

Biorreatores capilares com as enzimas Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase : Aplicação na triagem de inibidores seletivos.

Adriana Ferreira Lopes Vilela (PG)^{1*}, Joyce Izidoro da Silva (PG)¹, Lucas Campos Curcino Vieira², Arlene Gonçalves Corrêa² e Carmen Lúcia Cardoso (PQ)¹.

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

² Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.

Palavras Chave: *butirilcolinesterase, acetilcolinesterase, imobilização de enzimas, triagem, inibidores de seletivos*

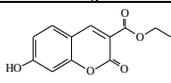
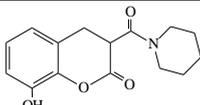
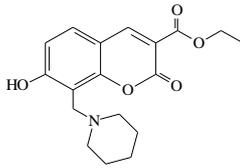
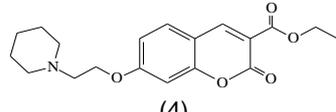
Introdução

Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE) são serinas hidroxilases associadas com a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) produzindo colina e ácido acético. A descoberta de inibidores seletivos para estas enzimas são de grande importância no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de pacientes diagnosticados com a Doença de Alzheimer (DA)¹. Uma abordagem interessante nos estudos de triagem de inibidores seletivos é a utilização de biorreatores com enzimas imobilizadas (ICERs) e seu acoplamento *on line* a um sistema de cromatografia líquida (CL), uma técnica rápida e eficaz na identificação de inibidores seletivos. Em continuação aos trabalhos com imobilização de enzimas desenvolvidos em nosso grupo², os biorreatores da AChE e BChE foram usados na triagem de uma coleção de 21 cumarinas e na avaliação da seletividade de 4 destes compostos.

Resultados e Discussão

Em trabalhos anteriores foram descritas as condições de preparação dos ICERs.² A atividade enzimática é monitorada pela quantificação do produto de hidrólise a tiocolina, através de sua derivatização com o reagente de Ellman³. A diminuição da atividade da AChE e BChE foi expressa pela diminuição da área do pico detectado em 412 nm com um tempo de retenção de 3 minutos. A triagem da atividade inibitória dos derivados de cumarinas foi realizada com a injeção de uma amostra contendo 200 μ M do composto candidato e 5 mM do substrato da Acetilcolina (ATChI) para o ICER-AChE e 200 μ M composto e 200 mM de butirilcolina (BTChI) para ICER-BChE. Os resultados obtidos na triagem inicial são mostrados na tabela 1. Comparando os resultados obtidos, embora o composto **1** tenha apresentado atividade inibitória em ambas as enzimas, maior atividade foi observada para enzima BChE. Não foi observada seletividade entre os compostos **2** (inativo) e o composto **3**, com alta atividade para ambas as enzimas. Já para o composto **4** observa-se uma seletiva atividade inibitória para ICER-AChE.

Tabela 1. Atividade inibitória para ICER-BuChE e ICER-AChE.

Composto	(%) inibição ICER-BChE a 200 μ M	(%) inibição ICER-AChE a 200 μ M
Eserina (padrão)	77,0	----
Tacrina (padrão)	----	93,1
 (1)	56,1	39,8
 (2)	0,20	2,30
 (3)	70,3	69,0
 (4)	1,60	85,9

Conclusões

O método empregado demonstrou que os ICERs foram capazes de identificar potenciais inibidores seletivos. Neste estudo, dois inibidores promissores foram identificados (**3** e **4**) e os próximos experimentos envolvem estudos de IC₅₀, bem como teste com os outros compostos da coleção de cumarinas.

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. J. Pharm. Biol. Anal. In press*

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