

OBTENÇÃO DE PEBD HEMOCOMPATÍVEL PELA IMOBILIZAÇÃO DA FOSFOLIPASE A2

Solange G. Lorenzetti¹, Maria Aparecida P. Camillo¹, Alvaro A. A. Queiroz², Olga Z. Higa¹
¹Centro de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária, CEP: 05508-000, SP, Brasil
²Escola Federal de Engenharia de Itajuba, MG, Brasil
 E-mail: syllorenz@ipen.br

Resumo. Moléculas biologicamente ativas como enzimas tem sido empregadas para tornarem alguns polímeros sintéticos biocompatíveis. A fosfolipase A2 obtida do veneno de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) foi imobilizada sobre a superfície do polietileno de baixa densidade (PEBD) para comprovar sua atividade anticoagulante. Inicialmente o monômero hidrofílico metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) foi convertido sobre uma membrana de PEBD por meio da irradiação simultânea em fonte de ⁶⁰Co para produzir o copolímero P(EBD)-c-PHEMA. O copolímero foi submetido a hidrólise para possibilitar a imobilização da enzima fosfolipase A2. A ligação química da enzima nos grupos carboxílicos do copolímero hidrolisado foi efetuada por derivado de carbodiimida. A hemocompatibilidade da superfície do P(EBD) não convertido, convertido e imobilizado foi analisada "in vitro" pelo teste de adesão de plaquetas depois de contato com sangue total. As micrografias no MEV mostraram uma redução das propriedades trombogênicas do P(EBD) após a conversão com PHEMA e após a imobilização da enzima fosfolipase A2.

Palavras-chave: polietileno, fosfolipase A2, anticoagulante, hemocompatibilidade

1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais tem sido responsáveis pelo avanço da área biomédica e biotecnológica. Um dos exemplos mais promissores de biomateriais são os polímeros os quais podem ser empregados em várias aplicações médicas tais como: próteses, suturas biodegradáveis, sistemas de liberação controlada de fármacos, cateteres implantáveis e órgãos para transplante como a pele artificial. Essa ampla utilização dos polímeros pode ser explicada pelas propriedades físico-químicas que permitem e garantem o sucesso dessa aplicação. O biomaterial polimérico à base do monômero hidrofílico HEMA foi o primeiro hidrogel estudado por Witcherle e cols em 1960 (Witcherle e Lim, 1960), os quais constataram uma biocompatibilidade quando este era aplicado em tecido biológico. Além disso, de acordo com outros pesquisadores foi provado a não trombogenicidade deste polímero aplicado em vários copolímeros.

Neste trabalho houve a síntese de um copolímero de enxerto utilizando o polietileno de baixa densidade (PEBD) e o monômero HEMA. A conversão foi promovida por irradiação simultânea com fonte de ⁶⁰Co. A síntese ou aprimoramento de polímeros utilizando a radiação ionizante apresenta vantagens sobre a metodologia convencional por estar envolvido com a formação de radicais livres, não tendo a necessidade de aquecimento da reação e da adição e posterior remoção de catalisadores.

A utilização de moléculas biologicamente ativas na obtenção de materiais antitrombogênicos tem sido bastante pesquisada (Queiroz et al., 1997; Shalaby et al., 1984). Moléculas anticoagulantes como heparina e prostaglandina, que tem atividade anticoagulante, e urroquinase, com a propriedade de dissolver trombos (atividade fibrinolítica), podem ser combinadas com polímeros sintéticos pela simples adsorção ou por ligação covalente ou iônica.

11051

A fosfolipase A2, obtida do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel), é conhecida por apresentar atividade hipotensora e anticoagulante. O propósito deste trabalho foi testar a sua ação antitrombogênica quando imobilizada em uma superfície polimérica com a finalidade de obter-se uma superfície hemocompatível.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Enxertia

As amostras lavadas e secas de PEBD foram pesadas e colocadas em ampolas de vidro contendo o monômero HEMA (30%) diluído em solução de etanol (10% v.v). As ampolas foram desgaseificadas em linha de alto vácuo de 3 a 4 vezes pela técnica de congelamento e descongelamento alternados. Em seguida as ampolas foram irradiadas em fonte de ^{60}Co . As amostras foram irradiadas a taxas de dose entre 0,030 a 0,061 kGy/h e dose de irradiação de 2 kGy. Depois de lavadas e secas a pressão reduzida até peso constante, o rendimento da enxertia foi calculado através da Eq. (1).

$$\text{Grau de enxertia (\%)} = \frac{(W_e - W_i) 100}{W_i} \quad (1)$$

Onde W_i e W_e representam, respectivamente, os pesos do filme inicial e do copolímero de enxerto.

2.2 Imobilização da fosfolipase A2

A enzima fosfolipase A2 foi obtida por meio da purificação do veneno de cascavel segundo o método descrito por Aird e col. (Aird et al., 1990).

O copolímero de enxerto foi ativado para a posterior imobilização da enzima e passou por um processo químico descrito por Beddows e Guthrie (Beddows e Guthrie, 1951), pelo qual as ramificações de HEMA da superfície são transformadas em poliacido-metacrílico). Assim, a amostra do copolímero foi refluxada com NaOH 1M por três horas, lavada com água destilada, HCl 1M e água destilada e secas sob pressão reduzida a temperatura ambiente. Após o preparo da matriz polimérica fez-se a imobilização da fosfolipase A2 segundo método de Silva e col. (Silva et al., 1990). Para o acoplamento da enzima, o copolímero foi cortado em amostras circulares de 8mm e procedeu-se a ativação dos grupos carboxílicos do copolímero com 1-ciclohexa-(3-2-merfolinoetil) carbodi-imida meto-p-tolueno sulfonato (CMC). Em um frasco adicionou-se 10ml de tampão fosfato pH 7,4 contendo 40mg de CMC e 40mg da enzima a 100mg do copolímero, o qual foi mantido sob agitação mecânica por 18 horas a 4°C. Por fim, o copolímero foi lavado, seco sob pressão reduzida e acondicionado em freezer. A concentração enzimática imobilizada foi avaliada pelo doseamento proteico por método de Lowry (Silva et al., 1990).

2.3 Teste de hemocompatibilidade

Teste de adesão plaquetária. Para este teste foram colhidos 10ml de sangue humano em meio de anticoagulante ACD. As amostras do copolímero foram aderidas em lamínulas de vidro e colocadas em placa de Petri a qual foi colocada em outra placa maior contendo água

imersas em sangue durante 3 minutos a 37°C e, logo após lavadas com solução salina. As amostras foram imersas em glutaraldeído 2,5% por 10 minutos em temperatura ambiente e desidratadas em etanol nas concentrações 50, 75 e 95% por respectivamente 5, 10 e 15 minutos. O resultado deste teste foi analisado em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As ampolas com amostras de PEBD, com 30% de HEMA, foram submetidas em duplicata às doses de irradiação conforme descrito na Tabela I.

Tabela I. Condições e graus de enxertia obtidos no preparo do copolímero PEBD-e-PHEMA

Amostra	% HEMA	Taxa de dose (kGy/h)	Dose (kGy)	Grau de enxertia (%)
A	30	0,061	2	32
B	30	0,061	2	49
C	30	0,041	2	40
D	30	0,041	2	34
E	30	0,030	2	29
F	30	0,030	2	32

Os copolímeros de enxerto foram obtidos por irradiação simultânea em fonte de ^{60}Co , após a exposição da superfície de PEBD a raios gama na presença do monômero HEMA e solvente. O rendimento da enxertia variou de 29 a 49%, tendo sido bastante efetiva a irradiação a taxa de dose de 0,061 kGy/h (Tabela I).

Para a imobilização da enzima escolheu-se um copolímero com 32% de enxertia. A quantidade imobilizada calculada pelo método de Lowry foi de 57,69ng/mm² de amostra; quantidade esta considerada não tóxica em testes de citotoxicidade.

A adesão de plaquetas é um teste *in vitro* utilizado para avaliar a trombogenicidade das superfícies dos biomateriais após contato com o sangue. Esta análise efetuada com a visualização das superfícies no MEV, mostrou inicialmente a propriedade trombogênica do polímero PEBD (Fig. 10A). Na micrografia aparece podendo-se notar a presença de hemácias e algumas plaquetas ativadas pela superfície sintética, sinais claros do fenômeno de ativação da cascata de coagulação sanguínea tipo fator XII.

A Figura 11B refere-se a superfície enxertada (PEBD-e-PHEMA) que se mostra rugosa e na qual pode-se notar a presença de algumas plaquetas ativadas. A ausência de hemácias relativamente ao polímero não modificado pode ser devido a hidrofilicidade do copolímero de enxerto.

imersas em sangue durante 3 minutos a 37°C e, logo após lavadas com solução salina. As amostras foram imersas em glutaraldeído 2,5% por 10 minutos em temperatura ambiente e desidratadas em etanol nas concentrações 50, 75 e 95% por respectivamente 5, 10 e 15 minutos. O resultado deste teste foi analisado em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As ampolas com amostras de PEBD, com 30% de HEMA, foram submetidas em duplicata as doses de irradiação conforme descrito na Tabela I.

Tabela I. Condições e graus de enxertia obtidos no preparo do copolímero PEBD-e-PHEMA

Amostra	% HEMA	Taxa de dose (kGy/h)	Dose (kGy)	Grau de enxertia (%)
A	30	0,061	2	32
B	30	0,061	2	49
C	30	0,041	2	40
D	30	0,041	2	34
E	30	0,030	2	29
F	30	0,030	2	32

Os copolímeros de enxerto foram obtidos por irradiação simultânea em fonte de ^{60}Co , após a exposição da superfície de PEBD a raios gama na presença do monômero HEMA e solvente. O rendimento da enxertia variou de 29 a 49%, tendo sido bastante efetiva a irradiação a taxa de dose de 0,061 kGy/h (Tabela I).

Para a imobilização da enzima escolheu-se um copolímero com 32% de enxertia. A quantidade imobilizada calculada pelo método de Lowry foi de 57,60ng/mm² de amostra, quantidade esta considerada não tóxica em testes de citotoxicidade.

A adesão de plaquetas e um teste *in vitro* utilizado para avaliar a trombogenicidade das superfícies dos biomateriais após contato com o sangue. Esta análise efetuada com a visualização das superfícies no MEV, mostrou inicialmente a propriedade trombogênica do polímero PEBD (Fig. 1A). Na micrografia aparece pode-se notar a presença de hemácias e algumas plaquetas ativadas pela superfície sintética, sinais claros do fenômeno de ativação da cascata de coagulação sanguínea tipo fator XII.

A Figura 1(B) refere-se a superfície enxertada (PEBD-e-PHEMA) que se mostra rugosa e na qual pode-se notar a presença de algumas plaquetas ativadas. A ausência de hemácias relativamente ao polímero não modificado pode ser devido a hidrofobicidade do copolímero de enxerto.

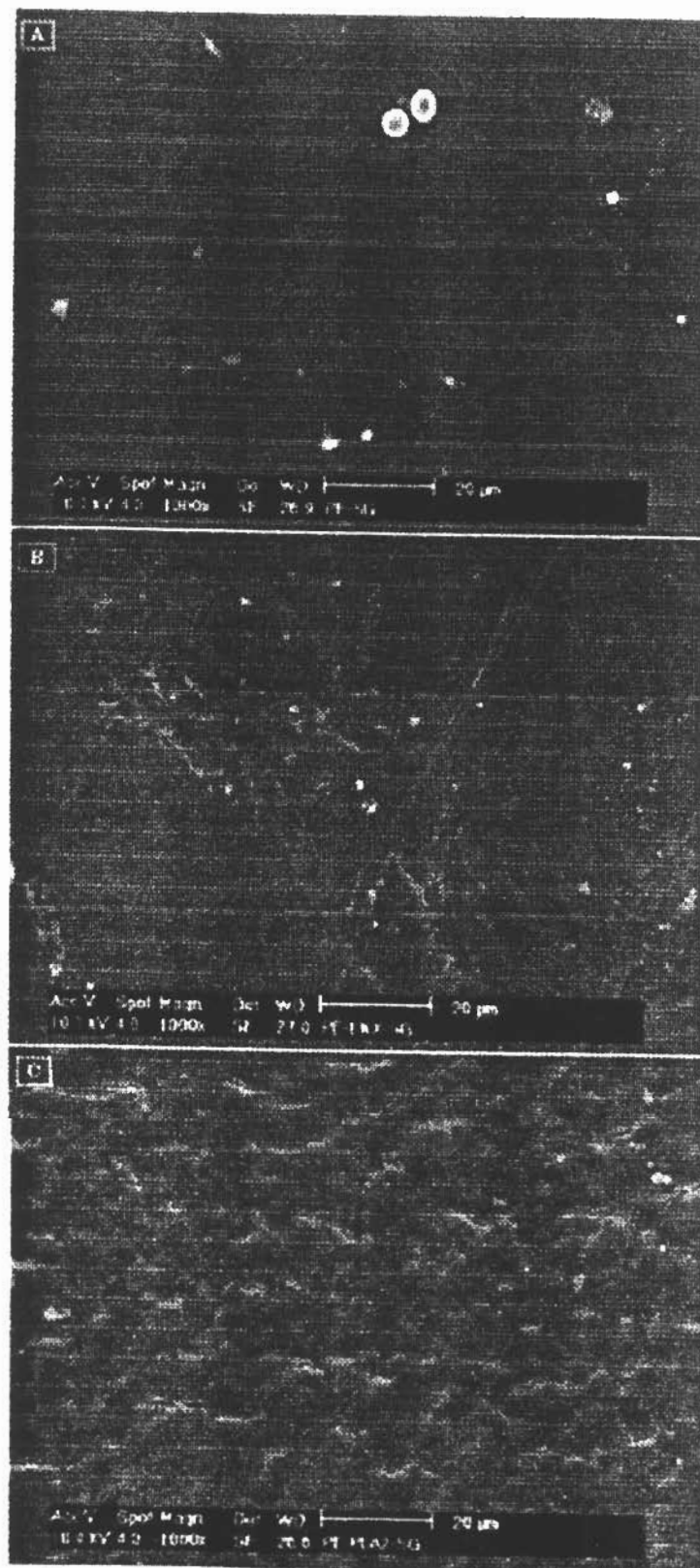


Figura 1. Micrografias no MEV (aumento de 1000x) das superfícies do PEBD, após teste de adesão de plaquetas. A: filme de PEBD virgem, B: filme de PEBD-e-PHEMA e C: filme de PEBD-e-PHEMA imobilizado com fosfolipase A2.