proporcionando uma visão ampla sobre esta área de conhecimento.

Desejo a todos uma excelente leitura!

Prof. MSc. Fabrício Loreni da Silva Cerutti

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO AÇAI (<i>EUTERPE OLERACEA</i>)	
<i>Maria Gabrielle de Oliveira Tabosa</i>	
<i>Jamicelly Rayanna Gomes da Silva</i>	
<i>Yasmim Dayane Leal Paixão</i>	
<i>Alane Alexandra da Silva Oliveira</i>	
<i>Maria Adriana Ferreira Farias</i>	
<i>Risonildo Pereira Cordeiro</i>	
<i>Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo</i>	
CAPÍTULO 2	9
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EXTRATOS DE <i>CYMBOPOGON CITRATUS</i> PARA PRODUÇÃO DE XAROPE COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	
<i>Marília Gomes dos Santos</i>	
<i>Maylldson Moreira de Andrade</i>	
<i>Cynthia Gisele de Oliveira Coimbra</i>	
<i>Risonildo Pereira Cordeiro</i>	
CAPÍTULO 3	19
EFEITOS TERAPÊUTICOS DO FRUTO DA ACEROLEIRA (<i>MALPIGHIA GLABRA L.</i>)	
<i>Brunna Larissa de Souza Melo Ferreira</i>	
<i>Maria Eduarda Silva Amorim</i>	
<i>Joice Luiza Pereira da Silva</i>	
<i>Maria Fernanda Ferreira de Lima</i>	
<i>Yago Eudvan Neves</i>	
<i>Vanessa Camylla Bernardo de Oliveira</i>	
<i>Risonildo Pereira Cordeiro</i>	
<i>Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo</i>	
CAPÍTULO 4	27
ESTUDO DO EFEITO CITOTÓXICO DA CURCUMINA EM PRESENÇA DE ANTIOXIDANTES SOBRE LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS HRT-18	
<i>Daniel Brustolin Ludwig</i>	
<i>Thaysa Ksiaskiewicz Karam</i>	
<i>Katia Sabrina Paludo</i>	
<i>Rubiana Mara Mainardes</i>	
<i>Najeh Maissar Khalil</i>	
CAPÍTULO 5	38
NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA CARAMBOLA (<i>AVERRHOA CARAMBOLA L.</i>) EM PACIENTES QUE APRESENTAM LESÃO RENAL	
<i>Yasmim Dayane Leal Paixão</i>	
<i>Jamicelly Rayanna Gomes da Silva</i>	
<i>Maria Eduarda Silva Amorim</i>	
<i>Joice Luiza Pereira da Silva</i>	
<i>Izabella Cinthia Tôrres de Vasconcelos</i>	
<i>Risonildo Pereira Cordeiro</i>	
<i>Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo</i>	

CAPÍTULO 6 45

TOXICIDADE DE *ECHINACEA PURPUREA* FRENTE À *ARTEMIA SALINA*

Denise Michelle Indras
Julio Cezar dos Santos
Priscila da Caz
Victor Mateus Prasniewski
Fernanda Coleraus Silva
Ana Maria Itinose

CAPÍTULO 7 53

CARACTERIZAÇÃO DE INFECÇÃO PULMONAR EXPERIMENTAL POR *PAECILOMYCES VARIOTII* EM ANIMAIS NORMAIS E IMUNOCOMPROMETIDOS

Isaac Loreiro Cabral
Izabela Virgínia Staffen
José Henrique Fermino Ferreira dos Santos
Thiago Oliveira dos Santos
Eduardo Alexandre Loth
Rafael Andrade Menolli

CAPÍTULO 8 63

LECTINAS VEGETAIS COMO FERRAMENTAS TERAPÊUTICAS: UMA REVISÃO

Juliete Lira de Souza Lima
Isabella Coimbra Vila Nova
Welton Aaron de Almeida
Jeine Emanuele Santos da Silva
Emmanuel Viana Pontual
Joaquim Evêncio Neto

CAPÍTULO 9 79

ABORDAGENS DAS DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

Suelem Leite da Silva
Dagoberto Riva
Simona Renz Baldin
Sônia de Lucena Mioranza

CAPÍTULO 10 90

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE FERRITINA E COLESTEROL LDL EM PACIENTES ATENDIDOS PELO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO OESTE DO PARANÁ

Fernanda Weyand Banhuk
Dayane Bassotto da Costa
Taimara Brustolin
Taise Regina Ficagna
Thiago Luiz Fucuta de Moraes

CAPÍTULO 11 98

OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ELLMAN PARA A DETERMINAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE EM ERITRÓCITOS

Fabiana Sari Ferreira
Fernanda Coleraus Silva
Ana Maria Itinose
Carla Brugin Marek

CAPÍTULO 12 104

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A STABILITY INDICATING HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF DAPAGLIFLOZIN IN TABLETS

Rafaela Zielinski Carvalho de Meira

Larissa Sakis Bernardi

Paulo Renato de Oliveira

CAPÍTULO 13 105

O EMPREGO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) NA DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PARA RASTREAMENTO DE DOENÇAS

Irthylla Nayalle da Silva Muniz

Alane Alexandra da Silva Oliveira

Izabella Cinthia Tôrres Vasconcelos

Júlia Samara Ferreira da Silva

Layza Fernanda Gomes Bezerra

Raíssa Ferreira Soares

José Carlos Bernardo da Silva Filho

Carlos Eduardo Miranda de Sousa

CAPÍTULO 14 110

EFICIÊNCIA DA MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *SPRAY DRYING*

Rosane Vaniski

Cristiane Canan

Deisy Alessandra Drunkler

CAPÍTULO 15 123

ANÁLISE DA QUALIDADE DE CÁPSULAS DE AMOXICILINA, COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE PALMARES –PE.

Letícia Emanuele de Farias Barros

Ádila Priscila Felix do Nascimento

Stephanny de Fátima Alves da Silva

Ana Catarina Simonetti

Risonildo Pereira Cordeiro

CAPÍTULO 16 132

ANÁLISE DA ROTULAGEM DE PRODUTOS NUTRACÊUTICOS CONTENDO ÔMEGA-3 COMERCIALIZADOS EM CELEIROS DA CIDADE DE CASCAVEL-PR

Simona Renz Baldin

Gabrielle Racoski Custódio

Jaqueline Franciele Caetano de Oliveira

Luciana Oliveira de Fariña

CAPÍTULO 17 143

INATIVAÇÃO DE CONSERVANTES DE CREMES COMERCIAIS CONTENDO PROBIÓTICOS PARA AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE SUA VIABILIDADE

Ana Caroline da Costa

Luciana Oliveira de Fariña

Suzana Bender

Helena Teru Takahashi Mizuta

CAPÍTULO 18	148
FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR LEVEDURAS PATOGÊNICAS	
<i>Izabel Almeida Alves</i>	
<i>Luciana Teresinha Adams Langer</i>	
<i>Raiza Lima do Carmo</i>	
<i>Keli Jaqueline Staudt</i>	
CAPÍTULO 19	169
BIOSSEGURANÇA NOS CENTROS DE EMBELEZAMENTO E ESTÉTICA DO MUNICÍPIO DE CASCAVEL- PR	
<i>Vanessa Bordin</i>	
<i>Débora Cristina Ignácio Alves</i>	
<i>Leda Aparecida Vanelli Nabuco de Gouvêa</i>	
<i>Maristela Salete Maraschin</i>	
CAPÍTULO 20	180
DESENVOLVIMENTO DE PLANO OPERATIVO PARA PROMOÇÃO DO USO RACIONAL DE ANTIMICROBIANOS NA FARMÁCIA BÁSICA DE UM MUNICÍPIO DO MARANHÃO: RELATO DE EXPERIÊNCIA	
<i>Nágila Caroline Fialho Sousa</i>	
<i>Isabella Fernandes da Silva Figueiredo</i>	
<i>Mizael Calácio Araújo</i>	
<i>Saulo José Figueiredo Mendes</i>	
CAPÍTULO 21	190
AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE DESINFECÇÃO DE ARTIGOS SEMICRÍTICOS EM UM HOSPITAL ESCOLA	
<i>Jéssica Rosin</i>	
<i>Fabiana Gonçalves de Oliveira Azevedo Matos</i>	
<i>Debora Cristina Ignácio Alves</i>	
<i>Fabiana Severino Kupka</i>	
<i>Jéssica Martins Valter</i>	
<i>Adriana Souza</i>	
SOBRE OS ORGANIZADORES	201

OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ELLMAN PARA A DETERMINAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE EM ERITRÓCITOS

Fabiana Sari Ferreira

Universidade Estadual do Oeste do Paraná –
UNIOESTE
Cascavel – Paraná

Fernanda Coleraus Silva

Laboratório de Toxicologia Celular - UNIOESTE
Cascavel – Paraná

Ana Maria Itinose

Centro de Assistência em Toxicologia – CEATOX/
HUOP
Cascavel - Paraná

Carla Brugin Marek

Laboratório de Toxicologia Celular - UNIOESTE
Cascavel – Paraná

RESUMO: Alguns agrotóxicos como os carbamatos e organofosforados podem levar a quadros graves de intoxicação devido a inibição das colinesterases, sendo que uma das formas de auxiliar no diagnóstico é a determinação da atividade destas enzimas no sangue. Porém, algumas condições metodológicas são importantes para o ideal desempenho das enzimas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar possíveis condições que otimizem a metodologia proposta por Ellman e colaboradores a fim de alcançar uma melhor reprodutibilidade. O método foi adaptado para a determinação da atividade da acetilcolinesterase em eritrócitos. Foram

testadas algumas possibilidades de interferência nos resultados, como o comprimento de onda espectrofotométrico, temperatura, tempo de incubação, diluição e agitação da amostra. A atividade enzimática da acetilcolinesterase mostrou-se variável, conforme as mudanças ocorridas, após diferentes condições estabelecidas para a reação. Foi possível perceber que as amostras sob agitação e aquelas submetidas a incubação, apresentaram resultados mais homogêneos, diminuindo o erro padrão. A temperatura e o comprimento de onda também apresentaram considerável influência na atividade enzimática. As amostras completamente misturadas em seu meio de reação durante o preparo, expressaram menor dispersão entre os resultados das triplicatas. Desta forma, sugerimos uma agitação vigorosa da solução antes das leituras das absorbâncias para obtenção de melhores resultados, além da temperatura controlada em 37°C durante as leituras em espectrofotômetro a 405nm.

PALAVRAS-CHAVE: atividade enzimática, colinesterase, interferentes.

ABSTRACT: Some pesticides such as carbamates and organophosphates cause serious poisonings because of the inhibition of cholinesterases. One way to diagnosis those cases is through the determination of enzyme activity in the blood. However, some conditions

are important for the best performance of the enzymes. Thus, this work aimed to evaluate possible conditions to improve the methodology proposed by Ellman and collaborators in 1961. The method was adapted for the determination of erythrocyte acetylcholinesterase activity. Some possibilities of interfering in the results were tested, such as spectrophotometer wavelength, temperature, incubation time, dilution of sample and shaking. The enzymatic activity of erythrocyte acetylcholinesterase was shown to be variable as the changes occurred after different conditions established for the reaction. The samples under agitation and those submitted to incubation showed results more homogeneous, reducing the standard error. Temperature and wavelength also had considerable influence on erythrocyte acetylcholinesterase activity. The samples that were best mixed with the buffer during the preparation expressed less dispersion among the results of the triplicates. Thus, we suggest a vigorous solution shaking before readings the absorbance for better results, in addition is necessary to control temperature at 37°C during spectrophotometer readings at 405nm.

KEY WORDS: enzymatic activity, cholinesterase, interference.

1 | INTRODUÇÃO

Os neurônios são células do sistema nervoso especializadas na captação e transmissão de estímulos internos ou externos. Essa transmissão de informações, de modo geral, acontece através de sinapses, onde os estímulos passam de um neurônio para o outro através da reação de um neurotransmissor ou mediador químico com os receptores na membrana pós-sináptica (GUYTON & HALL, 2006).

Os receptores colinérgicos são divididos em dois grupos, os nicotínicos e os muscarínicos, os quais são formados por canais iônicos regulados por ligantes, neste caso a acetilcolina, que atua como o neurotransmissor. Esta é liberada na fenda sináptica, através de um potencial de ação. Uma vez na fenda sináptica, a acetilcolina precisa ser removida de forma rápida para que ocorra a repolarização. Em seguida, ocorre a sua hidrólise em acetato e colina catalisada pela acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7) (SILVA, 2010).

A acetilcolinesterase é, portanto, uma importante enzima responsável na manutenção do sistema colinérgico ao catalisar a hidrólise da acetilcolina. Essa reação catalítica acontece por meio de um mecanismo envolvendo diversos passos que permitem a cessação do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas (ZHOU, WANG & ZHANG, 2010). Sua elevada atividade no sistema nervoso central se faz característica, atuando principalmente nos neurônios motores e sensoriais. No entanto, como todo o organismo é dependente da neurotransmissão para o seu bom funcionamento, a acetilcolinesterase também é encontrada em outros tecidos, tanto centrais como periféricos (MASSOULIE et al., 1993).

Assim, quando há inibição das colinesterases, a hidrólise da acetilcolina fica comprometida, fazendo com que os níveis deste neurotransmissor fiquem elevados, e conseqüentemente haja aumento do seu tempo de duração na fenda sináptica.

Tal acontecimento pode levar a constante estímulo dos receptores colinérgicos (NORDBERG & SVENSSON, 1998). Alguns agrotóxicos como os carbamatos e organofosforados podem levar a quadros graves de intoxicação devido a inibição das colinesterases e, uma das formas de diagnóstico é através da determinação da atividade destas enzimas no sangue (ROBERTS & REIGART, 2013).

Para isto, um método espectrofotométrico foi proposto por Ellman et al. (1961) que, através da reação de hidrólise da acetilcolina catalisada pela acetilcolinesterase, forma-se tiocolina e acetato. A atividade da enzima pode ser medida através do aumento da coloração amarela produzida pela tiocolina quando esta reage com 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoico), também conhecido como DTNB ou Reagente de Ellman.

O método em questão traz como procedimento a adição de solução tampão fosfato em um tubo de ensaio com DTNB, na sequência a adição da amostra (fonte de enzima) e, logo em seguida, adicionado o substrato de acetiltiocolina. Para a determinação da atividade, a leitura da absorbância deve ser realizada em espectrofotômetro a 405nm a 37°C a cada 30 segundos, durante dois minutos (ELLMAN et al., 1961).

Como as enzimas podem ser facilmente desnaturadas, algumas importantes condições são necessárias para a eficiência da reação. A regulação da atividade enzimática depende de fatores como o tempo de exposição, pH e temperatura para o seu ideal desempenho durante a catalise das reações (LEHNINGER & NELSON, 2006). Assim, apesar dos autores informarem as condições para o sucesso das análises, a variação nos resultados de uma mesma amostra causa transtornos nas análises, por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar possíveis condições que possam otimizar a metodologia desenvolvida por Ellman et al. (1961) a fim de melhorar a reprodutibilidade dos ensaios.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

No método descrito por Ellman et al. (1961), foi preparada uma suspensão estável a partir de sangue total ou eritrócitos humanos lavados; não sendo necessária a hemólise, pois a acetilcolinesterase encontra-se ancorada na membrana celular. Para o ensaio, foi feita uma suspensão das células sanguíneas em tampão fosfato (pH 8,0) na proporção de 1:600 (por exemplo, 10 µL de sangue para 6 mL de tampão) e, exatamente 3,0 mL desta suspensão foram pipetados em uma cubeta. Na sequência, 25 µL de DTNB foram adicionados na cubeta e esta colocada no espectrofotômetro para leitura em 412 nm. Para que a reação fosse iniciada, foi colocado 10 µL de substrato para acetilcolinesterase e as mudanças na leitura da absorbância foram registradas durante 6 minutos.

Porém, em 1983, os autores George & Abernethy aprimoraram o método citado acima para que pudesse ser utilizado em espectrofotômetros de qualidade moderada em laboratórios de rotina. Pois o pico de absorbância do resultado da reação com DTNB coincide com a banda de hemoglobina em 410 nm, levando a baixa precisão

do teste e se restringindo a laboratórios com equipamentos de alta relação sinal-ruído.

Apesar do referido método já ter sido revisado, foi necessário investigar os possíveis motivos que causam dispersão entre os resultados de uma mesma amostra. Para isto, foi preparado um lavado de sangue com tampão fosfato (pH 7,2) na proporção 1:10. Deste, 2,5 μ L foram adicionados a um tubo de ensaio contendo tampão fosfato (pH 8,0) com DTNB e, em seguida, adicionou-se 50 μ L do substrato de acetilcolina para dar início à reação.

Devido a sensibilidade da enzima, algumas condições específicas foram propostas: (a) temperatura de 25°C e 37°C, (b) incubação em 2,5 e 10 minutos, (c) amostra diluída na proporção 1:2, (d) amostra diluída sob agitação, (e) e ainda, leituras das absorbâncias em 405 nm e 436 nm.

As leituras foram feitas a cada 30 segundos, durante dois minutos. E para fins de comparação, foi realizado um teste com a amostra controle conforme as condições iniciais da metodologia.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme os resultados apresentados na figura 1, percebe-se claramente a influência da temperatura nos resultados apresentados, sendo 37°C a temperatura mais apropriada para a determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase, onde os resultados entre as amostras mostraram-se mais homogêneos.

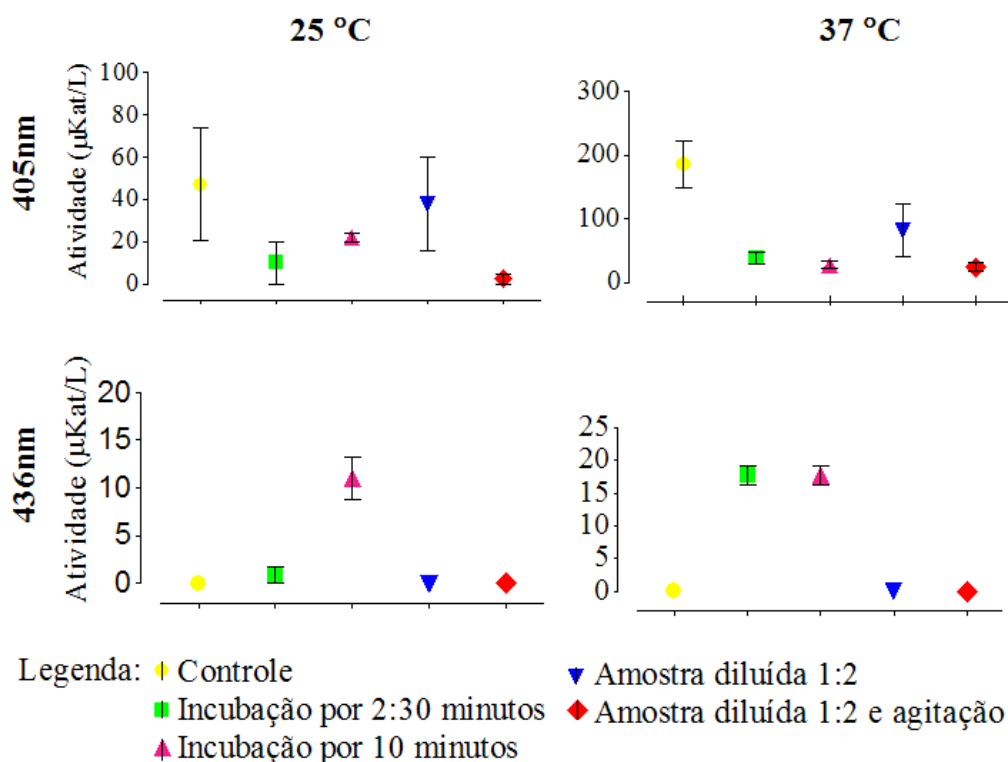


Figura 1 – Atividade da acetilcolinesterase eritrocitária, após diferentes condições de reação.

Os resultados dos testes que foram realizados conforme a metodologia proposta,

porém com a amostra diluída, com a finalidade de minimizar os interferentes, não tiveram grandes mudanças quando comparados com a amostra controle, podendo perceber uma grande variação entre os resultados das triplicatas. Porém, nota-se que, embora com atividade da enzima reduzida nas amostras diluídas, a vigorosa agitação antes do início da reação, levou a menor variação entre as triplicatas.

Observou-se também que, quando a amostra foi submetida a incubação durante 2:30 ou 10 minutos com solução tampão antes do início da reação, a variação entre os resultados das triplicatas da amostra diminuiu. Isso mostrou que, apesar da atividade da acetilcolinesterase variar conforme as diferentes condições estabelecidas para a reação; nas amostras sob agitação e naquelas submetidas a incubação, os valores da atividade enzimática mostraram-se mais homogêneos, conseqüentemente com menor erro padrão.

Provavelmente, a homogeneidade dos resultados das amostras submetidas a incubação deve-se a maior exposição da enzima com a solução tampão, pois sempre que as amostras ficavam em banho-maria, automaticamente elas eram melhor homogeneizadas. Esta condição foi observada pois era necessário verter a solução do tubo de ensaio para a cubeta. A importância do fator agitação pode-se ser confirmada quando comparado com os experimentos realizados anteriormente por Fleuri & Sato (2008) que verificaram a influência da agitação, além do controle do pH e temperatura quando se trabalha com enzimas.

Além disso, foi testado o comprimento de onda de 405 nm conforme metodologia de Ellman adaptada por Georbe & Abernethy (1983) e 436 nm, pois de acordo com Worek et al. (1999), a interferência produzida pela absorção da hemoglobina é diminuída nesta faixa. Confirmou-se que o comprimento de onda interfere diretamente nos resultados. Porém, no presente estudo, o comprimento de onda de 436 nm, na maioria das amostras, incluindo as amostras controles, tiveram as suas atividades reduzidas praticamente a zero conforme mostra a tabela 1, indicando 405 nm como comprimento de onda mais adequado para a leitura das absorbâncias na reação para avaliar a atividade da acetilcolinesterase em eritrócitos.

		25° Celsius					37° Celsius				
		Cont.	I 2,5'	I 10'	D1:2	D1:2 +A	Cont.	I 2,5'	I 10'	D1:2	D1:2 +A
405nm		0,00	30,48	25,40	22,86	7,62	137,16	50,80	22,86	157,48	33,02
		91,44	0,00	17,78	81,28	0,00	259,08	20,32	20,31	71,12	10,16
		50,80	0,00	22,86	10,16	0,00	160,02	43,18	38,10	17,78	27,94
436nm		0,00	0,00	7,62	0,00	0,00	0,00	20,32	15,24	0,00	0,00
		0,00	0,00	15,27	0,00	0,00	0,00	17,78	17,78	0,00	0,00
		0,00	2,54	10,16	0,00	0,00	0,00	15,24	20,32	0,00	0,00

Tabela 1 – Leitura das triplicatas referentes a atividade da acetilcolinesterase eritrocitária expressa em $\mu\text{Kat/L}$, após exposição da enzima em diferentes condições de reação e leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de 405 e 436 nm.

Cont.: Controle; I 2,5': Incubação por dois minutos e trinta segundos; I 10': Incubação por 10 minutos; D1:2:

Amostra diluída na proporção 1:2; D1:2 +A: Amostra diluída na proporção 1:2 e submetidas a agitação.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

As especificações do procedimento a ser seguido é de suma importância para a reprodutibilidade dos ensaios, porque podemos confirmar a interferência dos detalhes nos resultados finais. As amostras que foram melhor homogeneizadas em seu meio de reação durante o preparo, apresentaram menor dispersão entre os resultados das triplicatas. Desta forma, sugerimos a agitação vigorosa da solução antes das leituras das absorbâncias para obtenção de melhores resultados, além da temperatura de 37°C que deve ser controlada durante todo o tempo da reação e as leituras devem ser feitas em espectrofotômetro a 405nm conforme sugerido anteriormente.

REFERÊNCIAS

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochemical pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. **Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas.** *Food Science and Technology* (Campinas), 2008.

GEORGE, P. M.; ABERNETHY, M. H. **Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase.** *Clinical chemistry*, v. 29, n. 2, p. 365-368, 1983.

GUYTON, Arthur Clifton; HALL, John E.; GUYTON, Arthur C. **Tratado de fisiologia médica.** Elsevier Brasil, 2006.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F. M. **Molecular and cellular biology of cholinesterases.** *Progress in neurobiology*, v. 41, n. 1, p. 31-91, 1993.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. LEHNINGER. **Principles of biochemistry.** Macmillan, 2008.

NORDBERG, A.; SVENSSON, A. **Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease.** *Drug safety*, v. 19, n. 6, p. 465-480, 1998.

ROBERTS J.R. & REIGART R. **Recognition and Management of Pesticide Poisonings.** 6. ed. United States Environmental Protection Agency. Washington. 2013.

SILVA P. **Farmacologia.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 131:252, 2010.

WOREK, F.; MAST, U.; KIDERLEN, D.; DIEPOLD, C.; EYER, P. **Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood.** *Clinica Chimica Acta*, v. 288, n. 1-2, p. 73-90, 1999.

ZHOU, Y.; WANG, S. & ZHANG, Y. **Catalytic Reaction Mechanism of Acetylcholinesterase Determined by Born – Oppenheimer Ab Initio QM/MM Molecular Dynamics Simulations.** *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, n. 26, p. 8817-8825, 2010.

SOBRE OS ORGANIZADORES

Fabício Loreni da Silva Cerutti Coordenador de Curso do Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais (CESCAGE). Professor adjunto do Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico (ILAPEO). Tecnólogo em Radiologia pela Universidade Tecnologia Federal do Paraná (UTFPR). Mestre e doutorando em Engenharia Biomédica pelo programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial (CPGEI) da UTFPR. Possui experiência com o desenvolvimento de pesquisas na área de diagnóstico por imagem, física nuclear, controle de qualidade e simulação computacional.

Cristiane Rickli Barbosa Professora adjunta do Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais (CESCAGE), nos cursos de Tecnologia em Radiologia e Bacharelado em Fisioterapia. Professora adjunta da Unicesumar (Unidade Ponta Grossa), no curso de Bacharelado em Biomedicina. Bacharel em Biomedicina pela Unicesumar (Unidade Maringá). Mestre e Doutoranda em Ciências Farmacêuticas pelo programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa. Possui experiência no desenvolvimento de pesquisas na área de análises clínicas e avaliação de processos fisiopatológicos.

Lais Daiene Cosmoski Professora adjunta do Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais (CESCAGE), nos cursos de Tecnologia em Radiologia e Bacharelado em Farmácia. Analista clínica no Laboratório do Hospital Geral da Unimed (HGU). Bacharel em Biomedicina pelas Universidades Integradas do Brasil (UniBrasil). Especialista em Circulação Extracorpórea pelo Centro Brasileiro de Ensinos Médicos (Cebramed) Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPG. Possui experiência com o desenvolvimento de pesquisas na área de avaliação clínico/laboratorial de processos fisiopatológicos.

Agência Brasileira do ISBN

ISBN 978-85-85107-20-8



9 788585 107208