



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

## **Utilização de Enzimas em Análises Clínicas – Uma Revisão da Literatura**

**AUTORA: FERNANDA LORENA GARCEZ BARBOSA MARES**

**ORIENTADORA: ISABEL CRISTINA BRAGA RODRIGUES**

**Ouro Branco - MG  
Dezembro/2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

## **Utilização de Enzimas em Análises Clínicas – Uma Revisão da Literatura**

**Fernanda Lorena Garcez Barbosa Mares**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao como requisito parcial às exigências do curso de Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João Del Rei.

**Ouro Branco - MG  
Dezembro/2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

## **Utilização de Enzimas em Análises Clínicas – Uma Revisão da Literatura**

Fernanda Lorena Garcez Barbosa Mares

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

---

Isabel Cristina Braga Rodrigues – Orientadora

---

Edson Romano Nucci – Examinador 1

---

Natália Rocha Barboza – Examinador 2

**Ouro Branco, 11/12/2015**

## **RESUMO**

O presente trabalho aborda as principais características das enzimas que as tornam de grande interesse no setor farmacêutico e, principalmente, na área de análises e diagnóstico clínico. Características como, alta especificidade, elevado grau de pureza, baixa antigenicidade e estabilidade em condições fisiológicas são tratadas. Serão apresentados os principais métodos enzimáticos de ensaio em análises clínicas, sendo abordadas as vantagens, limitações e perspectivas no mercado da utilização de enzimas. Dessa forma, será discutido a utilização das enzimas como agentes terapêuticos, ou seja, as enzimas são utilizadas como medicamentos; enzimas produtoras de fármacos, onde elas são utilizadas na síntese de remédios; enzimas cujos níveis são avaliados para diagnósticos clínicos de doenças, ou seja, quando alguma pessoa está com determinada doença as atividades de certas enzimas aumentam ou diminuem; enzimas utilizadas como marcadores em imunodiagnóstico e métodos enzimáticos de ensaio em análises clínicas, em que as enzimas são usadas como reagentes na dosagem de substâncias presentes nos fluidos biológicos, como o sangue.

Palavras chaves: enzimas; diagnóstico; análises clínicas; farmacêutica;

## **SUMÁRIO**

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                              | 6  |
| 2. OBJETIVO.....                                                                 | 8  |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA.....                                                    | 9  |
| 3.1 Histórico do uso de enzimas em análises clínicas .....                       | 10 |
| 3.2 Micro-organismos - principais produtores de enzimas .....                    | 11 |
| 3.3 Importância das enzimas na área farmacêutica.....                            | 13 |
| 3.4 Enzimas como agentes terapêuticos .....                                      | 14 |
| 3.5 Enzimas na produção de medicamentos .....                                    | 17 |
| 3.6 Enzimas marcadoras em imunodiagnóstico.....                                  | 20 |
| 3.7 Enzimas cujos níveis são avaliados para diagnóstico clínico de doenças ..... | 26 |
| 3.8 Métodos enzimáticos de ensaio em análises clínicas.....                      | 30 |
| 3.9 Vantagens e limitações da utilização de enzimas em diagnóstico clínico ..... | 38 |
| 3.10 Situação do mercado e perspectivas .....                                    | 39 |
| 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                                    | 40 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                              | 41 |



## 1. INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas com propriedades catalisadoras sobre as reações que ocorrem nos sistemas biológicos, aceleram reações específicas sem serem alteradas ou consumidas durante o processo, além de possuírem elevado nível de especificidade sobre seus substratos (MOTTA, 2009). Esses biocatalisadores biológicos podem ser extraídos de tecidos animais, vegetais e de micro-organismos. Embora as enzimas obtidas de fontes vegetais e animais terem sido muito utilizadas, as de origem microbiana são atualmente mais empregadas, devido ao fato dos micro-organismos serem facilmente manipulados. Cada vez mais se necessita de processos industriais que utilizam enzimas como catalisadores ou o melhoramento do desempenho na catálise de enzimas já conhecidas. A busca de micro-organismos que possam produzir enzimas é constante e diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis hoje para utilização nesse processo (MONTEIRO, SILVA, 2009).

Uma área de grande interesse na aplicação das enzimas é a área de diagnósticos e análises clínicas. Estas enzimas são utilizadas diretamente em componentes de *kits* diagnósticos para a determinação de diferentes substâncias. Algumas doenças são decorrentes de erros do metabolismo devido a deficiências enzimáticas ou até mesmo a ausência total de uma ou mais enzimas. Outras anormalidades também podem ocorrer pela excessiva atividade de uma enzima no organismo, sendo a medida da atividade sanguínea importante para diagnosticar estas doenças, especialmente no caso de doenças hepáticas, cardíacas, ósseas, musculares e pancreáticas. Em alguns processos patológicos, as enzimas contribuem para estabelecer a causa, localização e grau de extensão da lesão, para fazer o controle do tratamento e ainda para determinar a cura. Dessa forma, as enzimas aplicadas pela indústria farmacêutica e em diagnóstico clínico podem ser abordadas da seguinte forma: (i) enzimas como agentes terapêuticos; (ii) enzimas produtoras de fármacos, (iii) enzimas cujos níveis são avaliados para diagnósticos clínicos de doenças, (iv) enzimas utilizadas como marcadoras em imunodiagnóstico e (v) enzimas utilizadas em métodos enzimáticos de ensaio em análises clínicas (AEHLE, 2007).

De acordo com os diversos avanços da utilização de enzimas na área farmacológica, o presente trabalho fará uma breve revisão sobre as aplicações de enzimas na indústria farmacêutica e, principalmente, na área de diagnóstico e análises clínicas, na qual a principal vantagem é a possibilidade de analisar uma substância específica a partir de amostras biológicas, sem a necessidade de isolamento, simplificando o processo, diminuindo o tempo de análise e garantindo a confiabilidade dos resultados. Elementos essenciais quando se trata da identificação de um processo patológico, no qual a eficiência e agilidade no diagnóstico são fundamentais para o sucesso do tratamento.

## **2. OBJETIVO**

Este trabalho possui como objetivo abordar as principais aplicações de enzimas na indústria farmacêutica e na área de diagnóstico clínico. Serão abordadas as seguintes aplicações:

- Enzimas como agentes terapêuticos;
- Enzimas produtoras de fármacos;
- Enzimas cujos níveis são avaliados para diagnósticos clínicos de doenças;
- Enzimas utilizadas como marcadoras em imunodiagnóstico;
- Métodos enzimáticos de ensaio em análises clínicas.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

As enzimas possuem funções na catálise das reações químicas que, sem sua presença, aconteceriam a uma velocidade muito baixa. Estão presentes em todas as células vivas, onde exercem as funções vitais de controle dos processos de transformação dos nutrientes em energia e em material celular, além de participar dos processos catabólicos, transformando nutrientes complexos em substâncias mais simples. Exceto por um conjunto de RNAs catalíticos, as enzimas são moléculas de natureza proteica, formadas por longas cadeias de aminoácidos ligados uns aos outros através de ligações peptídicas (NELSON e COX, 2011).

O avanço no conhecimento das enzimas possibilitou o emprego das mesmas em processos industriais em diferentes áreas, tais como médica, alimentícia, têxtil, química, entre outras. Estas biomoléculas possuem características que as tornam de grande interesse em processos industriais. Além de serem biodegradáveis e, desta forma, não causarem impactos ao meio ambiente, são catalisadores altamente eficientes, com as reações ocorrendo em condições que demandam menos energia do que os catalisadores químicos, pois a grande maioria das enzimas atuam à pressão atmosférica, temperatura ambiente e pH próximo à neutralidade. A alta especificidade das enzimas é outra característica muito útil nos processos industriais, pois se formam quantidades mínimas de produtos secundários, com a eliminação da necessidade de separação de subprodutos (FABER, 2011).

Além das importantes aplicações de enzimas em processos industriais, pelas razões demonstradas, as enzimas são de grande utilidade em diagnóstico clínico, a alta especificidade, sensibilidade e eficiência catalítica são características importantes que baseiam sua aplicação em análises clínicas (CRUZ *et al.*, 2008).

Processos de produção em larga escala possibilitaram a obtenção de elevados rendimentos de enzimas com custos relativamente baixos, diversas enzimas com excelente especificidade pelo substrato foram desenvolvidas e são utilizadas como catalisadores em diagnóstico. Outra grande vantagem da utilização de enzimas é que por

meio do seu uso é possível diminuir o tempo de ensaio e simplificar o processo de análise, uma vez que é possível analisar uma substância específica, por meio de amostras biológicas, sem a necessidade de isolamento desta substância (CRUZ *et al.*, 2008).

Também podemos citar as enzimas terapêuticas, que ao contrário das enzimas utilizadas industrialmente, são necessárias em quantidades relativamente pequenas. Devem ainda apresentar elevado grau de pureza, alta especificidade, baixa antigenicidade e estabilidade em condições fisiológicas. Dessa forma, o uso de enzimas como medicamentos relaciona-se ao fato de que pequenas quantidades do catalisador biológico podem produzir efeitos bastante específicos nas condições fisiológicas (CRUZ *et al.*, 2008).

Em algumas doenças pode ocorrer uma deficiência ou mesmo a ausência total de uma ou mais enzimas, além de condições anormais poderem ser causadas pela atividade excessiva de uma enzima. Desta forma, a medida da atividade de certas enzimas também é uma análise importante no diagnóstico de várias doenças (CRUZ *et al.*, 2008).

### **3.1 *Histórico do uso de enzimas em análises clínicas***

A descoberta das enzimas se iniciou com estudos sobre a digestão de alimentos, no século XVIII. No ano de 1831, o químico Jons Jacob Berzelius verificou que certas substâncias continham uma “força catalítica” que lhes permitiam acelerar determinadas reações (BON *et al.*, 2008). Poucos anos depois dois químicos franceses, Anselme Payen e Jean-François Persoz descobriram uma substância que convertia amido em açúcar denominada amilase (LIESE *et al.*, 2006).

O químico francês Louis Pasteur estabeleceu o conceito de que as enzimas eram células vivas e na mesma época o químico alemão Justus Von Liebig afirmou que a fermentação era provocada por substâncias químicas. Em seguida, Buchner mostrou a possibilidade da fermentação na ausência de células vivas, ele descobriu que um extrato

de levedura livre de células poderia causar fermentação alcoólica. A denominação enzima só veio em 1876, dada pelo fisiologista alemão Kühne (AEHLE, 2007).

A natureza proteica das enzimas foi descoberta pela cristalização da urease, da pepsina, da quimotripsina e da tripsina, que demonstrou que esses cristais consistiam inteiramente de proteína. A cristalização permitiu que as suas estruturas moleculares pudessem ser examinadas por cristalografia de raios X, o que desencadeou o estudo do funcionamento das enzimas a nível atômico (BON *et al.*, 2008).

O uso terapêutico de enzimas se iniciou quando preparações brutas de enzimas pancreáticas, de origem suína, foram empregadas como auxiliares digestivos, no final do século XIX. O uso de enzimas em diagnóstico foi facilitado pelos avanços das áreas bioquímica e biomédica. Atualmente, muitas enzimas com elevada especificidade ao substrato foram desenvolvidas e são empregadas em diagnóstico abrangendo basicamente três categorias: métodos enzimáticos de ensaio para análises clínicas, enzimas marcadoras em imunodiagnósticos e enzimas cujos níveis são avaliados para diagnósticos clínicos de doenças (CRUZ *et al.*, 2008).

Atualmente, as enzimas de uso em diagnóstico recebem especial atenção na indústria de biotecnologia. Aplicações de grande interesse são o diagnóstico e prognóstico de doenças e o acompanhamento do tratamento. É uma área com grande perspectiva de crescimento, impulsionada pelos avanços em biologia molecular, genômica, proteômica e engenharia de proteínas. Um fator importante é o conhecimento das doenças em nível molecular, pois permite o desenvolvimento de diagnósticos cada vez mais precisos (ZIMMER *et al.*, 2009).

### **3.2 *Micro-organismos - principais produtores de enzimas***

Os micro-organismos representam uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento econômico sustentável. A biodiversidade microbiana brasileira disponível é outro ponto a favor para a busca de novos fármacos, de biomarcadores enzimáticos e para a transformação em produtos úteis de alto valor agregado (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

As enzimas podem ser extraídas de tecidos animais, vegetais e de micro-organismos, sendo as de origem microbiana as mais utilizadas, tanto para aplicação industrial, quanto para o diagnóstico clínico. Por esse motivo, o conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção de novos micro-organismos tornaram-se um dos focos principais da biotecnologia. Células microbianas possuem características bastante atrativas para o mercado produtor de biocatalisadores, como baixo custo na produção de metabólitos, produção independente de fatores sazonais, facilidade de manipulação genética, opção de cultivo em grandes quantidades e em tempo relativamente curto e, ainda, o fato de o rendimento poder ser elevado a partir da otimização das condições nos processos fermentativos, e até mesmo utilizando a tecnologia do DNA recombinante para produção de enzimas heterólogas. Os micro-organismos empregados na produção de enzimas são usualmente células de mamíferos, bactérias do gênero *Bacillus*, fungos do gênero *Saccharomyces* ou leveduras do gênero *Aspergillus* (MUSSATO *et al.*, 2007).

A obtenção de micro-organismos que produzam enzimas para aplicação industrial pode ser feita partindo do isolamento dos mesmos, a partir dos recursos naturais. Podem, ainda, ser adquiridos em coleções de cultura ou serem produzidos micro-organismos recombinantes por técnicas de engenharia genética. Após o micro-organismo ser obtido, ele é cultivado em biorreator para a produção de quantidades industriais do biocatalisador. E, em seguida ao processo fermentativo ocorrem as etapas de separação e purificação dos produtos obtidos, bem como o tratamento dos resíduos formados (JEGANNATHAN, NIELSEN, 2012).

Dessa forma, a produção de enzimas em escala industrial faz-se por processo fermentativo, visto que os micro-organismos apresentam rápido crescimento em meios de baixo custo. As enzimas podem ser intra ou extracelulares, e dependendo da sua localização devem ser utilizados métodos para sua separação mais ou menos complexos. Em seguida, deve-se efetuar uma etapa crucial e de extrema importância, a purificação dessas enzimas. Uma sequência de processos de purificação é necessária até a obtenção da enzima com grau de pureza desejado. Em comparação com o uso industrial de enzimas, as enzimas terapêuticas possuem requisitos de purificação mais rigorosos,

determinando o grau de complexidade e o custo do produto final (ZIMMER *et al*, 2009).

### 3.3 Importância das enzimas na área farmacêutica

Devido ao desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante as enzimas se tornaram importantes moléculas utilizadas para diferentes fins industriais e terapêuticos. Atrás somente dos antibióticos, enzimas são os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica, pode-se afirmar que hoje a indústria farmacêutica representa um dos maiores produtores e usuários de enzimas. Estas podem ser aplicadas tanto no diagnóstico clínico e na terapia, quanto na produção de medicamentos e desenvolvimento de produtos (SARASWAT *et al*, 2013).

A Figura 3.1 mostra a distribuição do consumo de enzimas em diferentes áreas do setor produtivo, confirmando o maior percentual da utilização de enzimas na indústria farmacêutica. Isso se deve ao fato de maiores investimentos em pesquisa serem feitos na área da saúde e, também, devido à crescente substituição de terapias tradicionais por terapias enzimáticas (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

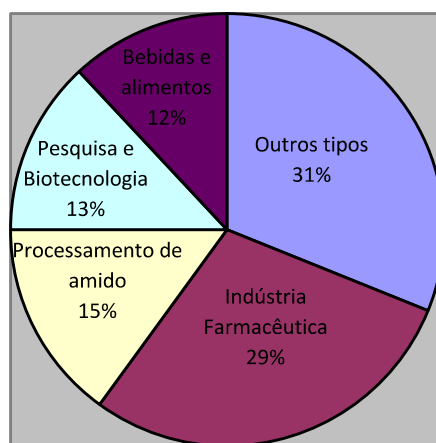


**Figura 3.1:** Distribuição da demanda de enzimas em diferentes setores da indústria (Adaptado de MONTEIRO, SILVA, 2009).

As enzimas na indústria farmacêutica são empregadas de diversas maneiras, sendo as principais aplicações das mesmas (i) atuando como agentes terapêuticos; (ii) em métodos enzimáticos de ensaio em análises clínicas; (iii) como marcadoras em imunodiagnósticos; (iv) utilizadas na produção de medicamentos, principalmente, na produção de fármacos opticamente puros e (v) enzimas cuja atividade é avaliada visando o diagnóstico clínico de diversas doenças, como as hepatopatias indicadas pelos altos níveis de transaminases (CRUZ *et al.*, 2008). Em seguida, será feito um breve levantamento sobre estas aplicações, dando ênfase aos métodos enzimáticos de ensaio em análises clínicas.

### **3.4 Enzimas como agentes terapêuticos**

As enzimas são usadas para o tratamento de uma ampla variedade de doenças, em virtude de o seu alto poder catalítico e sua especificidade. Com o surgimento da tecnologia do DNA recombinante, as estratégias para a preparação de enzimas para o uso humano tornaram-se disponíveis, evitando problemas de toxicidade e imunogenicidade que eram frequentemente encontrados com enzimas de origem animal, por exemplo. A variedade de enzimas e suas aplicações terapêuticas são consideráveis, já existe no mercado um grande número de medicamentos à base de enzimas para aplicação como auxiliares digestivos, na inibição da coagulação, no tratamento de fibrose cística, na terapia contra o câncer, bem como na reposição de enzimas metabólicas. A Tabela 3.1 mostra uma série de exemplos de enzimas utilizadas como agentes terapêuticos para o tratamento de diversas patologias (CRUZ *et al.*, 2008).

As formulações que contém enzimas, de acordo com seu objetivo, podem ser administradas por via tópica, oral ou parenteral. Algumas limitações podem ser encontradas no uso da terapia enzimática, como dificuldade de acesso ao órgão-alvo, suscetibilidade ao ataque de proteases, instabilidade dos biocatalisadores e antigenicidade da formulação. No entanto, para contornar estes problemas algumas estratégias de formulação foram desenvolvidas. Para proporcionar diminuição da toxicidade e da resposta imunológica, a incorporação da enzima é feita em sistemas de transporte/direcionamento, que envolve o aprisionamento das mesmas dentro de

lipossomas e outros sistemas nanoestruturados. Para diminuir a resposta imune é feita a conjugação química das enzimas com polímeros (CRUZ *et al.*, 2008).

**Tabela 3.1:** Enzimas como princípio ativo de diversos medicamentos, utilizadas no tratamento de patologias relacionadas (Adaptado de CRUZ *et al.*, 2008)

| <b>Enzima</b>        | <b>Número EC</b> | <b>Nome comercial</b> | <b>Uso terapêutico</b>               |
|----------------------|------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Colagenase           | 3.4.24.3         | Santyl Kollagenase    | Úlceras de pele                      |
| Asparaginase         | 3.5.1.1          | Elspar Erwinase       | Leucemia linfática aguda             |
| Ribonuclease         | 3.1.26.4         | Onconase              | Antiviral                            |
| Lisozina             | 3.2.1.17         | Murazyme Colpistar    | Antibiótico                          |
| Estreptoquinase      | 3.4.22.10        | Streptase Kabikinase  | Coágulo sanguíneo                    |
| Superóxido dismutase | 1.15.1.1         | Peroxinorm Oxinorm    | Inflamações                          |
| Glucocerobridase     | 3.2.1.45         | Cerezyme              | Doença de Gaucher                    |
| Galactosidase        | 3.2.1.22         | Fabrazyme Replagal    | Doença de Fabry                      |
| Lipase               | 3.1.1.3          |                       | Auxiliar digestivo                   |
| Desoxirribonuclease  | 3.1.21.1         | Pulmozyne             | Fibrose cística                      |
| $\beta$ -amilase     | 3.2.1.1          |                       | Auxiliar digestivo                   |
| Lactase              | 3.2.1.23         | Surelac Lactaid       | Intolerância a lactose               |
| Papaína              | 3.4.22.2         | Panafil               | Auxiliar digestivo e úlceras de pele |

Lipossomas são utilizados como veículos de transporte *in vivo*, podem incorporar praticamente qualquer tipo de substância, independente do peso molecular, da carga elétrica e da solubilidade. Servem como carreadores de fármacos, biomoléculas ou agentes de diagnóstico. As partículas hidrofílicas se incorporam nos espaços internos aquosos (Figura 3.2-A) e as partículas hidrofóbicas se incorporam na bicamada lipídica (Figura 3.2-B) (LASIC e PAPAHAADJOPOULOS, 1998).

A aplicação de drogas terapêuticas e através de lipossomas é bastante proveitosa, pois além de direcioná-las para o local de ação, por modificação na superfície, aumenta sua eficácia e reduzem os efeitos adversos, os lipossomas são atóxicos, possibilitam o

encapsulamento de drogas hidrossolúveis e lipossolúveis e melhoram a biodisponibilidade (BATISTA *et al.*, 2007).

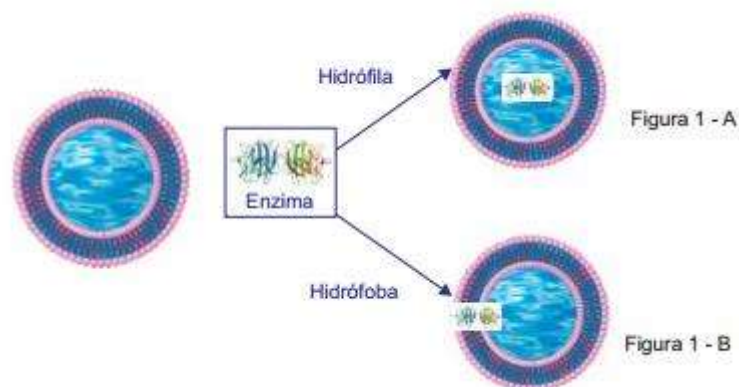


**Figura 3.2:** Representação esquemática de um lipossoma e localização de enzimas no espaço lipossomal de acordo com as suas propriedades. Enzimas hidrossolúveis no espaço interno aquoso (A); enzimas lipossolúveis na bicamada lipídica (B) (CRUZ *et al.*, 2008).

Além dos lipossomos, existe outra forma de transporte/direcionamento de enzimas utilizadas como agentes terapêuticos. As enzimas também podem ser conjugadas quimicamente com moléculas de baixo peso molecular ou poliméricas. O uso destas moléculas como transportadores baseia-se na aplicação para prolongar a ação e diminuir, conseqüentemente, a toxicidade de um fármaco (CHUNG *et al.*, 2005). Esses veículos utilizados para o transporte de enzimas terapêuticas são importantes para a melhoria da adesão do paciente no sentido de reduzirem os efeitos adversos, uma vez que o fármaco é direcionado ao local de ação (MELO *et al.*, 2012).

Um dos grandes benefícios da terapia enzimática é a produção em larga escala que possibilita a produção de grandes quantidades de enzimas com custos baixos, fato que se deve à purificação, caracterização e identificação de enzimas e metabólitos, e, também, ao surgimento de técnicas de DNA recombinante. Outra vantagem em relação ao uso de enzimas como medicamentos, é o fato de que pequenas quantidades do catalisador biológico produzem efeitos muito específicos em condições fisiológicas, devido à eficiência catalítica e alta especificidade das enzimas (CRUZ *et al.*, 2008).

### 3.5 Enzimas na produção de medicamentos

Além das aplicações terapêuticas das enzimas, elas também podem ser empregadas na síntese de fármacos. O planejamento de fármacos se baseia no conhecimento das causas que levam ao aparecimento de determinadas doenças, esse estudo é fundamental, pois permite à medicina a elaboração de planos e estratégias tanto de tratamento, quanto de prevenção de diversas doenças relacionadas ao ser humano. O grande avanço no estudo das ferramentas biotecnológicas tem fornecido conhecimentos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos (GUIDO *et al.*, 2010).

As enzimas possuem papel extremamente importante na síntese de novos fármacos em virtude de sua especificidade, inclusive sendo capazes de distinguir entre isômeros ópticos, o que não seria possível via métodos químicos convencionais. Além de possuírem características como fácil obtenção e adequação para ensaios biológicos, que são outros grandes atrativos na produção de fármacos (GUIDO *et al.*, 2010).

Quando determinado fármaco é desenvolvido, é necessário compreender quais são seus efeitos no organismo humano. Se determinada substância for quiral ou assimétrica, ela pode possuir enantiômeros com atividades farmacológicas diferentes. Uma molécula é opticamente ativa quando a sua imagem especular não puder ser sobreposta à molécula original, dessa forma, a quiralidade de um fármaco está relacionada com a sua estrutura, na ausência de um centro de simetria (BARREIRO *et al.*, 1997). Os enantiômeros apresentam moléculas com geometria e disposição espacial de seus átomos igual à imagem especular do seu par complementar (Figura 3.3), possuem a maioria de suas propriedades físicas idênticas e, quimicamente, demonstram comportamentos diferentes em ambientes quirais (ORLANDO *et al.*, 2007).



**Figura 3.3:** Representação dos enantiômeros de um derivado alênico quiral (BARREIRO *et al.*, 1997).

De acordo com o arranjo espacial, os enantiômeros recebem os prefixos R ou S adotados pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). Existe também outra nomenclatura atribuída aos enantiômeros que está relacionada à sua capacidade de desviar a luz plano polarizada para a direita (D ou +) e para a esquerda (L ou -). Esta propriedade que compostos quirais podem apresentar, depende também do meio em que eles se encontram (ORLANDO *et al.*, 2007).

Na maioria dos casos, os fármacos administrados sob a forma racêmica (mistura de quantidades iguais de enantiômeros), possuem características biológicas bem inferiores aos seus enantiômeros puros. De acordo com a disposição espacial, como a existência de dois enantiômeros, um fármaco pode antagonizar a ação de seu estereoisômero, pode levar à diminuição do efeito biológico, à sua total omissão ou ao surgimento de um efeito biológico adverso (LIMA, 1997).

Dessa forma, a busca para o desenvolvimento de substâncias enantiomericamente puras (SEP) tem crescido bastante desde as últimas décadas. As enzimas e receptores estereoespecíficos, presentes no organismo, regulam as características biológicas diferentes para as estruturas quirais. Como resposta, ocorre uma ocupação preferencial de um sítio receptor por um dos enantiômeros, podendo resultar nas mais diferentes respostas biológicas para os diferentes enantiômeros. Tais como (i) a atividade biológica desejada é atribuída a apenas um dos enantiômeros; (ii) os enantiômeros possuem propriedades farmacológicas idênticas (ou próximas), tanto do ponto de vista qualitativo como quantitativo; (iii) a atividade é qualitativamente idêntica, mas quantitativamente diferente entre os estereoisômeros e (iv) as atividades dos dois enantiômeros são qualitativamente diferentes (LIMA, 1997).

Na indústria farmacêutica, a utilização de enzimas como reagentes quirais é de grande relevância, já que ainda a maioria dos fármacos é comercializada na sua forma racêmica. Em uma reação catalisada enzimaticamente, a quiralidade do substrato é reconhecida pela enzima, fator que causa uma preferência por uma das duas direções possíveis em relação à estereoquímica da reação (BARREIRO *et al.*, 1997).

Pode-se notar a importância do conhecimento da isomeria ótica na produção de medicamentos. Durante muito tempo, considerou-se que em uma mistura racêmica um dos enantiômeros seria responsável pela ação, chamado de eutômero, e o outro seria inativo, distômero. Porém, foi necessário que ocorresse o trágico caso da talidomida, que levou à má formação de milhares de fetos, para que o assunto fosse reestudado. Este fármaco era usado para diminuir os sintomas de enjôo observados durante os primeiros meses de gestação. Esta tragédia se deu por falta de conhecimento sobre as diferenças toxicológicas entre os enantiômeros deste fármaco. Alguns anos após o ocorrido comprovou-se que o isômero (R) da talidomina possui propriedades sedativas e hipnóticas, e o isômero (S) possui propriedades teratogênicas (Figura 3.4) (BARREIRO *et al.*, 1997).

A partir de então, começou-se a estudar a influência do arranjo espacial dos átomos nas moléculas e na sua interação com macromoléculas biológicas e o quanto isso influenciava os processos bioquímicos, fisiológicos e farmacológicos. Sendo dessa forma, o uso de enzimas na produção de fármacos enantiomericamente puros fator essencial na segurança toxicológica dos mesmos (ORLANDO *et al.*, 2007).

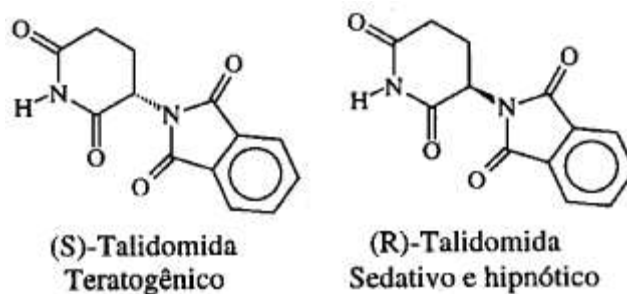


**Figura 3.4:** Isômeros óticos da Talidomida (BARREIRO *et al.*, 1997).

Na Tabela 3.2 estão apresentados alguns exemplos de fármacos com diferentes atividades devido a sua estereoquímica (LIMA, 1997).

**Tabela 3.2:** Exemplos de atividades biológicas para diferentes formas enantioméricas de alguns fármacos (LIMA, 1997).

| Fármacos     | Efeitos                                                         |
|--------------|-----------------------------------------------------------------|
| Etambutol    | Forma SS: tuberculástico; forma RR: pode provocar cegueira      |
| Penicilamina | Forma S: anti-artrítico; forma R: extremamente tóxico           |
| Adrenalina   | A forma levógira é 20 vezes mais ativa e igualmente mais tóxica |
| Talidomida   | Forma R: sedativo; forma S: teratogênico                        |

Uma classe terapêutica também importante são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE). Estas substâncias pertencem ao grupo dos ácidos aril ou heteroarilcarboxílicos e os seus principais representantes são os ácidos (S)-arilpropionícos, eutômeros de diferentes AINE. A hidrólise enzimática de ésteres racêmicos correspondentes permite a obtenção do eutômero puro. Este processo tem sido empregado, utilizando uma lipase isolada de uma variedade de *Candida* sp., para a obtenção industrial do (S)-ibuprofeno (Figura 3.5) (BARREIRO, *et al.*, 1997).

Além da enzima citada que é utilizada na produção de anti-flamatórios, já existem no mercado inúmeras enzimas que são utilizadas para este mesmo fim.

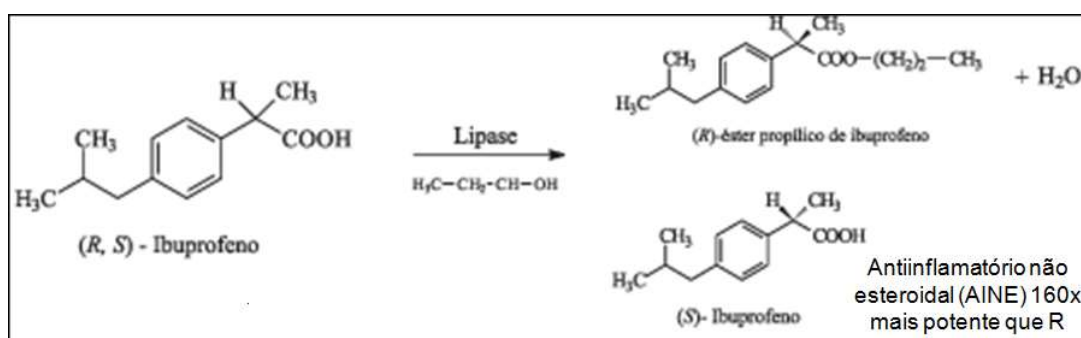


**Figura 3.5:** Resolução de (R)-(S)-ibuprofeno por epoxidação microbiológica (BARREIRO *et al.*, 1997).

### 3.6 Enzimas marcadoras em imunodiagnóstico

Ensaio imunoenzimáticos são baseados em reações imunológicas e enzimáticas. A resposta imunológica de organismos vivos se dá pelo contato com antígenos e a consequente produção de anticorpos, também chamados de imunoglobulinas (Ig). Estes são proteínas de alto peso molecular (PM), em torno de 150 kD, já os antígenos,

avaliados nas análises imunoenzimáticas, devem possuir pelo menos 1 kD, além de possuírem complexidade química que os diferencie das substâncias reconhecidas pelo organismo. Diversos analitos de interesse em análises clínicas constituem-se em moléculas menores que 1 kD (haptenos), fato que dificulta a resposta imunológica com produção de anticorpos seletivos para este analito. Para contornar esse problema, podem-se conjugar estas espécies a proteínas transportadoras, como a albumina (GIL *et al.*, 1999).

Os imunoenaios podem ser classificados em heterogêneos ou homogêneos. Os ensaios heterogêneos constituem a maioria dos imunoenaios e são caracterizados pela utilização de um suporte de fase sólida para a imobilização de antígenos ou anticorpos, necessitando para a quantificação precisa, de uma etapa adicional para separar reagentes e produtos da reação. Neste tipo de imunoensaio o Ag marcado (Ag\*) ligado ao anticorpo (Ac), complexo antígeno marcado-anticorpo (Ag\*Ac), necessita ser separado fisicamente do antígeno marcado (Ag\*) que permanece livre na solução. A separação pode ser feita por precipitação com polietilenoglicol (PEG) ou pela adição de um segundo anticorpo, que se liga e precipita o Ag não marcado (LOPES, 2002).

Já os imunoenaios homogêneos, ainda são menos frequentes e não requerem etapas de separação, ou seja, não há a necessidade de se proceder à separação física do Ag marcado (Ag\*) ligado ao Ac (complexo Ag\*Ac) do Ag\* livre (porção que não se ligou ao Ac). Dessa forma, a utilização destes ensaios para detecção de analitos em matrizes complexas tem sido alvo de investigações, pois não têm a necessidade de tratamento da amostra por lavagem ou separação (KOPETZKI *et al.*, 1994).

O sistema de detecção dos imunoenaios definirá a escolha de marcadores adequados, eles devem apresentar baixo custo, boa estabilidade e sensibilidade, fácil conjugação e detecção. Dependendo do marcador ou sistema de detecção empregado, os imunoenaios apresentam boa sensibilidade, além da alta seletividade devido a grande especificidades de anticorpos (Ac) pelos antígenos (Ag) (GIL *et al.*, 1999). A tabela 3.3 apresenta alguns dos principais sistemas de detecção e os respectivos marcadores utilizados em imunoenaios.

**Tabela 3.3:** Principais sistemas de detecção e marcadores utilizados em imunoenaios (GIL *et al.*, 1999).

| Sistema de Detecção | Exemplos de marcadores                          |
|---------------------|-------------------------------------------------|
| Eletrquímicos       | Enzimas: <i>peroxidases</i> , <i>oxidases</i> . |
| Radioativos         | Isótopos radioativos                            |
| Fluorimétricos      | Fluoresceína, quelatos de lantanídeos           |
| Luminométricos      | Luminol, isoluminol, acridina                   |

Os imunoenaios enzimáticos são os mais utilizados atualmente, são métodos quantitativos em que a reação de antígeno-anticorpo é monitorada por medida da atividade enzimática. As enzimas para imunodiagnósticos são utilizadas como marcadores e são ligadas a um anticorpo para testar de forma bastante específica a presença da substância alvo (SANTOS, 2007).

Pesquisas para o desenvolvimento de uma técnica simples e sensível, para a detecção de antígenos dos patógenos ou anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro levaram ao desenvolvimento do teste ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). O teste imunoenzimático ELISA apresenta alta sensibilidade e especificidade e vem sendo muito utilizado no diagnóstico de diferentes patologias (WEETAL e ROYER, 1980).

A técnica imunoenzimática é utilizada para verificar se o indivíduo está ou se já esteve infectado, identificando quanto de antígeno (ELISA direto) ou de anticorpo (ELISA indireto) que o indivíduo possui no sangue. O princípio do método ELISA baseia-se na imobilização do antígeno ou anticorpo em placa de poliestireno (Figura 3.6). O método é realizado em oito etapas: 1- ativação da placa, 2- lavagem, 3- imobilização dos anticorpos, 4- lavagem, 5- incubação, 6- lavagem, 7- adição de substrato, 8- leitura dos poços (GIL *et al.*, 1999).

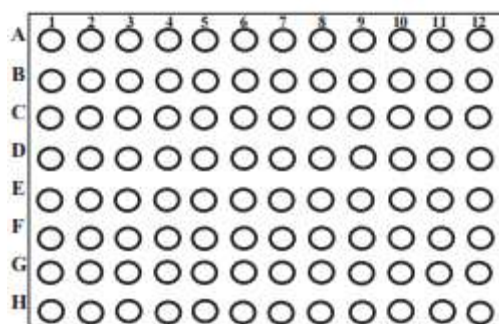


**Figura 3.6:** Placa utilizada para ensaio ELISA (GIL *et al.*, 1999).

O método ELISA direto é uma técnica utilizada para a detecção de antígeno, dessa forma, adquire-se uma placa contendo (aderida na parte sólida) anticorpos para a patologia a ser analisada. Coloca-se o soro do paciente nos poços presentes na placa (Figura 3.7), se houver a presença de antígenos, esses se fixarão aos anticorpos formando um complexo anticorpo (ligado a placa) – antígeno. Após esse método é feita uma lavagem da placa (utilizando tampão de lavagem) para retirar os antígenos não ligados. Em seguida, adiciona-se um anticorpo conjugado a enzima, assim, formará um complexo anticorpo (ligado à placa) – antígeno – anti-anticorpo conjugado. Efetua-se outra lavagem para evitar o excesso de anticorpo conjugado não ligado ao complexo. Adiciona-se o substrato da enzima conjugada. O substrato adicionado, ao se ligar à enzima do complexo, forma um produto colorido. Para finalizar adiciona-se uma solução que interrompe a reação enzimática (ORDEN, 1971; NILSON, 1990; LOPES, 2002).

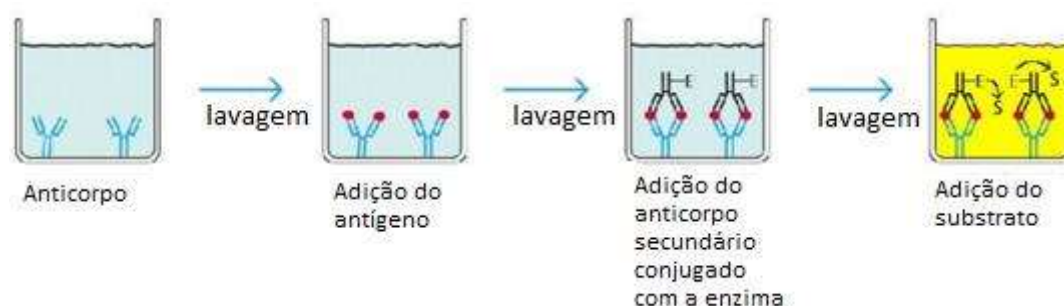


**Figura 3.7:** Representação esquemática de um imunoenensaio enzimático ELISA direto (Adaptado de ANALISA, 2015).

O procedimento do ELISA indireto é uma técnica utilizada para a detecção de anticorpos, sendo assim, utiliza-se uma placa contendo (aderida na parte sólida)

antígenos para a patologia a ser analisada (Figura 3.8). Coloca-se o soro do paciente nos poços presentes na placa, caso existir a presença de anticorpos, eles se ligarão aos antígenos presentes na placa formando o complexo antígeno (ligado a placa) – anticorpo. Em seguida é feita uma lavagem da placa (tampão de lavagem) para retirar os anticorpos não ligados. A próxima etapa é adicionar um anti-anticorpo conjugado a enzima, formando o complexo antígeno (ligado à placa) – anticorpo – anti-anticorpo conjugado. Realiza-se outra lavagem para retirar o excesso de anti-anticorpo que não formou o complexo. Depois é adicionado um substrato para a enzima, o substrato ao se ligar à enzima do complexo, forma um produto colorido. É adicionada uma solução que interrompa a ação da enzima para que assim a solução não adquira coloração que possa interferir na leitura do teste (ORDEN, 1971; NILSON, 1990).

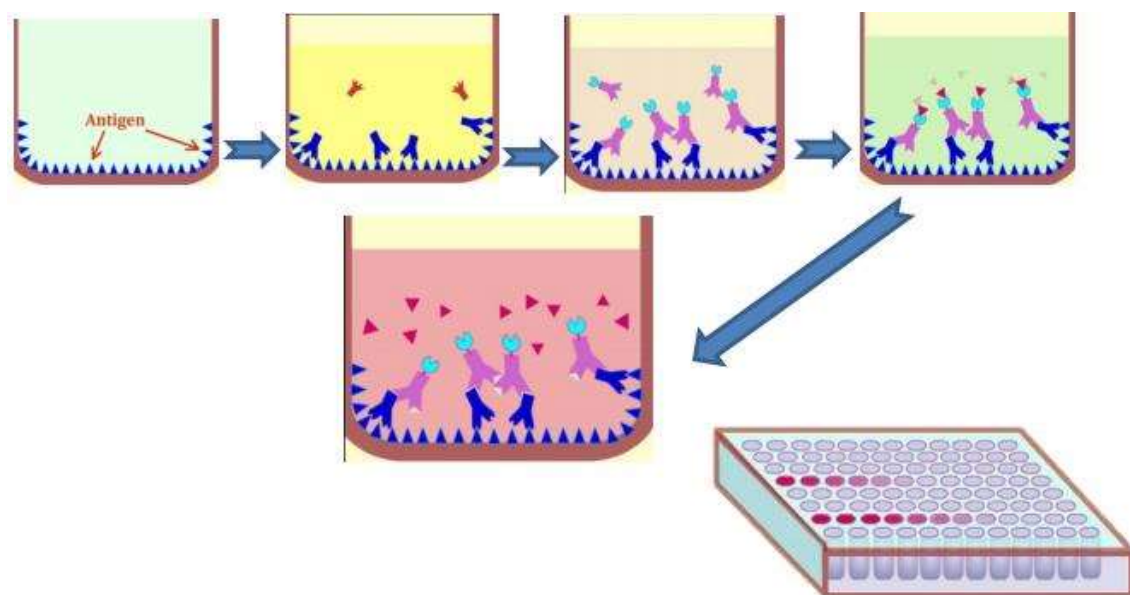


**Figura 3.8:** Representação esquemática de um imunoensaio enzimático ELISA indireto (ANALISA, 2015)

A leitura dos resultados pode ser realizada, basicamente, de duas maneiras, qualitativamente, sendo o resultado positivo ou negativo e quantitativamente, feita com a utilização de equipamentos de leitura como espectrofotômetro. A grande vantagem da técnica ELISA é que por ser um método com alta sensibilidade é feito em microescala, o que o torna bastante econômico devido à reduzida quantidade de reagentes utilizados (ORDEN, 1971; NILSON, 1990). Um exemplo de patologia diagnosticada através de ensaio imunoenzimático ELISA é a doença HIV.

Outro método imunoenzimático é o chamado EMIT (*Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique*), este imunoensaio é do tipo homogêneo, ou seja, a interação entre os reagentes empregados ocorre no mesmo meio, dispensando as etapas de lavagem. Consiste em um imunoensaioenzimático que admite medidas quantitativas diretas da interação antígeno-anticorpo através da medida da atividade enzimática. Neste método, ocorre ligação entre anticorpo específico, antígeno da amostra e o antígeno ligado a uma enzima, chamado conjugado. Deve-se promover uma competição entre o conjugado e o antígeno presente na amostra pelos sítios de ligação do anticorpo. Para isso ocorrer, incubam-se quantidades conhecidas de conjugado antígeno-enzima com a amostra e com os anticorpos específicos. Quando não há a presença de antígenos na amostra, o anticorpo livre se liga ao conjugado e inativa a enzima, que dessa forma, não irá conseguir agir sobre o substrato. Quando há a presença de antígeno na amostra, o antígeno se liga ao anticorpo deixando o conjugado livre e a enzima permanece na sua forma ativa para atuar sobre o substrato originando um produto mensurável (Figura 3.9). O EMIT possui algumas vantagens como fácil execução, rapidez e boa capacidade de detecção de moléculas pequenas (LOPES, 2002).

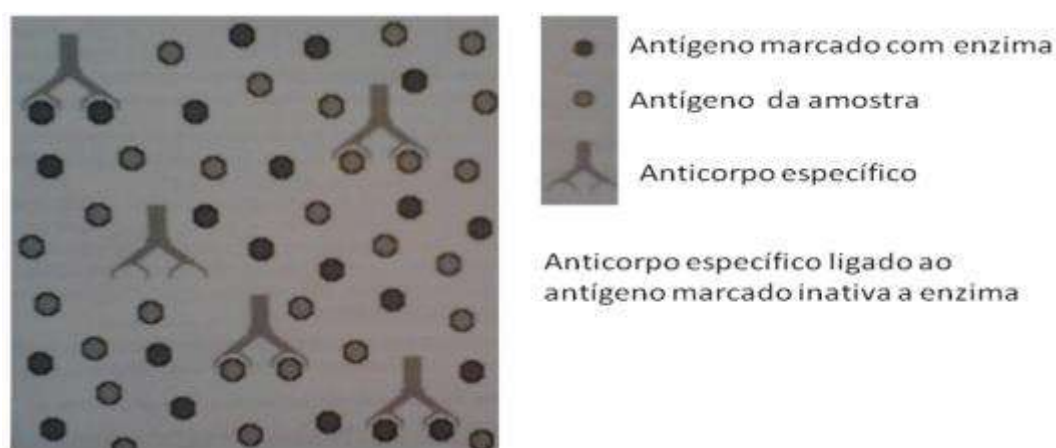


**Figura 3.9:** Representação esquemática de um imunoensaio multiplicado por enzima (EMIT) (Adaptado de LUCA e REIS, 2000).

Os anticorpos possuem como principal característica a especificidade pelo antígeno, e, para que eles possam ser utilizados na detecção de antígenos específicos, é necessário que os anticorpos estejam conjugados (ligados covalentemente) a compostos que

permitam a detecção, como as enzimas peroxidase e fosfatase alcalina. A peroxidase é uma enzima que usa o  $H_2O_2$  para oxidar seus substratos, essa oxidação pode ser detectada pela liberação de luminol, pela formação de um precipitado colorido ou pela transformação de um composto incolor em um colorido, que pode ser determinado quantitativamente ou por espectroscopia. Já a fosfatase alcalina é uma enzima que hidrolisa ligações fosfato, desta forma, os cromóforos são compostos que possuem grupos fosfato e, com a perda deste grupo apresentam cor (LENZ, 1997).

### 3.7 *Enzimas cujos níveis são avaliados para diagnóstico clínico de doenças*

A determinação dos níveis enzimáticos em amostras biológicas é uma ferramenta importante empregada no diagnóstico clínico de doenças, uma vez que o excesso de determinada enzima será utilizado como marcador para a patologia pesquisada. Na Tabela 3.4 podem ser verificados alguns exemplos de enzimas pesquisadas para o diagnóstico clínico de doenças (CRUZ, *et al.*, 2008).

**Tabela 3.4:** Exemplos de enzimas pesquisadas em amostras de sangue para diagnósticos clínicos de doenças (Adaptado de CRUZ, *et al.*, 2008).

| ENZIMA AVALIADA                | DOENÇA ALVO                                |
|--------------------------------|--------------------------------------------|
| Fosfatase ácida                | Câncer de próstata                         |
| Alanina aminotransferase       | Problemas hepáticos                        |
| Fosfatase alcalina             | Problemas hepatobiliares e ósseos          |
| Amilase                        | Pancreatite aguda                          |
| Aspartato aminotransferase     | Tecidos danificados (coração, fígado, rim) |
| Colinesterase                  | Exposição a organofosfatos                 |
| Creatinina quinase             | Problemas cardíacos/musculares             |
| Gama glutamiltransferase       | Problemas hepáticos                        |
| Lactato desidrogenase          | Infarto do miocárdio, câncer de testículo  |
| Enzima conversora angiotensina | Cirroze biliar                             |

Muitas das enzimas que estão presentes no plasma são derivadas, principalmente, do processo normal de destruição e reposição celular. Normalmente, apresentam baixos teores séricos, contudo, após lesão tecidual provocada por processos patológicos,

determinadas enzimas se apresentam nesses líquidos em teores muito mais elevados, ocasionado pelo aumento da permeabilidade celular ou morte prematura da célula. Isso permite concluir a localização e natureza das variações patológicas em alguns órgãos como fígado, miocárdio e pâncreas. Quanto maior a lesão tecidual, maior a atividade enzimática no nível plasmático (MOTTA, 2009).

Para exemplificar a pesquisa de enzimas em análises de diagnósticos de doenças, será abordada a determinação das transaminases, dos marcadores de infarto agudo do miocárdio e das lesões pancreáticas.

As transaminases são enzimas intracelulares encontradas em uma diversidade de órgãos e tecidos. As atividades mais elevadas encontram-se no miocárdio, fígado, músculo esquelético e em menores quantidades nos rins, pâncreas, baço, cérebro, pulmões e eritrócitos. Estas enzimas existem em quantidades mínimas no sangue de um indivíduo normal, mas após destruição celular intensa elas aumentam significativamente e são liberadas na corrente sanguínea, ocasionando modificação na sua concentração e alteração nos exames de sangue. O fígado produz centenas de transaminases, sendo que apenas duas delas são de maior importância clínica, a aspartato aminotransferase (TGO) e alanina aminotransferase (TGP). A TGP é encontrada, principalmente, no citoplasma do hepatócito, já 80% da TGO está presente na mitocôndria. Dessa forma, quando ocorre uma lesão hepatocelular há o fluxo das duas enzimas para o plasma, porém, se a forma predominante no soro é a citoplasmática o dano é leve, enquanto em lesões graves há liberação mitocondrial, aumentando a relação TGO/TGP (MOTTA, 2009).

A doença isquêmica do coração figura uma das principais causas de óbito em homens e mulheres acima de trinta anos de idade. O diagnóstico pode ser feito baseado em critérios clínicos e, principalmente, pela realização de exames laboratoriais, que se baseiam na determinação de macromoléculas intracelulares na circulação, principalmente enzimas e proteínas (LOZOVY *et al.*, 2008). O diagnóstico do infarto agudo do miocárdio (IAM) baseado somente em critérios clínicos e eletrocardiográficos pode ser difícil, então, para a confirmação ou exclusão do IAM deve ser feita a medida das enzimas miocárdicas no soro (CAVALCANTI *et al.*, 1998).

Assim, as enzimas cardíacas, também conhecidas como marcadores de necrose miocárdia, são primordiais para o diagnóstico efetivo do infarto do miocárdio. A avaliação laboratorial se baseia na caracterização destas macromoléculas na corrente sanguínea, que extravasam a células miocárdicas lesadas resultando em aumento transitório dos níveis circulantes. Bioquimicamente analisando, um evento isquêmico no tecido cardíaco leva ao cessamento da glicólise aeróbica e, conseqüentemente, o estabelecimento da glicólise anaeróbica. Isso leva a uma produção desapropriada de fosfatos de alta energia e ao acúmulo de ácido láctico, causando a redução do pH celular e alterações metabólicas importantes. Dessa forma, sem energia para a manutenção da sua atividade metabólica normal a célula miocárdica morre por necrose e as suas macromoléculas são liberadas na circulação. As enzimas diagnosticadas no IAM são a creatina-quinase (CK) e a lactato desidrogenase (LD) e, ainda, as heme-proteínas troponina e mioglobina (LOZOVY *et al.*, 2008). A velocidade da aparição dessas macromoléculas na circulação está sujeita a vários fatores, como o peso molecular, a localização intracelular, fluxos sanguíneos e linfáticos locais e a taxa de eliminação no sangue (Tabela 3.5) (PIEGAS *et al.*, 2004).

**Tabela 3.5:** Marcadores bioquímicos de Infarto Agudo do Miocárdio com indicações do início de aparecimento dos mesmos na corrente sanguínea, pico de concentração e normalização dos teores, em relação ao início do processo de infarto (Adaptado de PIEGAS *et al.*, 2004).

| <b>Marcador</b>             | <b>Início</b> | <b>Pico</b>       | <b>Normalização</b> |
|-----------------------------|---------------|-------------------|---------------------|
| Creatina quinase<br>(CK-MB) | 4 a 8 horas   | Torno de 18 horas | 2 a 3 dias          |
| Lactato<br>desidrogenase    | 8 a 12 horas  | 24 a 48 horas     | Após 7 dias         |
| Heme-proteína<br>Mioglobina | 1 a 2 horas   | 6 a 9 horas       | 1 a 2 dias          |
| Heme-proteína<br>Troponinas | 4 a 8 horas   | 36 a 72 horas     | 5 a 14 dias         |

A creatina quinase possui atividades mais elevadas no músculo esquelético, cérebro e tecido cardíaco. Já em quantidades menores é encontrada na bexiga, útero, pulmão,

próstata, baço, estômago, pâncreas, tireoide, diafragma, entre outros. Existem na forma de isoenzimas MM, MB e BB, sendo as subunidades M e B imunologicamente distintas. A CK-MM e CK-MB estão distribuídas principalmente nos músculos esquelético e cardíaco, respectivamente. Já a CK-BB é encontrada predominantemente no cérebro e raramente está presente no sangue (MOTTA, 2009).

A determinação dos níveis séricos da creatina-quinase (CK) embora seja um sensível indicador de lesão muscular, não é específica para o diagnóstico de lesão miocárdica, também indica a presença de lesões musculares agudas e crônicas, uso de medicamentos e drogas ilícitas e de doenças associadas que diminuem a depuração de proteínas. Variações fisiológicas como, sexo, idade, atividade física e massa muscular, afetam a atividade sérica desta enzima (PIEGAS *et al.*, 2004).

A Lactato Desidrogenase (LD) é uma enzima que está presente no citoplasma de todas as células do organismo. Está mais presente no miocárdio, fígado, eritrócitos, rim e músculo esquelético. O aumento do seu teor no sangue é um achado inespecífico, dessa forma, para obter referências de maior significado clínico é interessante obter a separação da LD em suas cinco frações isoenzimáticas (Tabela 3.6). Devido à especificidade tecidual, as isoenzimas possuem maior utilidade diagnóstica (MOTTA, 2009).

**Tabela 3.6:** Frações isoenzimáticas da Lactato Desidrogenase (LD) e as respectivas localizações teciduais (MOTTA, 2009).

| Isoenzima   | Localização                        |
|-------------|------------------------------------|
| LD-1 (HHHH) | Miocárdio e eritrócitos            |
| LD-2 (HHHM) | Miocárdio e eritrócitos            |
| LD-3 (HHMM) | Pulmão, linfócitos, baço, pâncreas |
| LD-4 (HMMM) | Fígado, músculo esquelético        |
| LD-5 (MMMM) | Fígado, músculo esquelético        |

Também existem os testes não-enzimáticos para detectar o infarto agudo do miocárdio. A mioglobina é uma heme-proteína encontrada tanto no músculo esquelético quanto no músculo cardíaco, constitui cerca de 2% da proteína total do músculo e está localizada

no citoplasma (PIEGAS *et al.*, 2004). Após lesões celulares, durante o IAM, ela é liberada na circulação sanguínea e devido ao seu valor preditivo negativo é considerada excelente para descartar o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio (MOTTA, 2009). Já as troponinas são proteínas presentes nos filamentos dos músculos estriados e são consideradas específicas para o miocárdio. São compostas de múltiplas sub-unidades troponina I, troponina C e troponina T. Dados clínicos demonstraram que a troponina T e troponina I são marcadores precoces do IAM, apresentam a mesma sensibilidade diagnóstica do que a CK-MB entre 12 e 48 horas de evolução, e dessa forma, são indispensáveis em portadores de doenças que diminuem a especificidade da CK-MB (PIEGAS *et al.*, 2004).

Amilase é uma enzima produzida pelo pâncreas e é muito utilizada como marcadora de inflamação pancreática. O aumento dos níveis deste marcador é conhecido como hiperamilasemia e tem a função de demonstrar a concentração da enzima excretada pelo pâncreas. No laboratório de análises clínicas o exame também é conhecido como amilasemia ou amilase pancreática (FERREIRA *et al.*, 2008). Quando ocorrem lesões nas células dos pâncreas, a amilase fluirá para o sistema linfático intrapancreático e peritônio até atingir os vasos sanguíneos em concentração elevada, os níveis de amilase aumentam após 2 – 12 horas do início da dor abdominal. A atividade da amilase volta ao normal após 3 ou 4 dias e o pico máximo é atingido entre 12 e 72 horas (MOTTA, 2009).

### **3.8 Métodos enzimáticos de ensaio em análises clínicas**

Com a excelente especificidade pelo substrato que as enzimas possuem, os métodos químicos foram em parte substituídos pela utilização de enzimas nas análises clínicas. Além de vantagens operacionais como o emprego de reagentes pouco agressivos e de fácil utilização e custos operacionais similares ao dos reagentes químicos, os métodos enzimáticos, reduzem operações manuais e são facilmente automatizados (LUCA, REIS, 2000). As enzimas são utilizadas diretamente ou como um componente de um ensaio para a determinação de diversas substâncias, tais como as listadas na tabela 3.7. A utilização de métodos de ensaio enzimático para diagnóstico tem sido facilitada pelos

desenvolvimentos na engenharia genética que permitiram a produção de enzimas em larga escala e com custos mais acessíveis (MUROOKA e YAMASHITA, 2001).

A determinação de certas substâncias presentes em fluidos biológicos se baseia na reação do analito que se deseja avaliar, qualitativa ou quantitativamente, objetivando a formação de um produto que pode ser identificado visualmente ou medido através de um analisador. Dessa forma, um laboratório de análises clínicas se baseia no uso de reagentes que produzem as reações desejadas formando os produtos indicadores da reação. Os dados alcançados são comparados com padrões para se obter a concentração do analito (BASQUES, 2010).

**Tabela 3.7:** Exemplo de enzimas empregadas em métodos enzimáticos de análises clínicas e o respectivo substrato avaliado (Adaptado de CRUZ *et al.*, 2008)

| <i>ENZIMA</i>                          | <i>SUBSTRATO AVALIADO</i>                                     |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Álcool oxidase                         | Álcool                                                        |
| Álcool desidrogenase                   | Álcool                                                        |
| Aldeído desidrogenase                  | Indicador para reações que produzem acetaldeído               |
| Catalase/aldeído desidrogenase         | Ácido Úrico                                                   |
| Colesterol oxidase/peroxidase          | Colesterol                                                    |
| Colesterol oxidase                     | Colesterol total                                              |
| Creatinase                             | Creatinina e Creatina                                         |
| Creatininase                           | Creatinina                                                    |
| Glicose-6-P desidrogenase              | Glicose                                                       |
| Glicose oxidase/peroxidase             | Glicose                                                       |
| Glutamato desidrogenase/urease         | Ureia                                                         |
| Lactato desidrogenase/piruvato quinase | Indicador em reações em que ADP, ATP ou piruvato são produtos |
| Malato desidrogenase                   | Oxaloacetato e malato                                         |

|                                                        |                            |
|--------------------------------------------------------|----------------------------|
| Malato desidrogenase/fosfoenolpiruvato/<br>Carboxilase | CO <sub>2</sub> /carbonato |
| Maltose fosforilase                                    | $\alpha$ -amilase          |
| Sacarose fosforilase                                   | Fosfato inorgânico         |
| Urease                                                 | Ureia                      |
| Uricase/peroxidase/aldeído desidrogenase               | Ácido Úrico                |

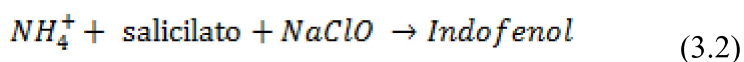
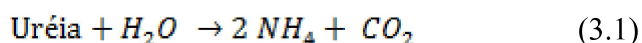
Para a formação do produto, as reações correspondem ao resultado da atuação de um ou mais reagentes sobre o analito. A visualização das reações enzimáticas pode ser feita através de métodos colorimétrico ou pela medida da absorbância em comprimentos de onda na região do ultravioleta. Reação colorimétrica é um método de análise quantitativa que se baseia na comparação da cor produzida por uma reação química com uma cor padrão e pode-se concluir a concentração de determinado analito de acordo com a intensidade da cor produzida. As reações podem ser lidas na região do visível (380 a 680 nm) do espectrofotômetro. Já no método ultravioleta (UV) os produtos formados absorvem energia na região do ultravioleta (~340 nm) (BASQUES, 2010).

Nesse trabalho serão analisadas a ação das enzimas urease, creatininase, glicose oxidase e colesterol oxidase como reagentes na dosagem de substâncias presentes em fluidos biológicos, respectivamente, ureia, creatinina, glicose e colesterol total.

A ureia é o metabólito quantitativamente mais importante no catabolismo das proteínas. É sintetizada no fígado a partir do dióxido de carbono e amônia, em todos os tecidos, como produto final do catabolismo proteico. Representa a maior fração de substâncias orgânicas presentes na urina e cerca de 80% do nitrogênio não proteico excretado na urina, em condições normais. Na prática clínica, a dosagem de ureia é utilizada, assim como a creatinina, como marcador de função renal. É um pouco mais sensível que a creatinina, mas menos específica, já que pode sofrer alterações dependendo da dieta (MOTTA, 2009). Sua concentração varia em indivíduos saudáveis e é influenciada por vários fatores, como grau de hidratação, dieta proteica e função renal (ANALISA, 2012b). O aumento na taxa de ureia sanguínea pode ser observado em insuficiência cardíaca aguda, nefrite, dietas ricas em proteínas, insuficiência renal aguda ou com a

idade. Já a diminuição da ureia está relacionada com insuficiência hepática grave, aumento da diurese, redução do catabolismo proteico, gravidez e indivíduos submetidos a dietas com baixo valor proteico e alto teor glicídico (ANALISA, 2012b).

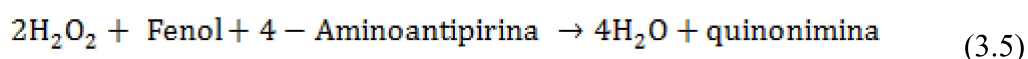
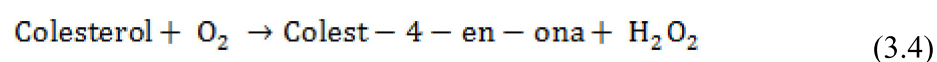
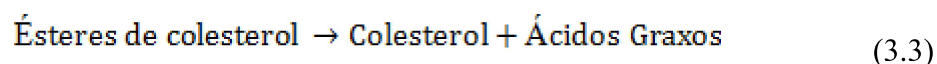
Existem alguns métodos utilizados na determinação da ureia, será destacado o método enzimático colorimétrico. Esse método tem por objetivo a determinação quantitativa da ureia nas amostras, soro, plasma e urina. O princípio do método se baseia na hidrólise da ureia a íons amônio e  $\text{CO}_2$  através da enzima Urease (ANALISA, 2012b), como demonstrado pela Equação 3.1. Em meio alcalino, os íons amônio reagem com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar indofenol (corante azul), como demonstrado pela Equação 3.2. A absorbância a 600 nm do complexo azul formado é medida e é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra analisada (ANALISA, 2012b).



Outro método enzimático descrito é a determinação do colesterol total no soro. O colesterol está presente em todas as células como componente estrutural das membranas e das lipoproteínas, sendo assim, caracterizado como principal esteroide do organismo. Em torno de 70 a 75% do colesterol plasmático encontra-se sob a forma de éster e 25 a 30% existe como colesterol livre. O colesterol pode ser designado como exógeno e endógeno, sendo o exógeno absorvido pelo tubo gastrointestinal e endógeno aquele que é produzido no fígado e outros tecidos. Valores aumentados de colesterol são encontrados na nefrose, nas doenças colestáticas do fígado e no hipotireoidismo. Já níveis diminuídos são encontrados no hipertireoidismo, doenças consuntivas (déficit de nutrientes por alguma doença que causa má absorção dos mesmos) e desnutrição crônica (ANALISA, 2012c).

No método de determinação de colesterol total, ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol esterase formando colesterol livre. O colesterol livre produzido é

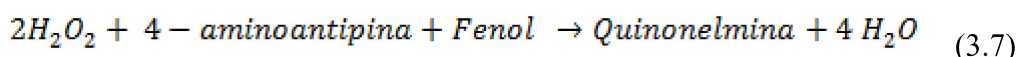
oxidado pela enzima colesterol oxidase e forma peróxido de hidrogênio. Este irá reagir com o fenol e 4-aminoantipirina, através de reação catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinonimina de cor vermelha, como mostram as Equações 3.3 a 3.5, respectivamente. A absorbância do complexo formado, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra (ALLAIN *et al.*, 1974).



Outro importante método enzimático utilizado em análises clínicas é a determinação da glicose sérica, o qual utiliza uma metodologia enzimática de grande especificidade analítica, de simples e fácil aplicação no laboratório clínico. A glicose é a principal fonte de energia celular para o organismo, em condições normais, a glicose sanguínea é mantida em teores apropriados por meio de mecanismos regulatórios e sua concentração sérica está intimamente ligada à ação da insulina (MACHADO, 1998). Em todas as células, a glicose é metabolizada para produzir ATP e fornece intermediários metabólicos necessários em vários processos biossintéticos. Quando os níveis de glicose no sangue estão acima dos valores de referência, denomina-se hiperglicemia, quando abaixo desses valores, hipoglicemia (MOTTA, 2009).

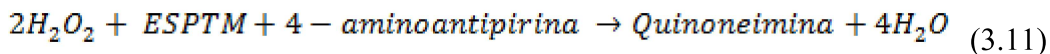
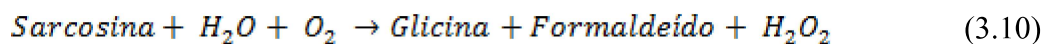
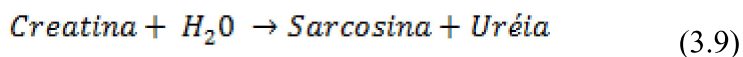
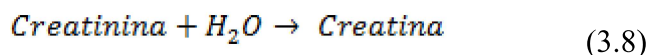
Dessa forma, na análise laboratorial, a demonstração de alterações na concentração de glicose no sangue determina o diagnóstico dos distúrbios do metabolismo da glicose. A desordem no metabolismo dos carboidratos pode estar relacionada com o aumento da glicose plasmática, num quadro clínico denominado *diabetes melitus* ou com a redução da glicose plasmática, num quadro clínico denominado hipoglicemia (MOTTA, 2009).

Os métodos enzimáticos para a determinação da glicose são os mais utilizados atualmente. Além de necessitarem de pequenos volumes de amostra e serem simples e rápidos de executar, as enzimas possuem grande especificidade pela glicose. Sendo estas enzimas inclusive imobilizadas em fase sólida e a dosagem sendo realizada em pequenas tiras reagentes, utilizando uma única gota de sangue. A glicose-oxidase, altamente específica para a  $\beta$ -glicose, catalisa a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (Equação 3.6). Em uma segunda reação, catalisada pela peroxidase, o peróxido de hidrogênio formado reage com um cromogênio aceceptor de oxigênio, como o 4-aminoantipirina, formando um produto colorido, como a quinoneimina (Equação 3.7), cuja absorbância medida em 505 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra (MOTTA, 2009).



A creatinina é um composto orgânico nitrogenado e não proteico formado a partir da desidratação da creatina, por ser um dos produtos do metabolismo nitrogenado deve ser removida do corpo continuamente através dos rins. O músculo esquelético é o maior produtor da creatinina, dessa maneira, variação em sua produção indica alterações diretamente proporcionais na massa muscular. A creatinina pode ser mensurada no sangue ou na urina e sua concentração permanece praticamente inalterada ao longo de 24 horas (SILVA, 2006). É sintetizada nos rins, fígado e pâncreas a partir da arginina, a quantidade de creatinina produzida diariamente é relativamente constante e se relaciona com a massa muscular. Devido a sua constância na formação e excreção, a creatinina se torna um marcador muito útil da função renal e, em virtude da sua relativa independência de fatores como metabolismo proteico, grau de hidratação e filtração glomerular, a creatinina plasmática é um teste de função renal mais seguro que a ureia, sendo a dosagem elevada indicação de disfunção renal e também do grau de evolução de enfermidades relacionadas a este órgão (ANALISA, 2012a).

Esse método tem como finalidade a utilização de um sistema para a detecção da creatinina em soro, plasma e urina. A creatinina presente na amostra é convertida a creatina pela ação da enzima creatinina amidohidrolase (Equação 3.8). E em seguida, a creatina é hidrolisada a sarcosina e ureia pela ação da enzima creatina amidohidrolase (Equação 3.9). Então, a enzima sarcosina oxidase promove a desmetilação oxidativa da sarcosina levando à produção de glicina, formaldeído e peróxido de hidrogênio (Equação 3.10). O peróxido de hidrogênio formado reage com o N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina (ESPTM) e 4-aminoantipirina, produzindo uma quinoneimina (Equação 3.11) que tem máximo de absorbância em 546 nm (ANALISA, 2012a).



Comumente, as reações utilizadas para a determinação de analitos clínicos são as reações de ponto final e a reação cinética de dois pontos. As reações correspondem ao resultado de atuação de um ou mais reagentes sobre o analito para formar o produto. As de ponto final são aquelas que formam um produto cuja concentração chega a um ponto máximo, permanecendo inalterada por um determinado tempo em função da estabilidade formada. A Figura 3.10 mostra graficamente uma reação de ponto final, a divisão em três etapas mostra o início e incremento na formação do produto, a etapa de estabilidade e o decaimento do produto por perda de estabilidade (BASQUES, 2010).

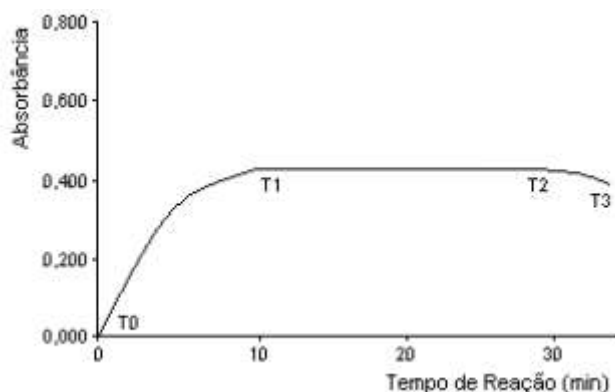


**Figura 3.10:** T0 – T1: Tempo de formação do produto. T1 – T2: Tempo em que a reação se completou e permanece estável. Neste intervalo será realizada a medição da quantidade de produto da reação. T2 – T3: Perda de estabilidade do produto formado.

A reação cinética de dois pontos é utilizada, principalmente, em metodologias automatizadas. Por exemplo, se uma determinação de glicose, utilizando a enzima glicose oxidase, é medida em 10 minutos na reação de ponto final, pode-se utilizar a reação cinética de dois pontos medindo a reação em um tempo de 5 minutos ou menos, quando se tem a certeza de que as medições das amostras serão realizadas no mesmo tempo de reação e que a velocidade da reação é a mesma para as amostras, controles e calibradores. Este método pode ser utilizado para diminuir o tempo de reação, minimizar a ação de interferentes ou estender a linearidade do sistema analítico. Comumente, as reações cinéticas de dois pontos utilizam a fase inicial da reação com uma medição aos 30 segundos, que servirá como branco, e outra medição aos 90 segundos. Utiliza-se então o delta da reação para calcular o a concentração do analito (Figura 3.11) (BASQUES, 2010).

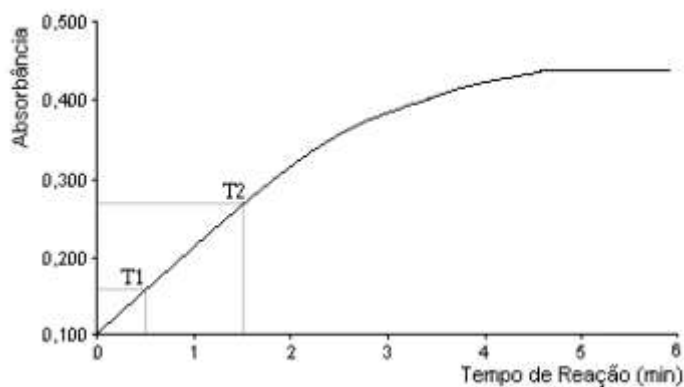


**Figura 3.11:** A diferença da absorbância: (T2 – T1) é utilizada para cálculo do resultado (BASQUES, 2010).

### 3.9 *Vantagens e limitações da utilização de enzimas em diagnóstico clínico*

Cada vez mais se torna crescente o uso de enzimas como reagentes analíticos, uma vez que oferecem a vantagem de maior especificidade para o substrato a ser determinado, evitando a necessidade de purificação da substância analisada. As enzimas podem ser usadas como reagentes na determinação de um analito, ou serem elas próprias o analito a se determinar. Em comparação com os métodos químicos, os métodos enzimáticos possuem como vantagens a rapidez e a sensibilidade em relação aos métodos químicos. Outra vantagem é que os reagentes enzimáticos conservam-se bem quando liofilizados, no entanto, uma vez hidratados têm um período de utilização muito reduzido, sendo difícil a sua conservação (MONTEIRO, SILVA, 2009).

As enzimas também possuem outras vantagens que justificam seu amplo uso, como o fato de serem produtos biológicos e biodegradáveis; não são consumidas durante o processo; são estereoespecíficas; atuam em pH e temperaturas brandas (MONTEIRO, SILVA, 2009).

Quando ocorre uma lesão patológica celular, há um aumento da concentração sérica de certas enzimas, porém, esse aumento sérico também pode ocorrer devido a outros fatores, como aumento do “turnover” celular; aumento da atividade da enzima e liberação da enzima na corrente sanguínea devido à obstrução dos canais, dificultando o diagnóstico clínico. Outra limitação que pode ser levada em consideração no uso de enzimas em diagnóstico clínico é a falta de especificidade para um tecido particular ou tipo de célula. Muitas enzimas estão presentes em mais de um tecido, dessa forma, o aumento sérico de determinada enzima pode refletir lesão de qualquer um dos tecidos, ou diferentes tecidos podem liberar, quando lesados, duas ou mais enzimas em proporções diferentes (MOTTA, 2009).

### 3.10 Situação do mercado e perspectivas

Desde meados dos anos 90, o mercado de análises clínicas tem sofrido mudanças significativas, como resultado da aceleração do desenvolvimento tecnológico e da implementação de novas técnicas e serviços capazes de processar testes diagnósticos com alta precisão, eficiência e em volumes maiores. O segmento apresenta algumas tendências como (DASA, 2014):

- Desenvolvimento de novas tecnologias para o desempenho das análises clínicas;
- Aumento de segurança e confiança pelos médicos nos testes diagnósticos, aumentando, assim, a demanda por estes exames e a receita gerada por eles;
- Aumento do conhecimento público sobre saúde em geral e medicina diagnóstica por causa da mídia e da internet;
- Criação de novos exames direcionados para detecção de doenças, consolidando o conceito de medicina preventiva;
- Constante desenvolvimento de novos medicamentos, gerando a demanda de pesquisa clínica para a sua aprovação.

O desenvolvimento de aplicações de enzimas em diagnóstico clínico e como medicamentos, nos últimos anos, tem tido um enorme crescimento devido à grande potencialidade desses marcadores biológicos (MUSSATO *et al.*, 2007). É um setor que vem crescendo devido aos avanços da biologia molecular e da engenharia de proteínas (CRUZ *et al.*, 2008).

O mercado de enzimas tem crescido muito nos últimos anos, fato que se deve a um aumento na produção industrial de enzimas e desenvolvimento de novas tecnologias e novos campos de aplicação. O mercado brasileiro de enzimas revela grande potencial devido à enorme geração de resíduos agroindustriais e ao dinamismo das indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos e celulose/papel (MUSSATO *et al.*, 2007).

O uso de catalisadores enzimáticos nos diversos seguimentos industriais tem sido uma tendência cada vez maior em todo o mundo, é uma grande expansão da biotecnologia

que movimenta milhões de dólares anualmente (MUSSATO *et al.*, 2007). Podemos considerar que, atualmente, a indústria farmacêutica representa um dos maiores produtores e usuários de enzimas. Elas podem ser aplicadas tanto na produção de medicamentos e no desenvolvimento de novos produtos, quanto em diagnóstico clínico e terapia (MONTEIRO, SILVA, 2009).

O Brasil, hoje, é um país essencialmente importador de enzimas, além de apresentar um uso ainda reduzido de enzimas em processos industriais, quando comparado com outros países. Assim, a inserção e consolidação do Brasil como produtor de tecnologia enzimática faz-se necessária (MONTEIRO, SILVA, 2009).

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nesta revisão foi possível perceber que as enzimas são alvos biológicos extremamente importantes na área farmacêutica, em razão do seu papel essencial em vias bioquímicas associadas a doenças e disfunções em humanos. O crescente conhecimento das doenças em nível molecular permite o desenvolvimento de terapias mais específicas, dessa forma, mais eficientes e menos sujeitas a efeitos colaterais e diagnósticos mais precisos. Estratégias modernas de planejamento de fármacos se fundamentam no conhecimento da fisiopatologia das doenças, no estudo de vias bioquímicas e na seleção de alvos moleculares. Dessa forma, as ferramentas biotecnológicas modernas têm fornecido informações valiosas para a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos.

Os métodos imunológicos estão distribuídos amplamente tanto na pesquisa como na análise bioquímica. Dentre as diversas vantagens destas técnicas, duas parecem ser as mais importantes para o grande sucesso destes métodos, a grande especificidade, facilmente conseguida com os anticorpos, e a grande sensibilidade destes métodos que utilizam as reações enzimáticas como marcadores.

Em relação à produção de fármacos enantiomericamente puros, pode-se perceber que se o isômero inativo (distômero) for eliminado da formulação farmacêutica, o fármaco

apresentará maior segurança terapêutica. Sendo as reações enzimáticas as únicas capazes de resolver as misturas racêmicas com os rendimentos e a segurança adequada para a produção de um fármaco.

Em alguns processos patológicos, as enzimas contribuem para estabelecer a causa, localização e grau de extensão da lesão, para fazer o controle do tratamento e ainda para determinar a cura.

As determinações enzimáticas de analitos presentes em amostras biológicas são extremamente importantes para a compreensão e controle de inúmeras doenças. Enzimas como a glicose oxidase e a colesterol oxidase possuem grande aplicação para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento da terapia de diversas patologias, gerando resultados rápidos e confiáveis sem a necessidade de purificação do analito a partir da amostra biológica.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEHLE, W. *Enzymes in Industry*. 3ed. Weinheim: Willey-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007. 489p.

ALLAIN, C. C.; POON, S. L.; CHAN, G. S. C.; RICHMOND, W.; FU, C. P. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clinical Chemistry*, v. 20, n. 4, p. 470-476, 1974.

ANALISA: Kit para determinação da creatinina por metodologia cinética-colorimétrica. Belo Horizonte: Gold Analisa [2012]a. Bula. Disponível em: <[http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7BD654D0FA-389C-4C01-9EA2-53CE2E8D0973%7D\\_creatinina\\_pp.PDF](http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7BD654D0FA-389C-4C01-9EA2-53CE2E8D0973%7D_creatinina_pp.PDF)> Acesso em: 24 de novembro de 2015.

ANALISA: Kit para determinação de ureia por metodologia enzimática colorimétrica. Belo Horizonte: Gold Analisa [2012]b. Bula. Disponível em: <[http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7B8E5B47D6-7A25-4ADE-90F0-B8A7C9443D1A%7D\\_UREIA\\_PP.PDF](http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7B8E5B47D6-7A25-4ADE-90F0-B8A7C9443D1A%7D_UREIA_PP.PDF)> Acesso em: 24 de novembro de 2015.

ANALISA: Kit para determinação do colesterol total por metodologia enzimática-colorimétrica. Belo Horizonte: Gold Analisa [2012]c. Bula. Disponível em: <[http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7BC63645F4-7E9C-45E4-9F51-4DDB4CD229A5%7D\\_colesterol\\_pp.pdf](http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7BC63645F4-7E9C-45E4-9F51-4DDB4CD229A5%7D_colesterol_pp.pdf)> Acesso em: 24 de novembro de 2015.

ANALISA: Técnicas para diagnóstico de doença de chagas. Belo Horizonte: Gold Analisa [2015]. Informe Técnico, n. 14, 2015.

BARREIRO, J. E.; FERREIRA, F. V.; COSTA, R. R. P. Substâncias Enantiomericamente Puras (SEP): A Questão de Fármacos Quirais. *Química Nova*, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 647-656, 1997.

BASQUES, C. J. Reagentes e Reações Intervenção em Problemas Técnicos. *Labtest*, 2010. Disponível em: [file:///C:/Users/Hernane/Downloads/Reagentes\\_e\\_Reacoes\\_Intervencao\\_em\\_Problemas\\_Tecnicos1%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Hernane/Downloads/Reagentes_e_Reacoes_Intervencao_em_Problemas_Tecnicos1%20(2).pdf) Acesso em 23 de novembro de 2015.

BATISTA, M. C.; CARVALHO, B. M. C.; MAGALHÃES, S. S. N.; Lipossomas e Suas Aplicações Terapêuticas: Estado da Arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 2008. 506p.

CAVALCANTI, A. B.; HEINISCH, R. H.; ALBINO, C. E.; ZUNINO, N. J. Diagnóstico do Infarto Agudo do Miocárdio. Valor da Dosagem de Mioglobina Sérica Comparada com a Creatinofosfoquinase e sua Fração MB. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 70, n. 2, p. 75-80, 1998.

CHUNG, M.; SILVA, A. T. A.; CASTRO, F. L.; GUIDO, C. V. R.; NASSUTE, C. J.; FERREIRA, I. E. Latenciação e Formas Avançadas de Transporte de Fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 2, p. 155-179, 2005.

CRUZ, M. E. M.; MARTINS, B. M.; EDNA, M.; CORVO, L. M.; GASPAR, M. M.; OLIVEIRA, M. M. E.; FERRARA, A. M. Enzimas em Medicamentos e Diagnósticos. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*, p. 305-328, 2008.

DASA: Mercado de Medicina Diagnóstica. 2014. Disponível em: <http://www.dasa3.com.br/static/ptb/mercado-de-medicina-diagnostica.asp?idioma=ptb#3>>. Acesso 02 de dezembro de 2015.

FABER, M. O. Isomerização Enzimática de Glicose a Frutose em Biorreator de Leito Fixo Alimentado Continuamente, 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2011.

FERREIRA, M.; COELHO, R.; LUZIO, J.; COUTINHO, P. Elevação da Lipase e Amilase no Doente Crítico. Estudo Restropectivo. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 20, n. 4, p. 362-369, 2008.

GIL, E. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I.; Some aspects of immunoassays applied to analytical chemistry. *Química Nova*, v. 22, n. 6, p. 874-881, 1999.

GUIDO, C. V. R.; ANDRICOPULO, D. A., OLIVA, G. Planejamento de Fármacos, Biotecnologia e Química Medicinal: Aplicações em Doenças Infecciosas. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

JEGANNATHAN, R. K.; NIELSEN, H. P. Environmental Assessment of Enzyme Use in Industrial Production – A Literature Review. *Journal of Clear Production*, v. 42, p. 228-240, 2012.

KOPETZKI, E.; LEHNERT, K.; BUCKEL, P.; Enzymes in Diagnostics: Achievements and Possibilities of Recombinant DNA Technology, *Clinical Chemistry*, v. 40, n. 5, p. 688-704, 1994.

LASIC, D. D.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Medical Applications of Liposomes, *Elsevier*, 1998.

LENZ, G. Métodos imunológicos. Porto Alegre: UFRGS – Biofísica, 1997. Disponível em: < <http://www.ufrgs.br/biofisica/Bio10003/MIMUNO.pdf>>. Acesso em 01/12/2015.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. *Industrial Biotransformations*. Weinheim: Willey-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. 556p.

LIMA, E. L. V. Os Fármacos e a Quiralidade: Uma Breve Abordagem. *Química Nova*, v. 20, n. 20, p. 657-663, 1997.

LOPES, J. J. H. Função Tireoidiana: Principais Testes Laboratoriais e Aplicações Diagnósticas. *Analisa*, 2002. Disponível em: < [http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7B43E10487-14C1-40F6-84F8-BEF35A95D379%7D\\_Funcao\\_Tireoidiana\[1\].pdf](http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7B43E10487-14C1-40F6-84F8-BEF35A95D379%7D_Funcao_Tireoidiana[1].pdf)> Acesso em 22 de novembro de 2015.

LOZOVVOY, M. A. B.; PRIESNITZ, J. C.; SILVA, S. A. Infarto Agudo do Miocárdio: Aspectos Clínicos e Laboratoriais. *Interbio*, v. 2, n. 1, p. 4-10, 2008.

LUCA, C. G.; REIS, F. B. Sistema em Fluxo para Determinação Espectrofotométrica de Ureia em Plasma de Sangue Animal Empregando Leguminosa como Fonte natural da Enzima Urease. *Química Nova*, v. 24, n. 2, p. 191-194, 2000.

MACHADO, F. U. Transportadores de Glicose. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 42, n. 6, p. 413-421, 1998.

MELO, S. C.; JUNIOR, C. S. A.; FIALHO, L. S. Formas Farmacêuticas Poliméricas para a Administração de Peptídeos e Proteínas Terapêuticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, n. 33, v. 4, p. 469-477, 2012.

MONTEIRO V.N. ; SILVA; R.N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Revista Processos Químicos*, v.3, n.5, p. 9-23, 2009.

MOTTA, T. V. Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações. 5ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2009. 400 p.

MUROOKA, Y.; YAMASHITA, M. Genetic and Protein Engineering of Diagnostic Enzymes, Cholesterol Oxidase and Xylitol Oxidase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, p. 433-41, 2001.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. *Ciência Hoje*, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274p.

NILSON, B. Enzyme-linked Immunosorbent Assays. *Current Opinion in Immunology*, v. 2, n. 6, p. 898-904, 1990.

OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.A.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. *Multi Ciência*, v. 7, p. 1-19, 2006.

ORDEN, V. E. D. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative assay of Immunoglobulin G. *Department of Obstetrics and Gynecology* v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

ORLANDO, M. P.; FILHO, C. N.; GIL, S. E.; STRINGHETTA, S. P. J. Importância Farmacêutica de Fármacos Quirais. *Revista Eletrônica de Farmácia*. v. IV, p. 8-9, 2007.  
PIEGAS, S. L. III Diretriz Sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 83, n. 4, p. 8-69, 2004.

SANTOS, R. F. R. *Orientação de Anticorpos em Alumínio Empregando Monocamadas Auto-Organizadoras para Produção de Microsensores Capacitivos*. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2007.

SARASWAT, M.; MUSANTE, L.; RAVIDÁ, A.; SHORTT, B.; BYRNE, B.; HOLTHOFER, H. Preparative Purification of Recombinant Proteins: Current Status and Future Trends. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-18, 2013.

SILVA, R. S. A.; SANTHIAGO, V.; PAPOTI, M.; GOBATTO, A. C. Comportamento das Concentrações Séricas e Urinárias de Creatinina e Ureia ao Longo de uma Periodização Desenvolvida em Futebolistas Profissionais: Relações com a Taxa de Filtração Glomerular. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 12, n. 6, p. 293-297, 2006.

WEETAL, H. H.; ROYER, G. P. Enzyme Engineering, *Journal of Biomechanical Engineering*, v. 5, 1980.

ZIMMER, K.; BORRÉ, G.; TRENTIN, D.; WOICICKOSKI JR, C.; FRASSON, A.; GRAEFF, A.; GOMES, P.; MACEDO, A. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. Revista Liberato, v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009.