

## Estudos sobre os parâmetros cinéticos da reação da enzima Acetilcolinesterase imobilizada sobre nanotubos de carbono

Érica M. Kataoka\* (IC), Lívia S. Florio (PG), Murilo F. Cabral (PQ), Marcos R. V. Lanza (PQ), Sergio A. S. Machado (PQ)

Instituto de Química de São Carlos (IQSC). Universidade de São Paulo (USP). \*kataoka.ERICA@gmail.com

Palavras Chave: Acetilcolinesterase, Nanotubos de Carbono, UV-Vís, Carbaril

### Introdução

Acetilcolinesterase (AChE) hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina após as sinapses colinérgicas no sistema nervoso central e periférico, e assim é uma enzima-alvo para vários agentes farmacológicos e pesticidas utilizados em muitas culturas<sup>1</sup>.

Visando a aplicação desta enzima em biossensores, um dos grandes desafios é garantir a estabilidade da enzima após a etapa de imobilização sobre o elemento transdutor. Neste caso, os nanotubos de carbono (MWCNT) e materiais derivados vêm sendo bastante empregados<sup>2</sup>. A etapa de imobilização pode ocorrer via interação eletrostática ou via reações de acoplamento, sendo que no caso das reações de acoplamento pode-se evitar a lixiviação da enzima do transdutor<sup>3</sup>.

Um aspecto importante nos estudos com enzimas são seus parâmetros cinéticos, embora pouco abordados em estudos com biossensores. Estes parâmetros podem fornecer informações interessantes, principalmente, no caso de estudos com inibidores. Assim, o objetivo deste trabalho é trazer novos entendimentos sobre os mecanismos relacionados à inibição enzimática para posteriores aplicações dos biossensores.

### Resultados e Discussão

O acoplamento da enzima sobre MWCNT foi realizado por meio de uma reação de acoplamento utilizando-se EDC e NHS. Os estudos cinéticos foram realizados utilizando o protocolo estabelecido para a AChE<sup>4</sup>. O inibidor escolhido para estes estudos foi o carbaril. Para obtenção dos parâmetros cinéticos foram construídos gráficos de Lineweaver-Burk como mostrados na Figura 1.

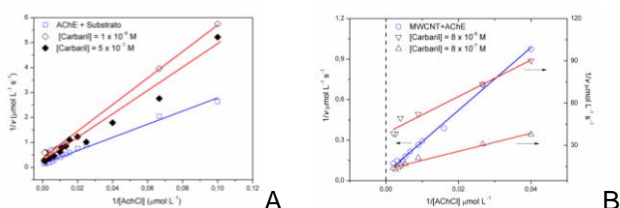


Figura 1. Gráficos de Lineweaver-Burk para (A) enzima AChE em solução na presença do substrato (cloreto de acetilcolina) e na presença de carbaril.

(B) MWCNT+AChE na presença do substrato e na presença de carbaril.

Os dados obtidos a partir do ajuste linear das curvas ( $1/v_0 = (K_M + V_{max})1/[S] + 1/V_{max}$ ) para a Fig1A mostram que os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  foram iguais a  $1,92 \times 10^{-4}$  M e  $7,26 \times 10^{-6}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente. Já na presença de carbaril, os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  sofrem influência do parâmetro alfa ( $\alpha$ ) que aumenta a inclinação das retas obtidas. Uma vez que  $\alpha = 2$  ([Carbaril] =  $5 \times 10^{-7}$  M), os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  se tornam iguais a  $3,84 \times 10^{-4}$  M e  $7,21 \times 10^{-6}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores de  $V_{max}$  praticamente não se alteraram, mas os valores de  $K_M$  são diferentes. A análise desses dados aponta para um mecanismo de inibição competitiva, porém ainda não pode se afirmar se esta inibição é reversível. Para a Fig1B, após a enzima imobilizada sobre os MWCNTs os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  foram iguais a  $4,11 \times 10^{-4}$  M e  $17,7 \times 10^{-6}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses valores são bastante diferentes em relação aos observados para enzima livre. Assim, os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  ([Carbaril] =  $1 \times 10^{-7}$  M) foram iguais a  $2,29 \times 10^{-2}$  M e  $5,78 \times 10^{-10}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores são maiores do que os observados anteriormente, pois a enzima encontra-se imobilizada.

### Conclusões

Esses resultados indicam que o processo de acoplamento da AChE sobre os MWCNTs, altera a estrutura da enzima. Assim, os parâmetros cinéticos apresentaram valores diferentes daqueles observados para enzima livre. A presença do transdutor interfere no desempenho da catálise enzimática e podendo, por sua vez alterar os mecanismos de reação da enzima na presença de inibidores.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES/PNPD e a FAPESP.

<sup>1</sup> Tai, K.; Shen, T. Y.; Henchman, R. H.; Bourne, Y.; Marchot, P.; McCammon, J. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 6153. <sup>2</sup> Felhofer, J. L.; Caranto, J. D.; Garcia, C. D. *Langmuir*. **2010**, *26*, 17178. <sup>3</sup> Liu, G.; Lin, Y. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 835. <sup>4</sup> Gambi, N.; Pasteris, A.; Fabbri, E. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *145*, 678.