

Biorreatores capilares da enzima Butirilcolinesterase: novo formato para triagem de inibidores seletivos

Adriana Ferreira Lopes Vilela (IC),¹ Joyce Izidoro da Silva (PG)¹, e Carmen Lúcia Cardoso (PQ)^{1*}

¹ Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP.

Palavras Chave: butirilcolinesterase, imobilização de enzimas, triagem, inibidores, biorreatores capilares.

Introdução

A descoberta de inibidores seletivos para a enzima butirilcolinesterase (BuChE) tem grande importância no desenvolvimento de pesticidas para o combate às pragas nas lavouras e fármacos para o tratamento de pacientes diagnosticados com a Doença de Alzheimer.¹ O trabalho de identificação de inibidores seletivos pode ser intensificado com o desenvolvimento de métodos eficientes e rápidos para triagem de coleções e extratos naturais. Nesse contexto, a produção de reatores com enzimas imobilizadas (IMERs) possibilita o acoplamento *on line* de reações catalisadas por enzimas com um sistema de cromatografia líquida (CL) torna-se uma abordagem interessante nos estudos de triagem de inibidores seletivos. Em continuação aos trabalhos com imobilização de enzimas desenvolvidos em nosso grupo² a enzima BuChE foi covalentemente imobilizada nas paredes internas de capilares de sílica fundida resultando no IMER-BuChE que foi acoplado a um sistema de CL. A atividade, estabilidade e constantes cinéticas do IMER-BuChE foram avaliadas e o método de triagem validado.

Resultados e Discussão

A atividade enzimática do IMER-BuChE foi avaliada pelo método colorimétrico modificado de Ellman³. Tal método baseia-se na produção da tiocolina através da hidrólise do análogo do substrato da BuChE, a butiriltiocolina. A tiocolina reage com o chamado reagente de Ellman presente na fase móvel formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo com intensa absorção em 412 nm. Após a imobilização foram realizados estudos sobre a influência da vazão, do pH e uso de solventes orgânicos na atividade enzimática.

Os estudos sobre a vazão mostraram uma conversão mais eficiente do substrato em produto quando da utilização de 0,05 mL/min. (Fig. 1).

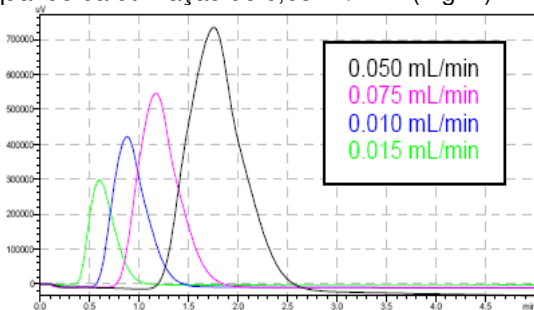


Figura 1. Influência da vazão sobre a atividade enzimática.

No estudo da influência do pH foram avaliados pHs: 6,0; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0, e a enzima apresentou máxima atividade e por tempo de exposição em tampão com pH 9,0. Fig. 2A

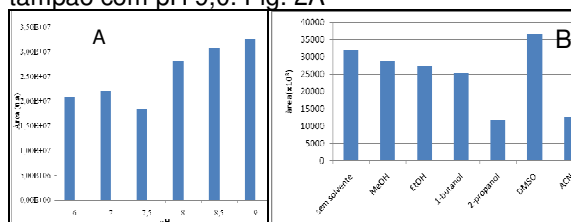


Figura 2. Atividade enzimática em função do pH. (A) Influência do uso de solventes orgânicos (em 50%) sobre a atividade enzimática. (B)

Na triagem de compostos é comum o uso de solventes orgânicos no preparo das amostras e estes podem afetar a atividade da enzima. A influência desses solventes também foi avaliada em 50% (v/v).

Como mostra a figura 2B os solventes orgânicos isopropanol e acetonitrila, são os menos indicados para o uso no biorreator, pois provocaram uma queda maior que 50% da atividade enzimática inicial. Observa-se, no entanto, que em presença de DMSO a atividade catalítica não foi afetada.

Conclusões

A escolha do suporte e o método de imobilização utilizado foi eficiente com a retenção da atividade catalítica da enzima. O IMER manteve-se estável e ativo por um período superior a 8 meses, permitindo a sequência do trabalho iniciado e sua utilização em estudos de inibição *on-line*.

Agradecimentos

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

¹ Giacobini E. (Ed) Butyrylcholinesterase: its function and inhibitors. 2003, Martin Dunitz: London. 181p.

² a) Cardoso, C. L.; Cass, Q. B. *et al. J. Chromatog. A.* **2006**, *1120*, 151.

b) Cardoso, C.L. *et al. Analyst* **2008**, *133*, 93. c) Silva, J.I., Cardoso, C.L., *et al. submitted*.

³ Ellman, G. L.; *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.