

Uma alta concentração extracelular de glutamato (Glu) pode ser excitotóxica e levar à morte celular. A quantificação do Glu extracelular permite identificar mecanismos de dano tecidual no SNC mediados por liberação de quantidades excitotóxicas de Glu. O objetivo deste trabalho é desenvolver uma técnica versátil, de baixo custo e sensível para dosagem do Glu extracelular. A técnica baseia-se na reação de conversão do Glu em  $\alpha$ -cetoglutarato, catalisada pela enzima L-glutamato desidrogenase (GDH), acoplada à redução de  $\text{NAD}^+$  à NADH. A dosagem do Glu é feita indiretamente, pela quantificação da fluorescência emitida pelo NADH a 460 nm, quando excitado a 340 nm. Os experimentos foram realizados num meio a  $37^\circ\text{C}$  contendo HEPES 10 mM, GDH,  $\text{NAD}^+$  e Glu. Foram realizadas curvas de tempo de reação, de concentração de GDH, de concentração de  $\text{NAD}^+$  e de concentração de Glu. Com exceção da última curva, as demais foram realizadas num meio contendo 10  $\mu\text{M}$  de Glu. Entre 5 e 20 min de reação, não foi observada variação da fluorescência e o tempo de 10 min foi escolhido para a realização dos demais experimentos. Em concentrações abaixo de 0,1 mM de  $\text{NAD}^+$ , a fluorescência do NADH produzido não foi detectada pelo leitor de fluorescência, indicando que, em tais condições, o  $\text{NAD}^+$  é o reagente limitante da reação. A sensibilidade da técnica à quantidade de Glu foi determinada por meio de uma curva de concentração de Glu. Verificou-se uma relação linear entre a fluorescência emitida e a quantidade de Glu até 2,6 nmol de Glu. A concentração de GDH escolhida foi de 5 U/mL, a qual foi sensível e assegurou uma diminuição do custo da técnica. Esses resultados indicam que essa técnica apresenta baixo custo e alta sensibilidade para dosagem do Glu extracelular. Experimentos adicionais são necessários, no entanto, para sua validação em amostras de líquido, cultura de células e fatias cerebrais.