



EXTRAÇÃO DE ENZIMA ACETILCOLINESTERASE DE PLANTA

Nayara Araujo Cabral¹; Sonia Tomie Tanimoto²

¹Acadêmica do Curso de Engenharia Química, UNICESUMAR, Maringá-PR. Bolsista PiBIC/UniCesumar.

²Orientadora, Prof. Pós-doutora, do Centro de Ciências Exatas, Tecnológicas e Agrárias, UNICESUMAR, Maringá-PR.

RESUMO: Enzimas acetilcolinesterase podem interagir com diversas moléculas, permitindo seu uso como sensores, principalmente na determinação de pesticidas no ambiente. Isso faz com que seja necessário a realização de estudos sobre a extração desta enzima, para que ela possa ser isolada e utilizada como sensor para determinação de pesticidas. Em geral, as enzimas são obtidas de fontes animais (peixe elétrico), entretanto, plantas como raiz forte podem ser uma fonte de enzima acetilcolinesterase para uso em biossensores óticos ou até mesmo visuais. O objetivo principal deste trabalho está centrado na tentativa de obter a enzima acetilcolinesterase da planta *Zingiber officinale* Roscoe, através da extração por meio de diferentes solventes, de forma que sua atividade enzimática permaneça inalterada.

PALAVRAS-CHAVE: Enzimas; gengibre; extração; pesticidas.

1 INTRODUÇÃO

A acetilcolinesterase (AChE) tem uma importância inquestionável para o adequado funcionamento das sinapses colinérgicas presentes em nosso sistema nervoso central e periférico, fato que torna esta enzima um alvo atraente para o desenvolvimento de novas drogas. Neste contexto, o conhecimento das metodologias que podem ser empregadas para avaliar a atividade enzimática da AChE é um fator importante para o sucesso de pesquisas científicas relacionadas a esta enzima. (Araújo et al.,2016).

Devido a sua sensibilidade, esta enzima tem sido muito utilizada como biossensor para determinação de contaminação, principalmente de pesticidas organofosforados e carbamatos (ZHANG, 2001).

Os componentes biológicos podem ser acoplados em transdutores óticos ou eletroquímicos para formar um dispositivo biossensor, devido a sua elevada afinidade as moléculas e biomoléculas. Embora, sua elevada sensibilidade as diversas moléculas, este processo não é classifica o contaminante, apenas estabelece o índice de contaminação (MARTY, 1995).

Pesticidas dos tipos organofosforados e carbamatos são capazes de inibir a AChE, sendo esta a causa da alta toxicidade destes compostos. Estima-se que em países em desenvolvimento, os agrotóxicos causem anualmente 70 mil intoxicações agudas e crônicas que evoluem para óbito.20 No Brasil, o Ministério da Saúde estima que, por ano, existam mais de 400 mil pessoas contaminadas por agrotóxicos, com cerca de 4 mil mortes. Dentro deste cenário, os organofosforados são responsáveis pelo maior número de intoxicações agudas e mortes. (Araújo et al.,2016).

Os carbamatos, usados com inseticidas, são compostos anticolinesterásicos, com variado grau de toxicidade para o ser humano. São utilizados como inseticidas, fungicidas e parasiticidas na agricultura. É um produto comercializado em todo o mundo, sendo um dos principais tipos de inseticidas, são produzidos em 25 diferentes compostos sendo o carbamato aldicard "o chumbinho" o principal agente envolvido nas tentativas de suicídio e nas intoxicações pediátricas. A Organização Mundial de Saúde estima que ocorrem cerca de aproximadamente três milhões de envenenamentos humanos em consequência de pesticidas por ano, em todo o mundo, e cerca de mais de 220.000 mortes. Sendo, portanto, um problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, nos quais ocorrem os maiores índices de morbidade e mortalidade relativa a estes produtos. (Souza et al.,2005).



Sabendo do amplo uso desta enzima, principalmente como sensor para pesticidas, é importante determinar se a enzima obtida de plantas apresenta a mesma sensibilidade das obtidas de fontes animais. Este trabalho consiste na obtenção de enzima acetilcolinesterase da planta *Zingiber officinale* Roscoe, popularmente conhecida como gengibre.

Devido ao abundante uso de pesticidas nas áreas agrícolas e urbanas (controle de pragas como dengue), o uso de indicadores de pesticidas de alta sensibilidade e eficiência é de extrema importância, desta forma, estudar e compreender novas formas de obtenção da enzima acetilcolinesterase, para construção de sensores faz-se importante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para potencializar a extração, o gengibre foi picado e também foi preciso ter cautela em relação à temperatura, pois caso existisse a presença da enzima, esta poderia ser desnaturada se colocada num meio de elevadas temperaturas.

No presente trabalho, foi testada diferentes maneiras de extrações e diferentes solventes, são eles:

- Extração Soxhlet, solvente: álcool;
- Extração utilizando o agitador Vortex, solvente: HCl - 0,1 mol/L (ácido clorídrico);
- Extração utilizando o agitador Vortex, solvente: NaOH 50% - 0,1 mol/L (hidróxido de sódio);
- Extração utilizando o agitador Vortex, solvente: KCl - 0,1 mol/L (cloreto de potássio);
- Extração utilizando funil de separação, solvente: KCl - 0,1 mol/L (cloreto de potássio);
- Extração utilizando funil de separação, solvente: Na₂HPO₄ (sódio fosfato anidro);
- Extração utilizando funil de separação, solvente: Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (sódio fosfato anidro);
- Extração utilizando funil de separação, solvente: tampão amônia.

Para a determinação da atividade da acetilcolinesterase, Kramer e Gamson empregaram o acetato de indofenol como agente colorimétrico. Neste método, a determinação enzimática está relacionada com a geração de cromóforo de indofenol (azul), resultado da reação de hidrólise de acetato de indofenol (vermelho) pela Ache. (Araújo et al., 2016).

Como não foi possível o acesso ao acetato de indofenol, testou-se a determinação através de um composto da família do acetato de indofenol, o 2,6-diclorofenolindofenol (C₁₂H₇NCl₂O₂). Então, foi preparada a solução reveladora: 0,018g de 2,6-diclorofenolindofenol em 100 mL de água.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises foram feitas analisando a mudança ou não de cor da solução reveladora ao ser misturada com o extrato.

Alguns extratos com seus respectivos solventes foram descartados pois criaram fungos.

Os extratos que utilizaram como solventes o Na₂HPO₄ (sódio fosfato anidro) e o NaOH (hidróxido de sódio) foram misturados com a solução reveladora, e ambos não apresentaram modificações.

Já os extratos que utilizaram como solventes a acetona e o álcool, quando misturados com a solução reveladora apresentaram modificações na cor.

Depois de constatada a mudança de cor, foi feita a análise no espectrofotômetro, para observar a variação de absorvância nas amostras com os diferentes solventes. Realizou-se três procedimentos,

sendo que para execução do procedimento 2 e 3 foi misturado a solução reveladora com extrato na proporção de 1:1, sendo eles:

- Procedimento 1: em uma cubeta foi colocada 4 mL de água destilada e em outra 2 mL de solução reveladora diluída em 2 mL de água destilada;
- Procedimento 2: em uma cubeta foi colocada 4 mL de água destilada e em outra 2 mL de extrato-álcool+ solução reveladora diluída em 2 mL de água destilada;
- Procedimento 3: em uma cubeta foi colocada 4 mL de água destilada e em outra 2 mL de extrato-acetona+ solução reveladora diluída em 2 mL de água destilada.

As análises foram feitas de 343 nm a 733 nm, e são apresentadas no gráfico a seguir:

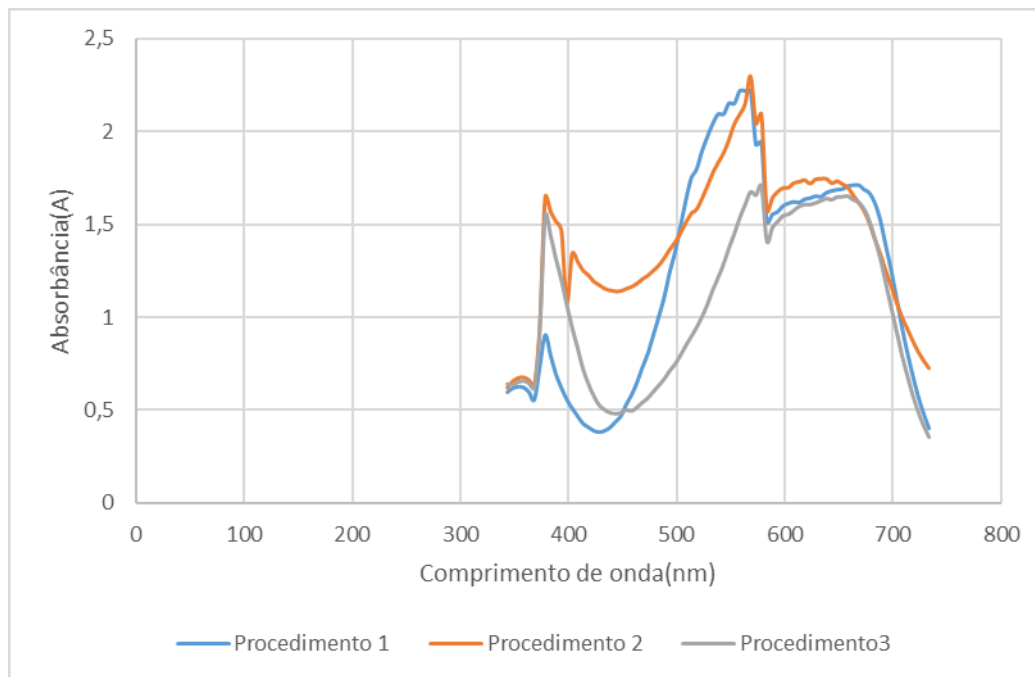


Figura 1- Análise dos comprimentos de onda versus absorbância

De acordo com o gráfico, é possível notar a presença de picos na região próximo a 350 nm e entre 500 e 600 nm. Esses picos caracterizam a reação entre a molécula reveladora e a enzima extraída com os solventes álcool e acetona, percebe-se porém, que com acetona, a extração apresenta uma definição melhor dos picos.

4 CONCLUSÃO

De todos os solventes possíveis para extração da enzima acetilcolinesterase, os solventes mais apropriados são álcool e acetona, sendo a acetona, mais eficiente no processo de extração. Seria necessários novos testes, mais precisos, entretanto, a metodologia convencional utilizada mostra-se eficiente. Recomenda-se um estudo mais detalhado, utilizando esses solventes.

5 REFERÊNCIAS

Araújo, C. R. M. et al. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. Revistas Virtual de Química, 2016..



MARTY, J-L.; GARCIA, D.; ROUILLON,

R. Biosensors: potential in pesticide detection. Trends in analytical chemistry, vol. 14, no. 7, 1995.

Souza, L. J. E. et al. ENVENENAMENTO POR CARBAMATO EM CRIANÇAS: ESTUDO DESCRITIVO. RBPS 2004; 17 (4): 193-199

ZHANG, S.; ZHAO, H.; JOHN, R. Development of a quantitative relationship between inhibition percentage and both incubation time and inhibitor concentration for inhibition biosensors—theoretical and practical considerations. Biosens. & Bioelectron., 16 (2001) 1119.