

Biorreatores enzimáticos de Acetilcolinesterase para triagem de ligantes *on line*.

Joyce Izidoro da Silva¹ (PG)*, Marcela C. de Moraes² (PG), Patrícia C. Nicastro³ (IC), Poliana C. Fossaluzza³ (IC), Claudio Viegas Jr.³ (PQ), Quezia B. Cass² (PQ) e Carmen L. Cardoso¹ (PQ).

¹Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP. ²Departamento de Química, UFSCar. ³Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG.

Palavras Chave: imobilização de enzimas, biocromatografia, Mal de Alzheimer, inibidores seletivos, acetilcolinesterase.

Introdução

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 enzima acetilcolinesterase (AChE), 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.¹ A imobilização de enzimas tem mostrado diversas vantagens sobre os estudos envolvendo enzimas em solução ou tecnologias alternativas, como a fácil separação da enzima do produto da reação, a possibilidade de reutilizar a enzima e a necessidade de pequenos volumes de amostra. Em continuação aos trabalhos com imobilização de enzimas desenvolvido em nosso grupo a enzima AChE foi imobilizada em capilares de sílica fundida com sucesso.² O presente trabalho tem como objetivo avaliar o biorreator de AChE em função de sua atividade catalítica, o tempo de análise e, a estabilidade do biorreator na presença de inibidores conhecidos além de avaliar uma coleção de substâncias preparadas como inibidores de AChE.

Resultados e Discussão

A enzima AChE foi imobilizada em capilares de sílica fundida com dimensões de 25 cm x 0,1 mm D.I. pelo método de imobilização pelo agente homobifuncional amino-reativo, o glutaraldeído.³ Os estudos realizados mostraram a necessidade de uma vazão menor (0,05mL/min) para que a conversão do substrato ao produto ocorra com maior eficiência (Fig 1A). Os valores de K_M obtidos mostram uma menor afinidade pelo substrato no biorreator quando comparada com os valores em solução, tal diferença pode estar relacionada às modificações estruturais na biomolécula esperadas após o processo de imobilização (Fig 1B).

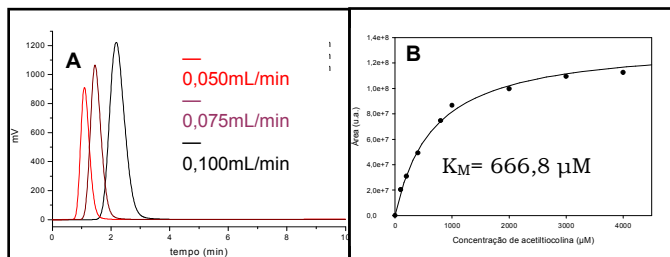


Figura 1A. Cromatograma correspondente ao ânion amarelo formado no monitoramento da atividade enzimática. Fase Móvel: Tampão Tris-HCl (0,1M pH 8,0) e reagente de Ellman (0,1 mM). **1 B.** Curva cinética de Michaelis Menten. Enzima imobilizada $K_M = 666,8 \mu\text{M}$; enzima livre em solução $K_M = 76,27 \mu\text{M}$.¹

* joyceizidoro@yahoo.com.br

Inibidores conhecidos de AChE (tabela 1) foram avaliados no biorreator e seus valores de IC_{50} calculados.

Composto	IMER - AChE	IMER-AChE Literatura ⁴	AChE (solução)	AChE (solução) Literatura ⁴
Propídio	48,9 ± 7,9 μM	341 ± 0,25 μM	35,6 ± 9,2 μM	32,3 ± 0,22 μM
Galantamina	12,8 ± 2,4 μM	42,4 ± 0,21 μM	1,27 ± 0,15 μM	4,24 ± 0,21 μM
Tacrina	85,94 ± 16,15 nM	0,45 ± 0,03 μM	262,5 ± 50,3 nM	0,44 ± 17,6 μM
Rivastigmina	20,6 ± 4,9 μM	6,40 ± 0,93 μM	-	0,73 μM

Tabela 1 Comparação dos valores de IC_{50} dos inibidores padrões da AChE no biorreator e livre em solução.

As diferenças observadas nos valores de IC_{50} (Tab. 1) em relação aos valores encontrados na literatura⁴ podem estar relacionadas ao efeito do suporte sobre o sítio ativo e/ou substrato. Uma coleção de compostos planejados e sintetizados como inibidores de AChE também foi avaliada por métodos conhecidos⁵ e comparados com os resultados observados no biorreator (Fig 2). Os compostos que inibiram a atividade

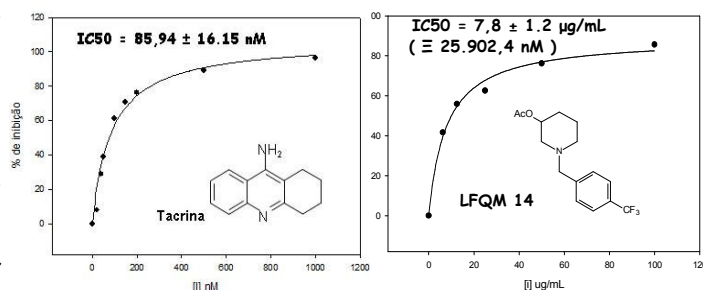


Figura 2. Curva de IC_{50} de inibidores da AChE. 2A Composto padrão Tacrina e 2B composto sintetizado LFQM 14.

da AChE em TLC também inibiram no biorreator corroborando a sensibilidade do método. A estabilidade do biorreator foi avaliada em função do tempo, e permaneceu ativo por um período superior a 10 meses com perda de 22% da atividade inicial.

Conclusões

No método desenvolvido a atividade catalítica foi preservada ótima estabilidade. Além disso, os resultados evidenciaram sensibilidade do biorreator e corroboram a possibilidade da utilização desses biorreatores na triagem de coleções de compostos inibidores da acetilcolinesterase.

Agradecimentos

À FAPESP, CNPq e Capes.

¹ Rosenberg, D.R., et al, *Drugs Today*, **1990**, 26, 44.

² Silva, J. I. Moraes, MC, Cass, QB, Cardoso C,L (resultados não publicados)

³ Cardoso, C.L. et al. *Analyst* **2008**, 133, 93.

⁴ Andriassano, V, et al. *J. of Chrom. B*, **753 (2001)** 375–383.

⁵ Ellman, G. L.; *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88.