

CITOTOXICIDADE DO COPOLÍMERO PEBD-e-PHEMA OBTIDO POR RADIAÇÃO IONIZANTE

Solange G. Lorenzetti¹, Maria A. P. Camillo¹, Álvaro A.A. de Queiroz² e Olga Z. Higa¹

¹ Centro de Biologia Molecular - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN)
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242
05508-000 Cidade Universitária, SP
solangl@ig.com.br

² Departamento de Física e Química – Universidade Federal de Itajubá
Itajubá, MG

RESUMO

Biomateriais poliméricos são os polímeros descritos na literatura que são usados na medicina e biotecnologia.. O objetivo do trabalho foi o de obter superfícies poliméricas biocompatíveis para posterior imobilização de compostos protéicos sobre um copolímero de enxerto obtido via radiação ionizante. Foram preparados copolímeros de enxerto utilizando polietileno de baixa densidade (PEBD) com o monômero metacrilato de 2-hidroxieta (HEMA), irradiados em fonte de ⁶⁰Co em diferentes condições. Os graus de enxertia variaram de 2 a 50%. Após a copolimerização foram observadas as configurações estruturais do PEBD enxertado por espectroscopia no infravermelho (FTIR). As micrografias do MEV do PEBD mostraram uma superfície lisa enquanto que os copolímeros com níveis aumentados de enxertia apresentaram superfícies rugosas, devido a presença crescente de PHEMA. A propriedade hidrofílica foi verificada com o crescimento da enxertia devido presença do polímero PHEMA no copolímero de PEBD. O coeficiente de difusão foi determinado com base os resultados obtidos no teste de hidrofiliidade. . Foi realizado o teste de citotoxicidade do copolímero para comprovar a biocompatibilidade. Este ensaio baseia-se na avaliação quantitativa da viabilidade celular em células CHO após a exposição com agentes tóxicos, utilizando o corante vital MTS. A quantidade de MTS absorvido pela população de células é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura.. Os copolímeros de enxerto foram avaliados e pôde-se verificar que os mesmos não apresentam toxicidade podendo ser utilizados como biomaterial. Posteriormente será imobilizado a enzima fosfolipase A2, obtida da purificação do veneno de cascavel, sobre o copolímero desenvolvido neste trabalho.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a ciência de biomateriais é responsável pela maioria das inovações tecnológicas presentes nas áreas biomédicas e biotecnológica. O termo biomaterial reúne um grande número de diferentes produtos os quais, todos por definição, têm como objetivo o uso em contato com organismos vivos ou seus fluidos. O corpo e seus fluidos estão essencialmente em meio aquoso e quando se pretende obter materiais para contactá-los, é interessante verificar a possível adequação de materiais hidrofílicos. Os géis poliméricos hidrofílicos, denominados de hidrogéis, tiveram sua primeira aplicação descrita por Witcherle e Lim em

1960[1], que consistia em hidrogéis sintéticos baseados em poli(metacrilato de 2-hidroxietila) PHEMA e que apresentou biocompatibilidade com o tecido.

A síntese de polímeros utilizando a radiação ionizante, apresenta algumas vantagens sobre as metodologias convencionais devido estar envolvido na formação de radicais livres ou reações iônicas, não havendo a necessidade de aquecimento do sistema reacional nem da adição de catalisadores[2]. Dentre as várias aplicações desta técnica destaca-se a síntese de copolímeros de enxerto para a preparação de membranas trocadoras de íons e polímeros especiais utilizados na medicina e biotecnologia[3].

Este trabalho possui como objetivo obter uma superfície polimérica biocompatível não citotóxica para ser posteriormente utilizada para imobilização da enzima fosfolipase A₂ obtida da purificação do veneno de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*).

2. EXPERIMENTAL E DISCUSSÃO

2.1. Obtenção da matriz polimérica

Foram preparados copolímeros de enxerto do PEBD com o monômero HEMA, os quais foram obtidos em três diferentes condições tais como: várias concentrações de monômero e diversas taxas e doses de radiação. Estes copolímeros, PEBD-e-PHEMA, apresentaram graus de enxertia que variaram de 2 a 50% de acordo com as condições impostas.

2.2. Caracterização do copolímero de enxerto

2.2.1. Espectroscopia em infravermelho

Após a copolimerização foram observadas as configurações estruturais do PEBD enxertado por espectroscopia no infravermelho (FTIR). No perfil espectroscópico estavam presentes bandas nas regiões de 3400cm^{-1} e 1730cm^{-1} , atribuídas, respectivamente, aos grupos -OH (hidroxila) e C=O (carbonila) do homopolímero enxertado PHEMA como visto na Fig. 1.

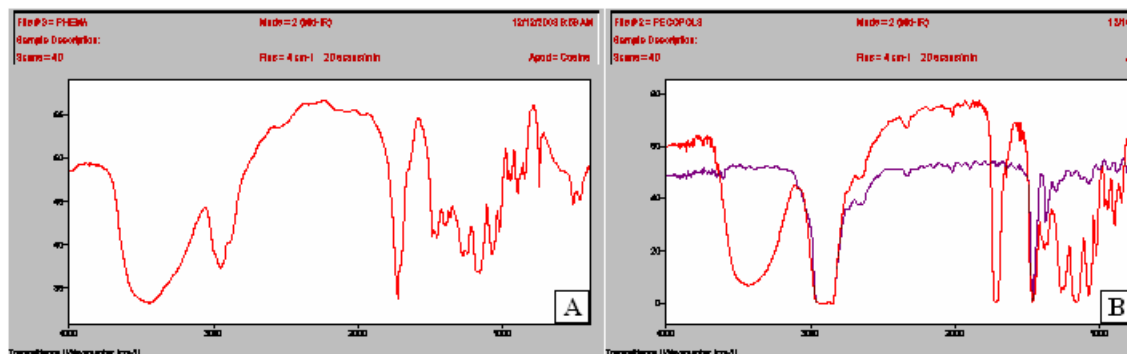


Figura 1. Espectro de infravermelho (FTIR) sendo a foto A análise do PHEMA e a foto B, do filme PEBD não modificado e do copolímero de enxerto PEBD-e-PHEMA com 32% de enxertia

2.2.2. Microscopia eletrônica de varredura

As mudanças superficiais nos copolímeros foram visualizadas por MEV. As micrografias do PEBD mostraram uma superfície lisa enquanto que os copolímeros com níveis aumentados de enxertia apresentaram superfícies rugosas, devido à presença crescente de PHEMA, Fig. 2.

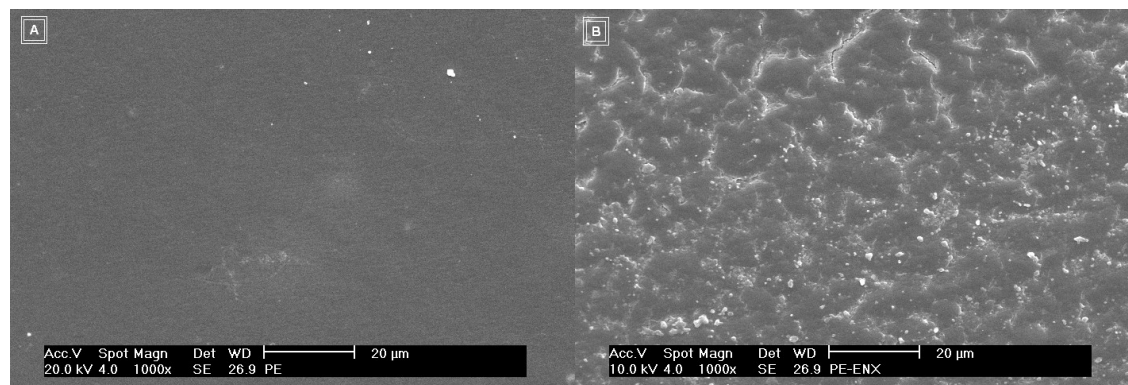


Figura 2. Micrografias em MEV com aumento de 1000x. Foto A: PEBD e foto B: PEBD-e-PHEMA

2.2.3. Hidrofilicidade

Neste ensaio o conteúdo de água no hidrogel em equilíbrio foi determinado gravimetricamente, como visto na Tab. 1. As amostras de PEBD-e-PHEMA, previamente pesadas, foram deixadas imersas em água destilada durante 24 horas à temperatura ambiente. Após esse período foram secas e pesadas. A diferença dos pesos final e inicial determinou a hidrofilicidade das superfícies em estudo conforme a equação 1.

$$S (\%) = \frac{(W - W_s)}{W_s} \times 100$$

1

Onde W_s é o peso inicial do polímero e W é o peso do polímero intumescido.

Com a enxertia houve mudanças significativas nas propriedades físico-químicas do polímero PEBD. Neste teste foi verificado o aumento da sorção de água relacionado com o aumento da enxertia. O aumento da hidrofilicidade está baseado na presença do polímero PHEMA no filme de PEBD.

Tabela 1. Hidrofilicidade das amostras de PEBD-e-PHEMA analisadas

Amostra	Grau de Enxertia (%)	Hidrofilicidade (%)
<i>PEBD (virgem)</i>	xxx	1,89
<i>Copolímero 1</i>	2	5,80
<i>Copolímero 2</i>	21	3,96
<i>Copolímero 3</i>	25	11,82
<i>Copolímero 4</i>	32	18,38
<i>Copolímero 5</i>	41	27,49

2.2.4. Coeficiente de difusão [4]

Este teste foi realizado tomando-se como base os resultados obtidos no teste de hidrofiliicidade realizado em 5 amostras de copolímeros de PEBD-e-PHEMA com graus de enxertia que variaram de 2 a 41% após 1 hora de ensaio. A 25°C foram obtidos níveis de sorção de água de 5,80 a 27,49%, conforme visto na Tab. 1, enquanto que a 37°C, os resultados variaram de 0,97 a 32,17%.

O coeficiente de difusão (D) da água calculado mostrou que níveis de enxertia superiores a 30% tornaram o copolímero de enxerto mais hidrofóbico.

O coeficiente de difusão da água nos filmes mostrou uma dependência significativa da enxertia e da temperatura. Esta dependência é devido possivelmente a uma transição de fase das cadeias do PHEMA enxertado, ou seja, o incremento na enxertia deve reticular as cadeias de PHEMA o que tornaria a superfície mais hidrofóbica relativamente às de nível de enxertia mais baixo. A dependência de D da temperatura pode ser devido à uma transição de fase (precipitação) das cadeias de PHEMA enxertadas, o que reduziria o coeficiente de difusão de água nos copolímeros de enxerto.

2.3. Teste de citotoxicidade

Este teste avalia a toxicidade que um determinado material pode causar em contato com células em cultura. O método segue a norma internacional ISO10.993-5 e é baseado no procedimento original desenvolvido por Borefreund e col. (1984)[5], para avaliação de agentes citotóxicos em geral, sobre uma monocamada de células. É baseado na avaliação quantitativa da viabilidade celular em exposição a agentes tóxicos, pela incubação com corante vital MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólico) e reagente acoplador de elétrons, PMS (fenazina metassulfato). A quantidade de MTS, marcador de viabilidade celular, absorvido por uma população de células é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura (Cory e col., 1991)[6]

O potencial citotóxico dos materiais avaliados é expresso pelo índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$). Este índice corresponde à concentração do extrato do material analisado capaz de inibir 50% do crescimento celular. Como controle negativo utilizou-se o polietileno de alta densidade (PEAD) e como controle positivo uma solução de fenol a 0,2%.

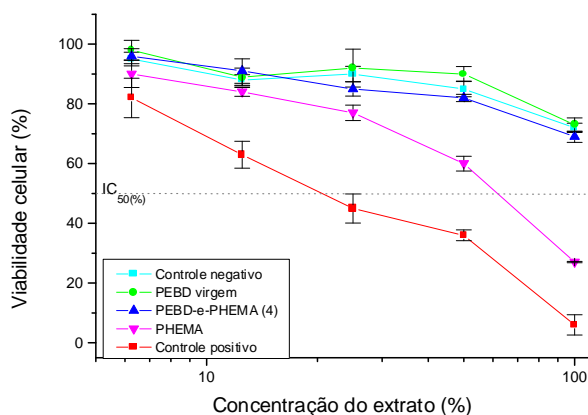


Figura 3. Curvas de citotoxicidade do polímero virgem, copolímero PEBD-e-PHEMA e do PHEMA.

Os copolímeros de enxerto (PEBD-e-PHEMA) foram avaliados e pôde-se verificar que os mesmos não apresentam toxicidade podendo ser utilizados como biomaterial.

3. CONCLUSÕES

Pode-se verificar que o grau de enxertia foi influenciado pela concentração do monômero utilizado e condições de radiação. Os altos graus de enxertia de PHEMA na superfície de PEBD-e-PHEMA deverão disponibilizar um grande número de grupamentos que serão responsáveis pelo futuro acoplamento dos componentes protéicos.

O projeto prosseguirá com posterior imobilização da enzima fosfolipase A₂ sobre o copolímero de enxerto, enzima esta proveniente do veneno de cascavel.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

REFERÊNCIAS

1. Witcherle, O.; Lim, D., *Hydrophilic gels for biological use*, Nature, 9, p.117-147, 1960.
2. SAUNDERS, C.B.; DICKSON, L.W.; SINGH, A., *Gamma and electron beam curing of polymers and composites*, Canada, Atomic Energy of Canada Limited, p. 1-6, 1987.
3. GARNETT, J.L.; JANKIEWICZ, S.V.; LEVOT, R.; SANGSTER, D.F., *Insolubilization of biologically active materials with novel radiation graft copolymers*, Radiat. Phys. Chem., 25 (4-6), p. 509-516, 1985.
4. Crank J. *The mathematics of diffusion*. Oxford: Oxford University Press, 1975.
5. Borefreund, E., Puener, J.A. (1984), "A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90)", *J. Tissue Cult. Meth.*, 9 (1), 7-9.
6. Cory, A.H. et al. (1991) Use of na aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Comm.*, 3, 207-212.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.