

## Imobilização da enzima acetilcolinesterase em capilares de sílica fundida para estudos de inibição *on line*

Carmen L. Cardoso<sup>1\*</sup> (PQ), Marcela C. de Moraes<sup>2</sup> (PG), Joyce I. da Silva<sup>1</sup> (IC), Quezia B. Cass<sup>2</sup> (PQ).

<sup>1</sup>Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP. <sup>2</sup>Departamento de Química, UFSCar.

Palavras Chave: imobilização de enzimas, biorreatores, acetilcolinesterase, doença de Alzheimer, cromatografia seletiva de afinidade., triagem de inibidores

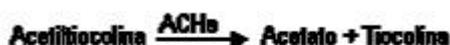
### Introdução

A enzima acetilcolinesterase (AChE) possui um importante papel no sistema nervoso central, catalisando a hidrólise do neurotransmissor ativo acetilcolina nos compostos inativos colina e ácido acético. Um dos fatores associados à Doença de Alzheimer (DA) é o baixo nível de acetilcolina na sinapse neural. As terapias aprovadas para o tratamento da DA são baseadas em inibidores da acetilcolinesterase, que mantêm altos níveis de acetilcolina nos receptores muscarínico e nicotínico no sistema nervoso central, o que a torna um ótimo alvo para o desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no tratamento da Doença de Alzheimer.<sup>1</sup>

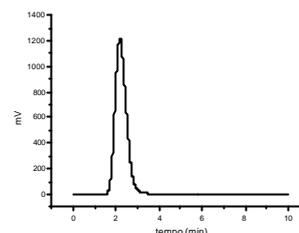
A imobilização de enzimas é uma técnica que tem sido amplamente explorada devido as vantagens em relação aos estudos envolvendo enzimas em solução ou tecnologias alternativas, como a fácil separação da enzima do meio reacional, e a possibilidade de reutilizar a enzima. A produção de reatores com enzimas imobilizadas (IMERs) possibilita o acoplamento *on line* de reações catalisadas por enzimas com um sistema de cromatografia líquida. Dessa forma, pode-se realizar a triagem de compostos candidatos a inibidores de uma maneira rápida e eficiente, utilizando-se a cromatografia seletiva de afinidade.<sup>2</sup>

### Resultados e Discussão

A AChE foi imobilizada em capilares de sílica fundida, onde a enzima é ligada covalentemente à parede do capilar, utilizando glutaraldeído como espaçador. A atividade da enzima foi monitorada pela formação do ânion amarelo, produto da reação entre o reagente de Ellman e a tiocolina obtida a partir da hidrólise enzimática da acetiltiocolina.<sup>3</sup>



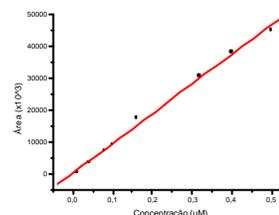
**Esquema 1.** Reações envolvidas no método empregado para monitorar a atividade da AChE imobilizada.



**Figura 1.** Cromatograma correspondente ao ânion amarelo formado no monitoramento da atividade enzimática. Fase móvel: Tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 8,0), reagente de Ellman (0,126 mM), MgSO<sub>4</sub> (10 mM), KClO<sub>3</sub> (100 mM). Vazão 50 µL/min, λ = 450 nm.

Uma curva analítica foi construída para a quantificação da atividade enzimática, injetando-se 15 µL de soluções com concentrações de 5-400 µM de acetiltiocolina no biorreator ativo, considerando-se 100% de conversão do substrato ao produto.

**Figura 2.** Curva analítica para a quantificação da



tiocolina formada a partir da reação enzimática.

### Conclusões

O capilar de sílica fundida demonstrou ser uma boa alternativa como suporte para a imobilização da acetilcolinesterase. Com o método desenvolvido a enzima reteve a atividade catalítica e mostrou boa estabilidade, além disso a atividade enzimática pode ser monitorada em um curto tempo de análise.

### Agradecimentos

À FAPESP, CNPq e Capes pelos auxílios e bolsas concedidas.

<sup>1</sup> Bartolini, M.; Cavrini, V.; Andrisano, V. *J. of Chrom. A* **2004**, *2031*, 27.

<sup>2</sup> Cardoso, C.L. et al. *Analyst* **2008**, *133*, 93.

<sup>3</sup> Ellman, G. L.; *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.