INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**OBTENÇÃO DOS SISTEMAS BIOCONJUGADOS
CROTOXINA/PEBD-g-PHEMA E CROTOXINA/PCL**

SOLANGE GUBBELINI LORENZETTI

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

Orientadora:

Dra. Olga Zazuco Higa

SÃO PAULO

2006

*“Dedico este trabalho aos meus queridos pais
Frederico A. Lorenzetti e **Marta G. Lorenzetti**
e minha irmã **Viviane G. Lorenzetti** pelo eterno
incentivo, paciência, amor e carinho; e a **todos**
meus amigos.”*

Às vezes...

*“Deus costuma usar a solidão
para nos ensinar sobre a convivência.
Às vezes, usa a raiva para que possamos
compreender o infinito valor da paz.
Outras vezes usa o tédio, quando quer nos mostrar
a importância da aventura e do abandono.
Deus costuma usar o silêncio para nos ensinar
sobre a responsabilidade do que dizemos.
Às vezes usa o cansaço, para que possamos
compreender o valor do despertar.
Outras vezes usa a doença, quando quer
nos mostrar a importância da saúde.
Deus costuma usar o fogo, para nos ensinar
a andar sobre a água.
Às vezes, usa a terra, para que possamos
compreender o valor do ar.
Outras vezes usa a morte, quando quer
nos mostrar a importância da vida”.*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À Dra Olga Zazuco Higa pela orientação, confiança e incentivo.

À Dra Maria Aparecida Pires Camillo pelo auxílio nos ensaios relacionados à crotoxina.

Ao Dr Álvaro A.A. de Queiroz pelos esclarecimentos e idéias na parte polimérica e de microesferas do trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN).

À Dra. Mônica Beatriz Mathor pela ajuda na cirurgia para colocação dos dispositivos nos animais de laboratório, por ter cedido duas linhagens celular e pelas dicas ao trabalho, no seminário de área e na defesa.

À Dra. Maria Tereza C. P. Ribela pela marcação da crotoxina com I-125, sugestões no seminário de área e pela amizade.

À Dra. Lígia Ely Ferreira Dias por ter cedido uma linhagem celular e pelas dicas relacionadas a células.

Ao Dr. Patrick J. Spencer pelo incentivo, amizade e ajuda em vários assuntos.

À Dra. Maisa Splendore Della Casa (Instituto Butantan) pelas dicas, paciência, incentivo e amizade prestimosa.

À Neide (Biotério-Ipen) pela ajuda e ensinamento na manipulação dos camundongos C3H.

À Dra. Marina J. Maisato pelas sugestões na escrita desse trabalho, na defesa, e pelo apoio.

Aos amigos do Ipen, representados por: Paula Pinheiro Paganini, Thatiana Diegues, Claudia Tomyama, Eduardo de Moura, Thais Cristina Prado (ex-Ipen), Luciana Wada (ex-Ipen), Dr. José Oscar Vega Bustillos, Dra. Mitiko (CQMA), Milena, Liege, Lígia, Márcia (ex-Ipen), MSc. Rosa Maria Chura Chambi, Flavia Andrade (ex-Ipen), Kátia Noriko Suzuki, Danielle Borim Rodrigues, MSc. Janaína Baptista, MSc. Murilo Casare, MSc. José Alberto Alves, Lucélia A. Campos, Juliana Luly, Camila, Willian, Priscila Caproni, Felipe, André, Natália Malavasi Vallejo, MSc. Miriam, Claudinha Cecci, Maria de Fátima, Dra. Andréa, Luis Otávio Komiskas (Tatu),

Renata Damiani, Flavinha Valgôde, Zé Maria, Dr. Carlos, Daniele, Thiago, Samanta Etel Borborema, Betina Beissel (ex-Ipen), Gilberto da Silva Jaquier, MSc. Simone Alberigui (MM), MSc. Elaine Bueno, Fábio (CTR), MSc. Maria (CTR), Alessandra Fuga (Radioquímica), Adilson Abolafio, Vladimir (CTR), Prof. Dr. Valdir (Ciclotron), Dr. Marco Antonio (Radioquímica), etc, pelas inúmeras ajudas, apoio, carinho e principalmente pela amizade.

Às amigas Arine Pellegrino (Veterinária-USP), Alessandra Commodoro (ICB), Vanessa Guthierrez (Instituto Butantan) e por outras inúmeras pessoas que passaram na minha vida e me ajudaram muito graças à amizade, apoio e carinho sempre presentes.

Aos professores de graduação de Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo (1999-2002).

Aos professores de pós-graduação do Instituto Butantan: Dra. Ana Moura, Dra. Mônica; da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP: Dra. Elisabeth; e do Ipen: Dra. Eliana Rigo, Dr. João Alberto Osso Jr., Dr. Alberto Todo, Dr. Terremoto, Dr. Ricardo Leal, Dr. Afonso Rodrigues de Aquino, Dra. Martha Marques Ferreira Vieira, Dra. Elaine Bortoletti de Araujo, Dra. Nanci do Nascimento, Dr. Patrick J. Spencer, Dr. José Roberto Rogero.

À Pós-graduação do IPEN: Luciene, Walter, Ilze, Vera, José Paulo, Fernando, Danielle.

Ao engenheiro Carlos Gaia da Silveira e à Engenheira Elizabeth S. Ribeiro Somessari (ipen) pelas irradiações efetuadas.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

À todos os demais funcionários do ipen.

À todos que, direta ou indiretamente, tornaram possível a conclusão deste trabalho.

PRINCIPAIS SÍMBOLOS

PEBD = polietileno de baixa densidade.

HEMA = metacrilato de 2-hidroxietila.

g = símbolo de enxertia.

PHEMA = poli(metacrilato de 2-hidroxietila).

PEBD-g-PHEMA = polietileno de baixa densidade enxertado com poli(metacrilato de 2-hidroxietila) = copolímero de enxerto desenvolvido nesse trabalho.

PCL = poli(épsilon-caprolactona).

ctx = crotoxina.

FLA₂ = fosfolipase A₂.

PEBD-g-PHEMA-i-ctx = crotoxina/PEBD-g-PHEMA = copolímero de enxerto imobilizado com crotoxina.

crotoxina/PCL = microesferas de poli(épsilon-caprolactona) encapsuladas com crotoxina.

pI = ponto isoelétrico.

i.m. = via intramuscular.

I-125 = ¹²⁵I = Iodo com massa molecular 125 (radioativo).

⁶⁰Co = Cobalto com massa molar 60.

IC_{50%} = Índice de citotoxicidade.

DL₅₀ = Dose letal média.

EGPA = Eletroforese em gel de poliacrilamida.

MEV = Microscopia eletrônica de varredura.

rpm = rotação por minuto.

g = rotação em relação ao grau de inclinação.

OBTENÇÃO DOS SISTEMAS BIOCONJUGADOS CROTOXINA/PEBD-g-PHEMA E CROTOXINA/PCL

Solange Gubbelini Lorenzetti

RESUMO

A finalidade deste trabalho de pesquisa foi a obtenção de matrizes poliméricas imobilizadas com a crotoxina, proveniente do veneno bruto de cascavel. Foram obtidas duas matrizes: (a) copolímero de enxerto para a imobilização da crotoxina, (b) micro-esferas de épisolon-policaprolactona (PCL) com crotoxina encapsulada.

A crotoxina, proveniente da serpente *Crotalus durissus terrificus* (cascavel da América do Sul), após a sua purificação, foi caracterizada bioquímica e biologicamente. O resultado da avaliação da dose letal média (DL_{50}) da toxina foi de 0,09mg/Kg de animal. O teste de citotoxicidade apresentou resultados semelhantes entre as células tumorais e os respectivos controles das células normais.

Copolímeros de polietileno de baixa densidade enxertado com poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (PEBD-g-PHEMA) foram utilizados como suportes para a imobilização química da crotoxina purificada. Para tal utilizou-se o polietileno de baixa densidade (PEBD) juntamente com o monômero hidrofílico metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA). Os copolímeros foram obtidos via radiação ionizante, em fonte de cobalto 60 (^{60}Co), e apresentaram graus de enxertia que variaram de 2 a 50%. Na caracterização por espectroscopia em infravermelho (ATR) observou-se os grupos funcionais principais do copolímero, em relação ao polímero base e PHEMA formado na irradiação. No perfil espectroscópico do copolímero estavam presentes bandas atribuídas aos grupos C=O (carbonila) e -OH (hidroxil), provenientes do homopolímero PHEMA. As micrografias do MEV do PEBD apresentaram superfícies lisas, enquanto que PEBD-g-PHEMA com alto grau de enxertia (32 %) revelou superfície rugosa devido à presença de PHEMA. O copolímero foi caracterizado fisicamente com o teste de hidrofiliicidade, no qual o conteúdo de água foi determinado gravimetricamente. Com o coeficiente de difusão obtido pôde-se notar

que a partir de 30 % de enxertia o copolímero torna-se menos hidrofílico, devido ao aumento das ligações cruzadas entre as cadeias de PHEMA. O teste de citotoxicidade revelou que PEBD-g-PHEMA pode ser utilizado como biomaterial. O copolímero imobilizado, crotoxina encapsulada e a crotoxina livre foram avaliados “in vivo” em camundongos da linhagem C3H. Durante 20 dias foram observados alterações de peso e comportamento, além das funções motoras. Os resultados demonstraram que o grupo injetado com crotoxina teve uma perda de peso maior do que os demais grupos.

Concluindo, a crotoxina imobilizada nos copolímeros poderia ser utilizada pela sua ação catalítica fosfolipásica, na hidrólise dos fosfolipídeos presente nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) do soro humano. Por outro lado, a crotoxina encapsulada nas micro-esferas de poli(épsilon-caprolactona) (PCL) poderia ser utilizada como sistema de liberação dirigida (local) da crotoxina, destinada a terapia tumoral.

OBTAINMENT OF CROTOXIN/PHEMA-G-LDPE AND CROTOXIN/PCL SYSTEMS

Solange Gubbelini Lorenzetti

ABSTRACT

The aim of the work was the obtainment of polymeric matrices immobilized with crotoxin purified from crude venom of rattle snake. A matrix was processed by gamma irradiation by the grafting of a hydrogel onto a polymeric film which resulted in a copolymer for the chemical immobilization of crotoxin. The second matrix was attained by the entrapment of crotoxin in microspheres of epsilon-polycaprolactone.

After the purification, the crotoxin proceeding from the snake *Crotalus durissus terrificus* was evaluated biochemical and biologically. The letal dose (LD_{50%}) of the toxin was 0.09/kg animal. The test of cytotoxicity not revealed any significant difference between the tumoral cells and the respective normal control cells in culture.

Grafting copolymers were used as scaffold for the chemical immobilization of the purified crotoxin. For this purpose the low density polyethylene (LDPE) and the hydrophilic monomer 2-hydroxy-ethyl-methacrylate (HEMA) were copolymerized in a ⁶⁰Co source. The copolymers (LDPE-g-PHEMA) showed grafting levels in the range of 2 and 50 %. In the infrared spectroscopy analysis (FTIR-ATR) it was observed in the copolymer, carbonyl groups (C=O) and hydroxyl groups –OH due to the grafting of PHEMA. The MEV micrographies showed a smooth surface for the virgin LDPE and a rough surface for the LDPE-g-PHEMA, owing to the presence of grafted PHEMA. The hydrophilicity was observed by the determination of water content in the copolymer after immersion in water. By the diffusion coefficient it was noted that from 30 % grafting degree, the copolymers become less hydrophilic due to the crosslinking increase among the chains in PHEMA. The biocompatibility of the LDPE-g-PHEMA was proved by the cytotoxicity test.

At the end, the immobilized copolymer, the entrapped crotoxin and the free crotoxin was tested “in vivo”. During 20 days, C3H strain mice were observed in

their weight, behavior and motor changes. The results demonstrated that the group injected with crotoxin had visible loss of weight higher than the other groups.

It was concluded that, potentially the immobilized crotoxin could be used by its catalytic phospholipase action, possibly for the hydrolysis of phospholipids present in human serum low density lipoproteins (LDL). By the other side, the entrapped crotoxin in the microspheres of epsilon-polycaprolactone could be employed in the managed drug delivered system for the tumoral therapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 Crotoxina	5
3.2 Imobilização de biomoléculas.....	7
3.3 Sistema de liberação de fármacos	8
3.4 Polímeros como biomateriais	9
3.5 Copolímeros de enxerto obtidos via radiação ionizante	11
3.6 Caracterização dos biomateriais	12
3.7 Avaliação biológica de biomateriais.....	14
4. METODOLOGIA.....	16
4.1 Purificação da crotoxina	17
4.2 Caracterização da crotoxina isolada.....	18
4.3 Ensaio de atividade biológica	19
4.3.1 Atividade enzimática	19
4.3.2 Citotoxicidade.....	20
4.3.3 Dose letal média (DL_{50}).....	21
4.4 Preparação do copolímero de enxerto	22
4.5 Caracterização do copolímero.....	24
4.6 Marcação da crotoxina com o radioisótopo ^{125}I	26
4.7 Avaliação da eficiência de imobilização química.....	26
4.8 Avaliação biológica do biomaterial	28
4.9 Ensaio de atividade biológica (citotoxicidade do biomaterial)	29
4.10 Obtenção das microesferas de policaprolactona contendo crotoxina	29
4.11 Eficiência do encapsulamento da crotoxina	30
4.12 Análise morfológica das microesferas e distribuição de tamanhos	30
4.13 Ensaio de atividade biológica	31
4.13.1 Administração prolongada	31
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÃO.....	66
ANEXOS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1 INTRODUÇÃO

Atualmente os venenos têm sido reconhecidos como uma importante fonte de compostos bioativos e contribuído para o desenvolvimento de novos medicamentos ou reagentes de diagnóstico^[1]. Este trabalho foi desenvolvido com a crotoxina, uma proteína do veneno da *Crotalus durissus terrificus*. Esta serpente (figura 1) é popularmente conhecida como cascavel da América do Sul e foi descrita por Laurenti em 1768^[2].

Figura 1. *Crotalus durissus terrificus* (cascavel da América do Sul)

A crotoxina foi descrita em 1938 por Slotta e Fraenkel-Conrat como a principal toxina deste veneno^[3]. Dezoito anos mais tarde, Fraenkel-Conrat e Singer (1956) verificaram sua composição dimérica^[4]. A crotoxina é responsável por diversos efeitos biológicos, entretanto o de interesse neste trabalho é a ação tóxica “in vitro”, conforme demonstrado em diversas linhagens celulares tumorais de origem murina e humana^[5-6]. Segundo Rudd e col.(1994) o efeito citotóxico é seletivo pois após 8 horas de incubação com 10 µg/mL de crotoxina houve 100 % de mortalidade para células Hs578T (carcinoma de ducto mamário humano) e SK-LU-1 (adenocarcinoma pulmonar) enquanto que 20 % de células 3T3 (fibroblastos) e 45 % de queratinócitos

humanos normais permaneciam viáveis após 72 horas^[6]. Corin e col.(1993) demonstraram que a subunidade básica (ou FLA₂) da crotoxina é a responsável pelo efeito citotóxico nas células de eritroleucemia humana^[5].

Em 2002, Cura e col. realizaram um estudo farmacocinético em pacientes portadores de tumores sólidos refratários à terapia convencional, para determinar a dose tóxica limitante (DLT) e a dose máxima tolerável (DMT). A crotoxina foi administrada i.m. por 30 dias consecutivos com doses entre 0,03 e 0,22 mg/m². Ocorreram os seguintes efeitos colaterais: toxicidade neuromuscular não limitante e reversível evidenciada como diplopia ocasionada por paralisias do músculo ocular externo, durou de 2 a 6 horas; ptose palpebral, e ansiedade com DLT 0,22 mg/m²; miotoxicidade detectada por aumentos passageiros nos níveis de aspartato aminotransferase, creatina quinase e alanina transaminase; e outros sintomas pouco freqüentes. Após 24 horas da injeção 97% da crotoxina já havia sido eliminada^[7].

A alta toxicidade da crotoxina, observada tanto em testes “in vitro” quanto “in vivo”, poderia levar ao desinteresse dessa toxina para o tratamento de câncer. Porém, há formas que podem minimizar a toxicidade e facilitar a aplicação de crotoxina como fármaco anti-tumoral. Por meio dos biomateriais poliméricos pode-se obter um sistema de liberação o qual seria aplicado localmente e, conseqüentemente, não ocasionaria efeitos adversos causados quando administrados sistemicamente. A forma de liberação seria a dirigida e não a controlada.

No centro de biotecnologia do IPEN, um grupo tem se destacado nos estudos em biomateriais poliméricos ocasionando em trabalhos como: suportes poliméricos imobilizados com enzimas que apresentam uso clínico e matrizes poliméricas utilizadas como sistema de liberação controlada de fármaco^[8-9].

Atualmente a ciência dos biomateriais é responsável pela maioria das inovações presentes nas áreas médicas e biotecnológicas. Apesar de seu emprego ter sido mais difundido nos tempos atuais, sinais claros demonstram sua presença em civilizações antigas^[10]. Desde os primeiros usos (aproximadamente 1000 a.C.), fios de ouro eram usados como sutura de tecidos moles para reparos de hérnia^[11]. Olhos, orelhas, dentes, e narizes artificiais foram encontrados em múmias egípcias. Chineses e indianos usaram cêras, colas, e tecidos na reconstrução de perdas ou partes defeituosas do corpo. Romanos, chineses e astecas usaram ouro na

odontologia a mais de 2000 anos atrás. No século XX os plásticos sintéticos tornaram-se disponíveis graças ao surgimento de sua industrialização. Sua facilidade de fabricação promoveu uma ampla utilização, porém, de acordo com os conhecimentos atuais em toxicologia, todos esses trabalhos foram condenados ao fracasso^[11].

Em 1937 houve a introdução do poli(metacrilato de metila) (PMMA) na odontologia. Após a II Guerra Mundial, fragmentos de PMMA foram encontrados nos olhos de aviadores e sugeriu que alguns materiais poderiam provocar somente uma leve reação a corpos estranhos. Em 1958 o tecido usado no pára-quedas, Vinion N, foi transformado, por meio de técnica de enxertia, em prótese vascular denominada de Dacron^[11].

Com o avanço na área dos biomateriais, muitos termos e diversos significados surgiram e com eles certas controvérsias nas aplicações, o que tornou de extrema importância à padronização destes termos. A definição de biomaterial só foi estabelecida após a realização de um simpósio, “Consensus Conference of the European Society for Biomaterials”, na Inglaterra em março de 1986. Assim, biomaterial passou a ser definido como um material não viável usado como dispositivo médico em contato com órgãos ou seus fluidos^[12].

A medicina atual utiliza um amplo número de implantes (suturas, placas ósseas, ligamentos, enxertos vasculares, lentes intraoculares, implantes dentários e outros) e dispositivos médicos (biosensores, marcapasso, corações artificiais, tubos sanguíneos e outros) os quais são amplamente empregados para substituir e/ou recuperar a função de órgãos ou tecidos degenerados ou traumatizados, para auxiliar na cura, melhorar funções, corrigir anormalidades, e conseqüentemente melhorar a qualidade de vida dos pacientes^[10].

Os biomateriais estão presentes na ciência dos materiais. São tidos como materiais os polímeros, cerâmicas (incluindo vidro), metais e compósitos^[11]. Para um material ser considerado biomaterial deve ser avaliado quanto a sua biocompatibilidade, ou seja, deve-se observar se o material é compatível com o meio biológico no qual será inserido, de acordo com a norma internacional ISO10.993^[13].

2 OBJETIVOS

A finalidade deste trabalho de pesquisa foi obter duas matrizes poliméricas imobilizadas com a crotoxina purificada, proveniente do veneno bruto de cascavel.

2.1 Objetivos específicos

- Purificar a crotoxina proveniente do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* (cascavel);
- Fazer a avaliação biológica da crotoxina purificada;
- Obter duas matrizes poliméricas: (a) copolímero de enxerto PEBD-g-PHEMA, proveniente da enxertia do monômero hidrofílico metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) sobre o polietileno de baixa densidade (PEBD) via irradiação gama, para posterior imobilização da crotoxina; (b) micro-esferas de épsilon-policaprolactona (PCL) encapsulada com a crotoxina purificada;
- Imobilizar a crotoxina nas matrizes poliméricas por método químico;
- Fazer a avaliação biológica dos copolímeros e da crotoxina imobilizada nos copolímeros;
- Avaliar o efeito “in vivo” da crotoxina livre e encapsulada em micro-esferas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Crotoxina

A crotoxina é um complexo não-covalente formado por duas subunidades não idênticas: uma que é ácida denominada crotapotina, crotoxina B ou subunidade ácida e a outra que é básica chamada de fosfolipase A₂ (FLA₂), crotoxina A ou simplesmente subunidade básica. As seqüências de aminoácidos da proteína foram feitas por Aird e col, 1986 e 1990^[14-15]. A subunidade básica tem 14.260 Da; 122 aminoácidos e pI 8,74; a ácida 8.900 Da com pI 3,4^[16-18].

A crotoxina apresenta principalmente atividade miotóxica, neurotóxica e coagulante. Representa cerca de 60 % do peso total do veneno bruto seco, é altamente tóxica com DL₅₀ em camundongos próxima a 0,07 mg/kg, via endovenosa. A abundância neste veneno e a relativa facilidade de purificação fizeram da crotoxina uma das toxinas mais estudadas^[16-17].

Em estudos com as subunidades isoladas foi demonstrado que a fosfolipase A₂ possui ação enzimática e toxicidade “in vivo” muito menor do que a crotoxina e, por outro lado, a crotapotina não possui ação tóxica. Ainda não se sabe corretamente qual o seu papel, mas os estudos indicam que a crotapotina atue como “chaperone”, ou seja, ela direciona a ação da crotoxina tornando-a mais seletiva e neurotóxica^[7, 19].

Apesar destes efeitos neurotóxicos causados pela toxina, sua ação citotóxica sobre células tumorais, em baixas doses, motivou alguns pesquisadores a utilizá-las em tratamento clínicos. No entanto, faltavam estudos pré-clínicos e clínicos controlados para ser comprovada sua segurança e eficácia “in vivo”, o que permitiria a licença como medicamento.

Em julho de 1986, na Argentina, ocorreu uma grande divulgação em meios não acadêmicos do tratamento de câncer com extrato de venenos ofídicos^[19]. Isto levou o CONICET (*Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas e Tecnicas*) a

contratar uma pesquisa para verificar este assunto. Os resultados geraram um Informe Especial^[20]. Neste estudo os pesquisadores utilizaram veneno total de *Naja naja siemensis* e o complexo crotoxina purificado a partir do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Foram ensaiados isoladamente e misturados para verificar a possibilidade de ocorrer um efeito sinérgico entre os componentes das amostras. Para os testes utilizaram células normais e tumorais de origem humana e murina; e camundongos transplantados com tumores. Este estudo demonstrou que as duas preparações foram inativas e o CONICET não aprovou utilização da crotoxina isolada ou do veneno bruto de *Naja n. siemensis* como quimioterápicos^[20].

No entanto, o interesse de se utilizar crotoxina como fármaco anti-tumoral não foi encerrado. Em 2002 a toxina foi administrada em pacientes com câncer avançado. Nesta pesquisa, a crotoxina foi aplicada intramuscular por 30 dias consecutivos em 23 pacientes com diferentes tipos de câncer. O resultado revelou inibição no crescimento tumoral primeiramente em carcinoma pulmonar (83%), carcinoma mamário humano (69%) e uma pequena ação sobre leucemia (44%). Os autores sugeriram que a crotoxina possa ter uma especificidade para tumores sólidos. Os efeitos colaterais observados foram decorrentes da neurotoxicidade (diplopia, nistagmus, ptose papebral, miotoxicidade, sialorreia) ou de reação anafilática após algum tempo de tratamento^[7].

A fosfolipase A₂ suscita interesse para uma possível aplicação decorrente de sua atividade lipolítica. Esta enzima hidrolisa a ligação éster de fosfolipídeos e pode catalizar a hidrólise de um largo range de agregados de fosfolipídeos, incluindo micelas, monocamadas e bicamadas. Em particular, a FLA₂ hidrolisa LDL e colesterol presentes no sangue humano, facilitando a remoção destes compostos pelo fígado, mais rapidamente do que os não hidrolisados. Com base nestes resultados uma terapia alternativa, para tratamento de casos graves de altos níveis de ácidos graxos no sangue, têm sido proposta como utilizar a FLA₂ imobilizada para tratamento do sangue com circulação extra-corpórea^[21-22].

3.2 Imobilização de biomoléculas

A imobilização de biomoléculas envolve técnicas de imobilização em suportes sólidos e técnicas de imobilização por inclusão. No primeiro caso, pode-se ter uma imobilização química, por adsorção ou ligação iônica.

A imobilização química compreende reações químicas nos grupos específicos de uma matriz polimérica. Geralmente são grupos –OH ou –COOH que são pré-tratados a fim de ativar estes sítios de maneira que possam formar ligações primárias com as espécies a serem imobilizadas (geralmente via grupos –NH₂ de tais espécies). Hidrogéis enxertados pela radiação ou emulsões de metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) e ácido metacrílico (MAAC) polimerizados pela radiação e seus copolímeros têm sido bastante usados para a subsequente imobilização de biomoléculas^[23].

A imobilização por adsorção emprega um grande número de forças de interação de baixa energia entre o suporte e a proteína: interação de Van der Waals, pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas^[24].

No segundo caso, imobilização por inclusão, as biomoléculas ficam retidas na rede tridimensional de um polímero insolúvel na água ou aprisionado no interior de microesferas delimitadas por uma membrana semipermeável, cujos poros são suficientemente pequenos para permitir a difusão da macromolécula, mas suficientemente grandes para permitir a passagem do substrato e dos produtos da reação, como no caso das enzimas. A inclusão física pode envolver a sorção de uma espécie biológica no polímero já formado, ou ser encapsulado dentro de uma estrutura polimérica via processo de separação de fase ou polimerização de monômero contendo as espécies biológicas^[24].

3.3 Sistema de liberação de fármacos

O termo sistema de liberação de fármacos refere-se à tecnologia utilizada para levar o medicamento a um local determinado do organismo, onde o princípio ativo deve ser liberado e absorvido. A seringa foi o primeiro sistema de liberação

desenvolvido, a qual foi inventada em 1855 e usada para liberar o medicamento por injeção^[25].

O sistema de liberação de fármacos é uma forma farmacêutica que apresenta muitas vantagens frente à via oral, pois o tratamento pode ser interrompido com a sua simples retirada do organismo, a liberação pode ser feita de forma imediata, lenta, prolongada ou controlada, além de facilitar seu uso pelos pacientes^[26].

Apesar do uso freqüente dos termos controlada e prolongada, tanto um pelo outro, o significado é diferente. Liberação prolongada significa a liberação de um princípio ativo a partir de uma forma farmacêutica, ou de um sistema de liberação, durante um período prolongado. Liberação controlada significa um sistema no qual a velocidade da liberação do fármaco é controlada, com maior precisão em comparação com o produto de liberação prolongada. Ou seja, a liberação controlada ocasiona na manutenção dos mesmos níveis de fármaco durante todo o tratamento^[25].

Os sistemas de liberação de fármacos são divididos em dois grandes grupos: liberação controlada e dirigida^[27, 28-31]. A diferença dessas duas categorias encontra-se na relação entre o sítio de liberação e o de ação do fármaco. Sistema de liberação controlada libera o fármaco na circulação sanguínea com velocidade controlada, enquanto que o sistema de liberação dirigida libera o fármaco diretamente ou muito próximo do sítio de ação.

Uma das formas que poderia auxiliar no uso terapêutico da crotoxina seria o de sistema de liberação dirigida, pois o fármaco seria entregue diretamente no local necessário evitando uma distribuição por todo o organismo e, portanto, não ocasionando os efeitos adversos, observados na pesquisa do grupo argentino^[7]

3.4 Polímeros como biomateriais

Os polímeros são os materiais mais amplamente empregados como biomateriais graças a sua resistência ao ataque químico, peso, inúmeras propriedades físico-químicas favoráveis e baixo custo. Podem ser aplicados tanto em locais que requerem força, como prótese de substituição óssea, quanto em

preparações que visam à aquisição de superfícies macias e moldáveis, como sistemas de liberação de fármaco e membranas com infinitas utilizações^[32-33].

Os biomateriais poliméricos podem ser classificados de acordo com sua função em bioinertes, bioativos, reabsorvíveis e biomiméticos. **Bioinerte** é aquele que não induz reação biológica e não sofre degradação (também pode ser chamado de biotolerante), **bioativo** induz resposta no tecido hospedeiro, **reabsorvível** é aquele que sofre degradação e seus produtos são metabolizados pelo organismo do hospedeiro, e **biomimético** imitam, mimetizam função ou estrutura de um tecido ou órgão^[11].

3.4.1 Polietileno

O polímero polietileno (PE) é um polímero sintético e devido seu comportamento mecânico é o termoplástico mais difundido em todos os mercados. Por ter excelente biocompatibilidade e inércia química em meio fisiológico, o polietileno pode ser aplicado em diversas finalidades. Biomateriais poliméricos constituídos de PE podem ser empregados como próteses, condutos biliares, ureter, quadril ou tendões, em cirurgia plástica, suturas, drenagens, cateteres e tubos^[34].

Polietileno pode variar de acordo com sua forma molecular, fixada por ligações químicas. Há três tipos de PE que são: polietileno de alta densidade (PEAD), polietileno de baixa densidade (PEBD) e o polietileno de ultra-alto peso molecular (PEUAPM). PEAD apresenta uma estrutura química linear, portanto é uma estrutura mais densa; enquanto que PEBD possui ramificações que tornam esse polímero com uma cadeia mais aberta^[34-35]. A mais recente inovação em PEBD é o polietileno de baixa densidade linear, PEBDL, que possui em sua estrutura linear um número significativo de ramificações. PEBDL é um copolímero de etileno e 1-buteno^[35-36]. O PEAD está presente em materiais hospitalares, PEBD em cateteres e PEUAPM em próteses ósseas como arcabouço para fixação da cabeça de femur^[11].

A figura 2^[35] apresenta a estrutura química do PEBD. De acordo com a classificação de biomateriais poliméricos, descrita anteriormente, PEBD é considerado bioinerte (biotolerante) por não desencadear nenhum efeito biológico nem ser alterado pelo organismo do hospedeiro.

Figura 2. Estrutura química do polietileno de baixa densidade (PEBD)

3.4.2 Metacrilato de 2-hidroxietila

Metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) é um monômero hidrofílico que pode ser polimerizado em várias circunstâncias, como em baixas temperaturas (-20 °C a +10 °C). Pode ser empregado na preparação de diversos hidrogéis para imobilização de proteínas ou células^[36]. Sua estrutura química pode ser vista na figura 3.

Este monômero por não causar danos no organismo, assim que implantado, é considerado um material bioinerte da mesma forma que o polietileno de baixa densidade.

Figura 3. Obtenção de PHEMA por meio da polimerização de metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA)

Hidrogéis sintéticos preparados com HEMA, por polimerização ou copolimerização usando radicais livres, têm sido amplamente empregados na área médica. Copolímeros compostos de HEMA podem controlar o intumescimento usando outro material hidrofóbico^[37].

3.5 Copolímeros de enxerto obtidos via radiação ionizante

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^[38]. 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^[39].

A enxertia via radiação possui como principais técnicas a preirradiação, peroxidação e irradiação simultânea; a diferença dos métodos descritos anteriormente encontra-se na tabela 1 (anexo 1)^[8]. A técnica de enxertia com raios gama, de monômeros hidrofílicos sobre superfícies de materiais poliméricos, destaca-se dos outros métodos, pois a extensão e a deposição do enxerto, a composição e o conteúdo de água desses copolímeros podem ser variados facilmente^[40].

A idéia de enxertia de monômeros hidrofílicos sobre superfícies hidrofóbicas deve-se aos trabalhos de Wichterle e Lim que constatarem a biocompatibilidade dos polímeros hidrofílicos^[40-41]. A partir dos relatos de Chen e col.^[42], Chapiro e col.^[43] e Hoffman e col.^[44], muitos trabalhos têm sido publicados a respeito da obtenção de copolímeros de enxerto via radiação ionizante e alguns biomateriais poliméricos com propriedade hemocompatível foram sintetizados pela enxertia de monômeros hidrofílicos sobre polímeros comerciais através de irradiação^[45-46].

No IPEN, Higa^[47] e De Queiroz e col.^[48-51] utilizaram extensivamente a radiação ionizante na modificação de superfícies poliméricas e preparação de matrizes poliméricas, para a imobilização de enzimas.

3.6 Caracterização dos biomateriais

Para obter características físico-químicas dos biomateriais poliméricos há várias técnicas que podem ser empregadas. Neste trabalho foram utilizadas a espectroscopia em infravermelho, a microscopia eletrônica de varredura e o teste de hidrofiliabilidade.

3.6.1 Espectroscopia em infravermelho

A espectroscopia em infravermelho tem se tornado uma ferramenta indispensável para a determinação de informação estrutural. Trata-se de uma técnica qualitativa.

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) permite a identificação de estruturas que foram inseridas na superfície e no interior da matriz polimérica pela copolimerização, confirmando assim a sua modificação. Isto se dá mediante a comparação dos espectros da matriz polimérica antes e depois da enxertia. O acessório de Transmissão de Reflectância Atenuada (ATR) permite identificar apenas os grupos funcionais presentes na superfície polimérica. Há vários trabalhos que utilizaram a espectroscopia para análise de copolímeros de enxerto, dentre eles os de Hisue e col. (1992 e 1994) e Lee e col. (1996)^[52-54].

A região de infravermelho é a que consiste em energias radiantes de comprimento de onda ligeiramente alto, se comparado com a luz visível. O estudo da energia, em infravermelho, e de sua interação com a matéria consta de um amplo campo. A unidade de comprimento de onda (λ) é apresentada em angstrom (Å), micrometros (μm) e em centímetros (cm). A definição do comprimento de onda é a distância entre os picos de onda. O espectro começa a ser formado assim que a temperatura da substância analisada é aumentada, o que desencadeia a emissão da energia radiante. A quantidade de energia emitida forma a curva contendo o comprimento de onda pela transmitância^[55].

3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura

A caracterização morfológica pode ser realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual é utilizada para o estudo topográfico superficial de materiais sólidos.

O funcionamento do microscópio eletrônico se baseia nas propriedades ondulatórias de elétron, isto é, faz uso do elétron como onda. A capacidade de resolução dos microscópios ópticos é limitada pelos efeitos da difração da luz, que é fenômeno pelo qual a luz é desviada quando encontra obstáculos, presentes na superfície do material analisado^[55]. As amostras são recobertas com uma camada fina de ouro de aproximadamente 15 nm. O ouro sofre desprendimento de elétrons os quais são lançados no detector, consequentemente obtém-se a estrutura superficial da amostra analisada. Sendo que em locais que apresentam elevações, os dados são obtidos mais rapidamente que em superfícies lisas, dessa forma é possível analisar a estrutura e provar a sua modificação superficial^[56].

Ao se examinarem objetos de tamanhos iguais ou menores que o comprimento de onda da luz visível, compreendido entre 0,4 e 0,7 μm , a difração da luz ao redor do objeto torna a imagem borrada ou não permite a formação de imagem alguma. O microscópio eletrônico de varredura supera essa dificuldade, pois os comprimentos de onda, associados a elétrons, são muito menores que os da luz visível utilizados em microscópios ópticos^[55].

3.6.3 Teste de hidrofiliabilidade

No teste de hidrofiliabilidade é avaliado o grau de afinidade do material polimérico pela molécula de água. A hidrofiliabilidade pode ser caracterizada principalmente por dois testes: medidas de ângulo de contato e de sorção de água, que evidenciam as alterações na estrutura polimérica causadas pela copolimerização induzida pela radiação. A enxertia de monômeros hidrofílicos sobre substrato polimérico desencadeia no aumento da hidrofiliabilidade^[11].

3.7 Avaliação biológica de biomateriais

A avaliação biológica dos biomateriais é realizada por meio de testes que analisam a biocompatibilidade do material. Segundo o Simpósio “Consensus Conference of the European Society for Biomaterials”, o termo **biocompatibilidade** significa a capacidade de um material em desempenhar uma resposta apropriada em um hospedeiro por meio de uma aplicação específica. Antes dessa avaliação, deve-se focar a atenção para a seleção do material a ser utilizado na manufatura do provável dispositivo médico^[13].

A biocompatibilidade é um dos requisitos primordiais de um biomaterial. Dessa forma, o biomaterial não pode ser alterado pelo meio biológico nem ocasionar dano nos tecidos locais. Como exemplo de alterações causadas nos biomateriais pode-se citar a corrosão em metais e cerâmicas, e a degradação de polímeros pelos fluídos corpóreos. Já como efeitos biológicos adversos destacam-se a necrose ou reabsorção pelos tecidos, reações celulares, infecções e casos de hipersensibilidade, toxicidade e carcinogenicidade^[13].

A avaliação biológica deve seguir a ISO10.993, pois esta oferece informações importantes para um planejamento adequado do projeto. Este padrão internacional foi preparado pelo Technical Committee ISO/TC 194, Biological evaluation of medical and dental materials and devices, e é dividida em 12 partes, conforme visto na tabela 2 (anexo 2)^[13].

Dependendo da aplicação do biomaterial deve-se efetuar uma sequência de testes. Para a seleção adequada dos testes iniciais para cada dispositivo e/ou material e seu tempo de contato, pode-se utilizar a tabela 3 (anexo 3) que contém um guia para planejar a avaliação inicial do material. Como exemplo, para um dispositivo usado em contato com sangue emprega-se o teste de hemocompatibilidade, enquanto que para um dispositivo dérmico é importante o teste de sensibilidade^[13]. Entretanto, o primeiro teste a ser efetuado em um biomaterial, independente de sua área de aplicação e o qual deve ser empregado em todas as aplicações médicas, é o teste de citotoxicidade que segue a parte 5 da norma ISO10.993.

3.7.1 Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade avalia a toxicidade de um determinado material em contato com células cultivadas em laboratório, trata-se de um teste “in vitro”. É uma técnica que utiliza cultura celular para verificar a lise das células (morte celular), inibição de crescimento celular e outros efeitos ocasionados pelo biomaterial e/ou seus extratos^[57].

O material que comprova ser citotóxico representa aquele que libera um elemento ou composto químico em quantidade suficiente para a morte celular. A morte celular é causada pela inibição de vias metabólicas. O número de células afetadas indica a dose e potência da substância analisada capazes de matar as células. O conceito de dose liberada refere-se a dose absorvida pelas células. No ensaio deve-se utilizar um controle negativo e um positivo. O controle negativo deve ser um material que não produz resposta citotóxica, enquanto o controle positivo deve ser um material que ocasiona em resposta citotóxica reprodutível; de acordo com a ISO10.993-5^[58].

Há várias categorias de testes de citotoxicidade: teste com extrato do material, onde o extrato analisado fica em contato com uma monocamada ou suspensão celular; teste por contato direto, que coloca o material no centro de uma camada celular cultivada; e teste por contato indireto do material nas células, realizado por difusão em camada de ágar ou sobre um filtro com 0,45 µm de porosidade^[58].

4 METODOLOGIA

Todos os experimentos deste trabalho foram realizados no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Todos os principais reagentes, equipamentos e soluções utilizados estão dispostos no anexo 4.

O procedimento experimental deste trabalho foi organizado em fluxograma para melhor entendimento, como visto na figura 4.

Figura 4. Fluxograma da metodologia empregada no trabalho

4.1 Purificação da crotoxina

A crotoxina utilizada no trabalho foi isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* gentilmente cedido pelo CEVAP (Centro de Estudos de Venenos e de Animais Peçonhentos) da UNESP, Botucatu.

A crotoxina foi isolada por gel filtração e troca iônica baseando-se em Aird e col., 1990^[15]. A primeira etapa da purificação da crotoxina foi feita em gel filtração. O gel Superdex 75 cujo intervalo de fracionamento é de 3.000-70.000 Da para proteínas globulares, foi empacotado em coluna XK 26x100, até a altura de 90 cm, seguindo as recomendações do fabricante, tendo sido em seguida, equilibrado em tampão formiato de amônio 0,1 M, pH 3,0.

Amostras de 100 mg de veneno foram dissolvidas em 1 mL de tampão de corrida e centrifugadas a 10.000 g durante 1 minuto. Os sobrenadantes foram aplicados na coluna, coletados em frações de 1 mL/tubo, em fluxo constante de 0,7 mL/min. A densidade óptica das frações foi determinada em 280 nm pelo detector UV-1 (Pharmacia).

As frações correspondentes a crotoxina foram misturadas e dializadas contra 1 litro de 50 mM Tris-HCl pH 7,8, com mais 2 trocas. Em seguida, foi feita uma nova purificação em coluna de troca aniônica (Pharmacia Mono Q; 1,6x25 cm), em fluxo constante de 1,0 mL/min. Na etapa de entrada da amostra na coluna foram coletadas frações de 3 a 5 mL/tubo e na etapa de eluição, as frações foram de 1 mL/tubo. A eluição foi efetuada em gradiente linear 0-50 % com 50 mM Tris-HCl pH 7,4 com 1 M NaCl. A densidade óptica das frações foi determinada em 280 nm pelo detector UV-1 (Pharmacia).

As frações correspondentes à crotoxina foram reunidas e dializadas contra água destilada. Em seguida, determinado o conteúdo protéico, divididas em alíquotas de 1 a 2 mg/tubo e liofilizadas. O conteúdo protéico foi determinado pelo método de Bradford (1976)^[59]. Este método baseia-se na mudança de cor do corante Coomassie Brilliant Blue G.250 após interação com a proteína, detectável em 595 nm. A curva de referencia foi construída com Soro albumina bovina dissolvida em água e diluída nas concentrações de 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,0313 mg/mL. A cada 100 µL de amostra foram adicionados 3 mL do reagente de Bradford e feita a leitura de absorbância em 595 nm. As amostras foram quantificadas em comparação

com a curva padrão empregada no ensaio (Análise por regressão linear no programa GraphPad Prism).

4.2 Caracterização da crotoxina purificada

4.2.1 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA-SDS)

A crotoxina isolada foi analisada em eletroforese de sistema descontínuo e desnaturante (método de Laemmli (1970) modificado). Esta técnica foi utilizada para avaliar o grau de pureza e verificar a integridade da molécula comparando a sua migração relativa com Marcadores de Peso Molecular^[60].

Para realizar a eletroforese em gel de poliacrilamida, com dodecil sulfato de sódio (EGPA-SDS), foi utilizado gel de empilhamento a 4% em tampão de empilhamento e gel de resolução 12,5 %, em tampão de resolução (vide figura 5 - anexo 5).

As amostras e padrões de peso molecular foram desnaturados em tampão de amostra a 95 °C, por 5 minutos. O azul de bromofenol foi o traçador, que permitiu acompanhar a evolução da eletroforese. No gel foi aplicado um padrão de peso molecular e a crotoxina purificada.

A eletroforese processou-se a 20 mA até o final, com voltagem variando de 65 a 220 V. Após a corrida das amostras, o gel foi fixado e corado com o método do Coomassie Brilliant Blue R-250, e por fim foi descorado^[60]. O esquema básico do procedimento da eletroforese foi estruturado na figura 5 (anexo 5).

4.3 Ensaio de atividade biológica

4.3.1 Atividade enzimática

O ensaio de atividade enzimática utilizado foi baseado em Holzer e Mackessy (1996)^[61], e foi empregado devido a presença da enzima fosfolipásica da crotoxina. Primeiramente foi feita uma curva cinética usando a crotoxina em contato com diferentes concentrações do substrato 4-nitro-3-(octanoiloxy) ácido benzóico (NOBA).

Para tanto, a crotoxina foi diluída em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e o substrato foi preparado para 0,89, 2 e 3 mM em acetonitrila.

O teste avaliou os primeiros 5 minutos de reação efetuando-se leituras da absorbância, minuto a minuto, em espectrofotômetro de UV/visível, em comprimento de onda de 425 nm. Todo o ensaio foi realizado em laboratório climatizado a 25 °C

4.3.2 Citotoxicidade

Este teste avaliou a toxicidade “in vitro” da crotoxina em contato com células normais CHO-K1 (células de ovário de hamster chinês) em cultura e é baseado no procedimento original desenvolvido por Borefreund e col., para avaliação de agentes citotóxicos em geral, sobre uma monocamada de células^[62].

O mesmo procedimento foi seguido para avaliar a ação da crotoxina em células tumorais: A 549 (células tumorais de pulmão humano) e seu controle MRC 5 (células normais de pulmão humano), e MCF-7 (células tumorais de mama humana).

A viabilidade celular após a exposição a agentes tóxicos, pode ser “quantificada” pela incubação com corante vital MTS e reagente acoplador de elétrons, PMS. A incorporação do MTS pela população de células é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura^[57].

Para o teste de citotoxicidade todas as células foram cultivadas a 37°C, 5 % de CO₂, em meio RPMI contendo 5% de soro fetal bovino, ampicilina e fungizona, até atingirem a sub-confluência. A cultura celular e preparo das células para o teste de citotoxicidade está esquematizado na figura 6.

Figura 6. Esquema da cultura celular, etapa de preparo das células que serão utilizadas no teste de citotoxicidade

A crotoxina foi diluída diretamente no meio de cultura no intervalo de concentrações entre 650 a 1,56 $\mu\text{g/mL}$, com o fator de diluição 1:1,25.

Todas as amostras foram pipetadas em quadruplicata (50 μL /poço) em placa de cultura com 96 poços e mantidas na estufa até a preparação das suspensões celulares. As células foram removidas da garrafa de cultura com tripsina a 0,25%, centrifugadas, ressuspensas e contadas em câmara de Neubauer. Foram preparadas suspensões celulares de aproximadamente 60.000 células/mL com meio RPMI, com soro fetal bovino e distribuídas 50 μL (contendo 2.000 a 3.000 células/poço) sobre as placas de cultura contendo as amostras, como visto na figura 6 e 7. O volume total de cada poço foi de 100 μL . Uma coluna controle de quatro poços foi preparada com meio sem células (branco) e meio em vez de amostra mais as células (controle negativo). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida sob 5 % de CO_2 por 72 horas. Após este período, 20 μL de uma mistura (20:1) de 0,2 % de MTS e 0,09 % PMS em PBS foram adicionadas a todos os poços^[57], retornando as microplacas para a estufa. A leitura das microplacas foi efetuada após 2 horas, em leitor de ELISA a 490 nm. O procedimento do teste de citotoxicidade está esquematizado na figura 7.

Figura 7. Procedimento esquemático do teste de citotoxicidade

A concentração de crotoxina no ensaio com células tumorais A-549 (células tumorais de pulmão humano) e seu controle MRC 5 (células normais de pulmão humano), ficou no intervalo entre 240 a 0,93 µg/mL, com o fator de diluição 1:2. Para as células tumorais de mama (MCF-7) foram ensaiadas apenas 4 concentrações (35, 70, 140 e 280 µg/mL). Todas as diluições da crotoxina foram diretamente com o meio de cultura RPMI sem soro.

O potencial citotóxico foi estimado pela curva de interpolação, como a concentração da amostra que inibe 50 % da incorporação do MTS (ou 50% do crescimento celular) e que é expresso como índice de citotoxicidade (IC_{50%})^[58].

4.3.3 Dose letal média (DL₅₀)

A crotoxina purificada foi caracterizada quanto a seu efeito letal (DL₅₀), a sua atividade enzimática (fosfolipásica) e citotoxicidade em células normais, de ovário de hamster chinês (CHO-K1).

Para determinar a dose letal da crotoxina foram utilizados camundongos swiss fêmeas sadias, pesando em média 25 g. Para cada concentração foi estabelecido um grupo contendo 3 animais. Além disso, teve dois grupos controle nos quais foram administrados solução salina. Cada grupo foi mantido em gaiola separada e receberam água e alimentação *ad libitum*. Durante o experimento os camundongos permaneceram em laboratório, em temperatura ambiente.

A crotoxina foi administrada via intraperitoneal, em 7 concentrações: 3,9; 4,9; 6,1; 7,7; 9,6; 12 e 15 µg/mL. A crotoxina e solução salina (grupo controle) foram aplicadas via intraperitoneal.

Os animais foram observados por até 48 horas após a administração da toxina e anotado o número de animais mortos.

O cálculo de DL₅₀ foi efetuado pelo método de Spearman-Kärber^[63] que utiliza as equações abaixo, onde *m* é a dose letal média, *r* é a quantidade de animais mortos, *d* é a dose responsável pela primeira morte observada, *x*₁₀₀ é a dose média aplicada, *n* é a quantidade de animais mortos e *n* é a quantidade de animais/grupo (equação 1).

$$m = \underline{x}_{100} \pm (\underline{d}/\underline{n}) [\Sigma r - (n/2)]$$

Equação 1

4.4 Preparação do copolímero de enxerto

Amostras de PEBD, medindo 8x8 cm, foram previamente lavadas com uma solução aquosa de detergente extran (15 % V/V) em ultrassom, permanecendo por cerca de 5 minutos. Em seguida foram enxaguadas 3 a 4 vezes em água destilada para a retirada total do detergente, e secas sob vácuo em dessecador acoplado com uma bomba de vácuo, por aproximadamente 48 horas ou tempo suficiente para aquisição de peso constante das amostras poliméricas.

Para o processo da copolimerização seguiu-se o método de irradiação simultânea, em fonte de ^{60}Co , do polímero base em presença de monômero e solvente e ausência de oxigênio, esquematizado na figura 8.

Figura 8. Esquema de obtenção do copolímero de enxerto

As amostras secas de PEBD foram colocadas em ampolas de vidro contendo HEMA em solução de etanol em água destilada (10 % V/V). O monômero foi testado em concentrações de 15, 25 e 30 % (V/V). A reação química desencadeada neste teste pode ser vista na figura 9.

As ampolas com filme de PEBD e solução alcoólica de HEMA foram degaseificadas em uma linha de alto vácuo de 3 a 4 vezes por meio da técnica de congelamento e descongelamento alternados. Cada ampola foi fechada sob vácuo de 10^{-4} mm Hg e encaminhadas para a irradiação. A taxa de dose variou entre 0,0291 e 0,0979 kGy/h e as doses foram de 0,5, 1 e 2 kGy, como visto na tabela 4.

As amostras foram avaliadas quanto ao rendimento da enxertia por meio da equação 2, onde W_i e W_c representam respectivamente os pesos do filme inicial e do copolímero de enxerto.

$$\text{Grau de enxertia (\%)} = \frac{(W_c - W_i)}{W_i} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Figura 9. Obtenção do copolímero de enxerto PEBD-g-PHEMA

Para a imobilização da crotoxina sobre as superfícies obtidas realizou-se a ativação superficial, onde grupamentos químicos do PHEMA foram hidrolisados para permitir a ligação química de proteínas, como é o caso da crotoxina empregada nesse trabalho.

A preparação das matrizes poliméricas seguiu o processo descrito por Beddows e Guthries^[24]. O ensaio foi efetuado em capela. A finalidade do ensaio era transformar as ramificações de poli(metacrilato de 2-hidroxietila), do copolímero de enxerto, no correspondente poli(ácido metacrílico). As amostras do copolímero foram submetidas a refluxo com NaOH, 0,3 M e 1 M, durante três horas. Os produtos foram lavados com água destilada, HCl 0,3 M ou 1 M e novamente com água. As amostras foram secas e mantidas em dessecador até atingir peso constante. A reação química da hidrólise do copolímero de enxerto está na figura 10.

Figura 10. Esquema de hidrólise dos copolímeros PEBD-g-PHEMA

4.5 Caracterização do copolímero

4.5.1 Teste de sorção de água

Por meio do teste de sorção estabeleceu-se uma das características físicas dos copolímeros PEBD-g-PHEMA em relação à hidrofilicidade.

Cinco amostras de PEBD-g-PHEMA, com vários graus de enxertia que variaram de 2 % a 41 %, foram previamente pesadas e cortadas em dimensões de 2x2 cm, deixadas imersas em água destilada por 24 horas a 25 °C e a 37 °C. Os

copolímeros analisados foram avaliados gravimetricamente. Os dados utilizados para o cálculo foram após 1 e 24 horas. A hidrofilicidade dos copolímeros foi determinada conforme a equação 3, onde W_s é o peso inicial do polímero e W é o peso do polímero intumescido.

$$S (\%) = \frac{(W - W_s)}{W_s} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

4.5.2 Coeficiente de difusão

Este teste foi realizado tomando-se como base os resultados obtidos no teste de sorção de água realizado em amostras de PEBD-g-PHEMA, com diferentes graus de enxertia, após 1 hora de imersão em água a 25 °C e 37 °C^[64].

4.5.3 Espectroscopia em infravermelho

A espectroscopia foi efetuada com o propósito de identificar os grupamentos químicos de maior importância, presentes nos copolímeros de enxerto obtidos neste trabalho.

As análises de PHEMA, PEBD e PEBD-g-PHEMA, com 32 % de enxertia, foram realizadas utilizando o espectrofotômetro de infravermelho (BOMEM). A leitura foi realizada em transmitância. A análise dos filmes de copolímero de enxerto foi efetuada no acessório de ATR. O homopolímero residual de PHEMA formado na enxertia, foi seco, pulverizado, misturado com KBr (brometo de potássio) e prensado obtendo-se pastilhas as quais foram analisadas com suporte adequado.

4.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os copolímeros de enxerto obtidos foram caracterizados morfologicamente por meio da microscopia eletrônica de varredura, destinada para estudo topográfico da superfície de materiais sólidos.

As amostras foram colocadas em suportes metálicos, aderidos com fita adesiva dupla face. Um copolímero PEBD-g-PHEMA, com 32 % de enxertia, e filme de PEBD foram cortados em círculos de diâmetro de 5 mm e fixados no suporte utilizando-se uma pinça. A transmissão de imagens no microscópio eletrônico de varredura ocorre graças ao choque de elétrons nas placas de detecção.

4.6 Marcação da crotoxina com o radioisótopo ^{125}I

Primeiramente o ensaio de imobilização foi avaliado quanto a sua eficiência, utilizando-se a crotoxina marcada com ^{125}I .

A marcação da crotoxina com iodo-125 foi realizada pela Dra. Maria Tereza C. P. Ribela, pesquisadora do Centro de Biotecnologia, utilizando técnica clássica com cloramina T. Para tal, empregou-se 0,8 mCi de radioisótopo e 5 µg de crotoxina, dissolvidos em 10 µL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,4). A reação foi realizada em temperatura ambiente utilizando 0,8 µg de cloramina T seguida da adição, após 5 minutos, de 1 µg de metabissulfito de sódio e de 200 µg de iodeto de potássio. Foi realizado a purificação do traçador, ^{125}I -crotoxina, em coluna de exclusão molecular (Sephadex G-100) e eluída em tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo 0,1 % de soro albumina bovina e 0,1 % de azida sódica. O traçador foi armazenado a -20 °C^[65].

4.7 Avaliação da eficiência de imobilização química

4.7.1 Imobilização da crotoxina radioiodada

Para avaliar a eficiência do método de imobilização, da crotoxina sobre o copolímero, foi estudado o emprego de duas carbodiimidas: CMC (1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida meto-p-tolueno sulfonato) e EDAC (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida).

Após a marcação da crotoxina fez-se a sua imobilização sobre o copolímero de enxerto, PEBD-g-PHEMA, segundo método de Beddows e Guthrie^[24]. Para o acoplamento da proteína, o copolímero foi cortado em amostras circulares de 5 mm

de diâmetro. Logo após, efetuou-se a ativação dos grupos carboxílicos do copolímero, algumas amostras foram testadas com CMC e outras com EDAC (figura 11). Em um frasco adicionou-se 2 mL de PBS contendo 8 mg de CMC e 8 mg da crotoxina, enquanto que no segundo frasco adicionou-se 2 mL de PBS com 8 mg de EDAC e 8 mg de crotoxina, para 3 membranas. Os frascos foram mantidos sob agitação mecânica por aproximadamente 18 horas a 4 °C. A figura 11 mostra a reação química obtida na imobilização de ^{125}I -crotoxina sobre o copolímero de enxerto obtido.

Figura 11. Reação química da imobilização da crotoxina marcada, com I-125, sobre PEBD-g-PHEMA

Para a avaliação da quantidade de crotoxina, ligada sobre a superfície polimérica, mediu-se a radioatividade em contador gama. Esta medida foi realizada com as membranas imobilizadas, após as lavagens das membranas. A avaliação da crotoxina ligada foi obtida por meio da comparação da radioatividade entre a solução inicial de crotoxina marcada e a retida nas membranas.

Ao mesmo tempo colocou-se a solução de crotoxina marcada sobre as membranas de copolímero sem o acoplador químico, e após as lavagens, mediu-se a radioatividade também retida nas membranas.

4.8 Imobilização química com CMC

Com o copolímero hidrolisado fez-se a imobilização da crotoxina, segundo a mesma metodologia citada anteriormente, tendo-se decidido pelo uso do CMC. Com amostras circulares de 5 mm de diâmetro e procedeu-se a ativação dos grupos carboxílicos do copolímero, com CMC. Em um frasco adicionou-se 5mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 contendo 9,6 mg de CMC e 9,6 mg da enzima para 15 membranas, o qual foi mantido sob agitação mecânica por 18 horas a 4 °C. Após a imobilização, os filmes do copolímero de enxerto foram lavados com tampão fosfato salina (PBS), para retirar a toxina aderida de forma física na membrana polimérica, e dessa forma determinar a crotoxina ligada quimicamente. A dosagem protéica foi realizada no líquido proveniente das lavagens efetuadas sobre a membrana polimérica imobilizada, estabelecendo-se a concentração de crotoxina imobilizada por meio da diferença entre a solução inicial e a final. Por fim, o copolímero imobilizado foi seco, sob pressão reduzida, e armazenado em congelador.

4.9 Avaliação biológica do biomaterial

4.9.1 Atividade enzimática

Para avaliar a atividade da crotoxina imobilizada foi utilizado o mesmo teste de atividade fosfolipásica descrito anteriormente para a enzima livre.

Um disco de crotoxina imobilizada foi colocado em tampão tris-HCl 10 mM pH 8,0 e ensaiado para cada concentração de substrato 4-nitro-3-(octanoiloxi) ácido benzóico a 0,89, 2 e 3 mM. O teste avaliou os primeiros 10 minutos efetuando-se leituras da absorbância a cada minuto no espectrofotômetro de UV/visível, no comprimento de onda de 425 nm.

4.9.2 Citotoxicidade

Para o teste, o copolímero de enxerto (PEBD-g-PHEMA) e o polímero base (PEBD) foram submetidos à extração em RPMI sem soro fetal bovino, permanecendo em estufa úmida com 5 % de CO₂ por 48 horas. Os extratos poliméricos foram diluídos em série (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 %). O controle negativo

e o positivo, extrato de polietileno de alta densidade (PEAD) e solução de fenol a 0,2 % respectivamente, foram diluídos em série como os extratos poliméricos. O esquema do preparo dos extratos está na figura 12.

Figura 12. Preparo das diluições dos extratos poliméricos para o teste de citotoxicidade

Cada amostra foi ensaiada em quadruplicata, em microplacas, no volume de 50µL/poço para a suspensão celular aplicada e meio de cultura sem células. Todos os demais detalhes deste ensaio foram descritos anteriormente.

4.10 Obtenção das microesferas de PCL e imobilização de crotoxina sobre as microesferas obtidas

As microesferas foram preparadas e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Álvaro A. A. de Queiroz.

Poli(épsilon-caprolactona) (PCL) com peso molecular de 20 kDa foi sintetizado a partir da polimerização induzida pelo iodo do monômero épsilon-caprolactona de acordo com a técnica descrita por De Queiroz^[47].

As microesferas de PCL contendo crotoxina foram obtidas utilizando a técnica de evaporação do solvente de uma emulsão óleo-água. A fase interna aquosa foi obtida após a dissolução de uma quantidade apropriada de crotoxina em 0,121 mL de água destilada e deionizada. A fase orgânica foi preparada após dissolução do

polímero PCL (5% p/p) em uma fase orgânica formada por acetonitrila e diclorometano na proporção 1:1. Uma emulsão foi preparada após homogeneização do sistema a 24.000 rpm com auxílio de um agitador tipo turbina por 1 minuto para obter uma emulsão primária do tipo água-óleo (W_1/O_1). A emulsão primária obtida foi em seguida emulsionada em 25 mL de uma segunda fase oleosa constituída por isoparafina e 1% (p/p) de Span 80 obtendo-se então uma emulsão do tipo água-óleo-óleo ($W_1O_1O_2$). A emulsão foi transferida para um reator tipo tanque agitado (950 rpm) sendo o sistema mantido sob agitação constante a 30 °C por 1 hora e meia. A emulsão foi então diluída com 50 mL de óleo de canola para evitar o colapso das microesferas obtidas. A emulsão diluída no óleo de canola foi transferida para um béquer onde permaneceu sob agitação magnética por 2 horas a 30 °C. As microesferas obtidas foram centrifugadas e lavadas exaustivamente em hexano para remoção da fase oleosa. Após purificação as microesferas foram secas à temperatura ambiente (25 °C).

4.11 Eficiência do Encapsulamento da Crotoxina

Cerca de 10 mg de microesferas foram transferidas para um béquer contendo 3mL de NaOH 0.1 M e SDS (5% p/p). O sistema foi mantido sob agitação a 25 °C por uma noite à temperatura ambiente (25 °C). Após centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, 0,25 mL do sobrenadante foi ensaiado para dosagem protéica segundo o método de Bradford^[59].

4.12 Análise Morfológica das Microesferas e Distribuição de Tamanhos

O aspecto morfológico das microesferas foi observado com o auxílio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) e a análise de distribuição de tamanhos foi efetuado utilizando o software Hlimage ++ para aquisição e o tratamento computacional de imagens para análise da distribuição de tamanhos^[48].

4.13 Ensaio de atividade biológica

4.13.1 Administração prolongada

Na administração prolongada verificou-se a toxicidade sistêmica “in vivo”, com avaliação dos animais durante 20 dias. O copolímero e o copolímero com a crotoxina imobilizada foram comparados entre si, a crotoxina livre foi comparada com a encapsulada em microesfera e com a salina (também com injeções via intraperitoneal, diária). Utilizaram-se camundongos da linhagem C3H, fêmeas saudáveis, pesando em média 20 g, divididas em grupos com 3 animais cada. Os animais foram mantidos em microisoladores, em estantes ventiladas com temperatura e umidade controladas. Receberam alimentação e água *ad libitum*. A manipulação e pesagem dos animais foram feitas em laboratório com controle de temperatura, no biotério do IPEN.

A toxina livre foi preparada na concentração de 0,1 mg/mL em salina estéril e administrada na dose de 0,15 mL, via intraperitoneal. No grupo controle foi administrado a salina via intraperitoneal, no mesmo volume que a crotoxina.

O implante das formas imobilizadas foi realizado em condições assépticas, em fluxo laminar vertical. Inicialmente, os camundongos destinados aos implantes poliméricos foram tricotomizados no dorso, e feita uma pequena cirurgia para incisão do material polimérico, abaixo da epiderme. Em seguida o corte foi fechado com cola cirúrgica.

Fez-se um grupo controle para os dispositivos, e neste foi efetuado a aplicação do mesmo copolímero sem a crotoxina no dorso dos animais, deste grupo. A finalidade desse grupo era observar se os resultados obtidos com o copolímero imobilizado eram decorrentes da toxina, imobilizada ou da membrana polimérica.

Os animais foram pesados durante todo o teste e analisados seu comportamento e estado físico. Após os 20 dias, os animais foram sacrificados e foram retirados e pesados os seguintes órgãos: cérebro, coração, pulmão, rins, fígado e baço.

5 RESULTADOS

5.1 Purificação da crotoxina

O fracionamento do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* em gel Superdex 75 pode ser visto no cromatograma disposto na figura 13. A crotoxina é o pico maioritário deste veneno e foi destacada com a barra. Os demais picos, presentes da esquerda para a direita, representam outras toxinas eluídas em ordem decrescente de volume molecular.

As frações correspondentes a crotoxina foram misturadas, dializadas para troca do tampão e submetidas a uma coluna de troca aniônica; cujo registro cromatográfico foi obtido pela absorbância em 280 nm, como visto na figura 13. O cromatograma do isolamento da crotoxina está exibido na figura 14. As frações correspondentes à crotoxina foram reunidas e novamente dializadas, para retirar o sal utilizado na eluição da coluna.

Figura 13. Cromatograma do veneno total da *Crotalus durissus terrificus* em Superdex 75, coluna 1,6x65 cm. Eluída em tampão formiato de amônio 100 mM pH 3,0. Frações 1 mL. A detecção foi feita medindo-se a absorbância das frações em 280 nm. A crotoxina está identificada pela barra.

Figura 14. Cromatograma de troca iônica para isolamento da crotoxina. Coluna Mono Q FF (1,2x25 cm). Eluída em Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,8 e gradiente linear de NaCl (0 a 500 mM, no mesmo tampão). Fluxo 1,0 mL/min. Frações de 2 mL. Registro da absorvância em 280 nm. O pico relativo à crotoxina está identificado pela barra.

5.2 Análise em eletroforese em gel de poliacrilamida

Os géis, figura 15 e 16, apresentam o padrão de peso molecular e a crotoxina purificada. Na figura 15 a crotoxina foi aplicada em condições redutoras, dessa forma a toxina foi desmembrada e apenas pôde-se observar a presença da banda de 15 kDa, característica da fosfolipase A₂, enquanto que a crotopotina não foi identificada pois esta possui peso molecular menor que o padrão de peso molecular empregado no ensaio. A figura 16 apresenta o gel com a crotoxina em condições não redutoras, como consequência houve a constatação da banda com peso molecular de 23 kDa, característica da crotoxina. Observa-se também um fraco arraste na banda e outras bandas de alto peso molecular, que pode ser formas agregadas da crotoxina ou ainda a presença de outras toxinas provenientes do veneno bruto de cascavel, tanto na figura 15 quanto na figura 16.

Figura 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15 %, sistema descontínuo de tampões com SDS, em condições redutoras. Corado em CBB R-250. Análise de crotoxina purificada.

Figura 16. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 %, sistema descontínuo de tampões com SDS, em condições não redutoras. Corado em CBB R-250. Análise de crotoxina purificada.

O marcador de peso molecular utilizado foi o LMW-SDS marker da Amersham. De acordo com as figuras 15 e 16, os pesos moleculares do marcador são:

1. fosforilase b _____ 97.000 Da
2. albumina bovina _____ 66.000 Da
3. ovalbumina _____ 45.000 Da
4. anidrase carbonica _____ 30.000 Da
5. inibidor de tripsina _____ 20.100 Da
6. α -lactoalbumina _____ 14.400 Da

5.3 Ensaio de atividade biológica

5.3.1 Atividade enzimática

A curva cinética (concentração de produto formado em função de tempo de reação) para atividade fosfolipásica da crotoxina livre, frente a diferentes concentrações do substrato (3,0 mM; 2,0 mM e 0,89 mM), pode ser vista na figura 17.

Figura 17. Curva de atividade fosfolipásica da crotoxina livre. Substrato NOBA nas concentrações 3,0 mM; 2,0 mM e 0,89 mM.

5.4 Ensaio de atividade biológica

5.4.1 Citotoxicidade

A curva de citotoxicidade foi avaliada em CHO-K1 e é apresentada na figura 18. O índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) calculado foi de 650 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 18. Curva de citotoxicidade da crotoxina em contato com células CHO-K1

A figura 19 apresenta a ação da crotoxina em células de tumor de pulmão humano (A 549) tendo como controle as células normais (MRC 5) deste mesmo órgão. O índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) para as células tumorais (A 549) e normais (MRC 5) foi aproximadamente 210 $\mu\text{g/mL}$ não apresentando diferença significativa entre as duas linhagens.

Figura 19. Curvas de citotoxicidade da crotoxina em contato com as células MRC-5 e A 549

Na figura 20 observa-se a ação da crotoxina, em quatro concentrações, sobre células de tumor de mama humana (MCF-7). O índice de citotoxicidade (IC₅₀%) não foi atingido experimentalmente neste ensaio, mas por uma estimativa teórica extrapolando a curva de citotoxicidade o IC₅₀% é próximo a 300 µg/mL

Figura 20. Curva de citotoxicidade de crotoxina em contato com células tumorais de mama humana.

5.5 Ensaio de atividade biológica

5.5.1 Dose letal média (DL_{50})

A crotoxina purificada foi caracterizada quanto a sua toxicidade “in vivo”, por determinação da DL_{50} , via intraperitoneal. Utilizando-se o método de Spearman-Kärber a dose letal média, calculada, foi 0,09 mg/Kg de animal.

5.6 Obtenção do copolímero de enxerto

Os copolímeros de enxerto PEBD-g-PHEMA foram obtidos via radiação ionizante, como esquematizado na figura 8. Para o processo da copolimerização seguiu-se o método de irradiação simultânea, em fonte de ^{60}Co , do polímero base em presença de monômero e solvente. Além do copolímero também foi formado

PHEMA residual, que por ficar aderido fisicamente ao copolímero, este foi submetido a lavagens com água e solventes orgânicos como etanol e metanol.

Os filmes copolimerizados limpos e secos foram avaliados quanto ao grau de enxertia por meio de técnica gravimétrica. Nos quatro ensaios de enxertia realizados, nas diferentes condições, obtiveram-se copolímeros com diversos graus de enxertia que variaram de 2 a 50%, conforme a tabela 4.

Os copolímeros de enxerto foram hidrolisados, conforme a descrição de Beddows e Guthrie^[59] para disponibilizar os grupos funcionais, transformando as ramificações de poli(metacrilato de 2-hidroxietila) em poli(ácido metacrílico), para posterior imobilização da crotoxina (figura 10).

Tabela 4. Grau de enxertia dos copolímeros PEBD-g-PHEMA sob várias condições de enxertia

Ensaio	Amostra	HEMA (%)	Taxa de dose (kGy/h)	Dose (kGy)	Grau de enxertia (%)
1	3	30	0,061	2	32
	4	30	0,061	2	50
	5	30	0,041	2	41
	6	30	0,041	2	34
	7	30	0,030	2	29
	8	30	0,030	2	32
2	13	30	0,030	1	23
	14	15	0,060	1	1,8
	15	15	0,040	1	2,2
	16	15	0,030	1	2,5
3	18	30	0,039	0,5	25
	20	30	0,039	1	25
	21	30	0,029	1	21
	23	15	0,039	1	2
	24	15	0,029	1	2,1
4	25	30	0,039	1	17,9
	26	30	0,039	1	19,9
	27	30	0,040	0,5	15,6
	28	30	0,040	0,5	13
	29	25	0,040	1	12,2
	30	25	0,040	1	9,7
	31	25	0,042	0,5	12,4
	32	25	0,042	0,5	10,6

As amostras do copolímero foram submetidas a refluxo com NaOH e depois foram lavadas. As amostras foram testadas em diferentes soluções, algumas foram testadas com NaOH e HCl em 0,3 M e outras em 1 M.

A diferença estabelecida da molaridade foi baseada no trabalho de Beddows e Guthries (1988)^[24] original, que emprega 1 M, e modificado apresentado por Almeida a qual avaliou a possibilidade de várias molaridades e dentre elas a de 0,3 apresentou melhores resultados, em relação à imobilização protéica^[66].

5.7 Teste de sorção de água

Os copolímeros foram avaliados quanto a sua afinidade pela molécula de água. As comparações foram realizadas entre PEBD e copolímeros com diversos graus de enxertia em temperatura ambiente (25 °C) e a 37 °C. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5. Hidrofilicidade das amostras de PEBD-g-PHEMA frente a diferentes temperaturas

Amostra	Grau de Enxertia (%)	Hidrofilicidade (%)	
		25 °C	37 °C
<i>PEBD (virgem)</i>	0	1,89	1,73
<i>Copolímero 23</i>	2	5,80	1,95
<i>Copolímero 21</i>	21	3,96	4,52
<i>Copolímero 18</i>	25	11,82	3,64
<i>Copolímero 08</i>	32	18,38	13,04
<i>Copolímero 05</i>	41	27,49	32,17

5.8 Coeficiente de difusão

O coeficiente de difusão foi obtido a partir dos resultados de sorção de água, obtidos no teste com PEBD-g-PHEMA com diferentes graus de enxertia. Este teste foi realizado tomando-se como base os resultados após 1 hora de imersão em água em duas temperaturas (25 °C e 37 °C). Duas isotermas foram montadas e por meio delas obteve-se os dados apresentados na figura 21.

Figura 21. Coeficiente de difusão dos copolímeros PEBD-g-PHEMA, com diferentes graus de enxertia, a 25 °C e 37 °C

5.9 Espectroscopia em infravermelho

As alterações estruturais no PEBD, após a copolimerização foram visualizadas pelos espectros no infravermelho, e a análise identificou os grupamentos químicos de maior importância presentes nos copolímeros. Como o interesse maior era analisar a superfície, o copolímero foi avaliado por FTIR-ATR. As análises foram realizadas em transmitância. A eficiência da enxertia foi demonstrada, provando a inserção de PHEMA na superfície de PEBD. Os perfis espectroscópicos detectaram os grupamentos químicos principais do homopolímero PHEMA formado após a enxertia, e do filme de PEBD em comparação com o PEBD-g-PHEMA com 32 % de enxertia.

Na figura 22 está ilustrado o espectro ATR do PHEMA. As bandas presentes nas regiões de 3433 cm^{-1} e 1727 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, aos grupos funcionais hidroxil (-OH) e carbonila (C=O). No espectro ATR do PEBD-g-PHEMA da figura 23 observa-se também as bandas 3400 cm^{-1} e 1730 cm^{-1} . A banda da carbonila aumenta de acordo com o percentual de enxertia na matriz de PEBD. No filme de PEBD, por sua vez, não foram encontradas as bandas descritas anteriormente.

Figura 22. Espectro FTIR-ATR do PHEMA

Figura 23. Espectro de FTIR-ATR do PEBD não modificado (em roxo) e do copolímero de enxerto PEBD-g-PHEMA com 32% de enxertia (em vermelho)

5.10 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos copolímeros de enxerto foi caracterizada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Neste ensaio estudou-se a superfície do PEBD-g-PHEMA obtido, hidrolisado e o filme de PEBD. As amostras foram analisadas por microscópio eletrônico de varredura, obtendo-se as micrografias apresentadas nas figuras 24, 25 e 26. O copolímero analisado foi o que apresentou 32 % de enxertia.

Figura 24. Micrografia do filme de PEBD, com aumento de 1000 x

Figura 25. Micrografia de PEBD-g-PHEMA, com aumento de 1000 x

Figura 26. Micrografia de PEBD-g-PHEMA, com aumento de 2000 x

5.11 Imobilização da crotoxina no copolímero

O copolímero hidrolisado, com 12 % de enxertia, foi imobilizado com a crotoxina purificada. O rendimento da imobilização foi calculado pela diferença entre a concentração da proteína nos líquidos de lavagem e a concentração inicial da crotoxina, determinadas pelo método de Bradford^[59]. Assim, a concentração no líquido extraído da lavagem superficial das membranas poliméricas foi 26 µg/mL e a concentração de crotoxina imobilizada foi de 0,027 mg/mm².

5.12 Imobilização da toxina marcada

A concentração de crotoxina radioiodada aderida sobre a superfície polimérica, foi determinada pelas medidas no contador gama. Este ensaio foi realizado com as superfícies poliméricas na presença e ausência dos acopladores e da crotoxina marcada. Os resultados da imobilização com CMC estão dispostos na tabela 6 e os com EDAC encontram-se na tabela 7.

Tabela 6. Resultado da contagem por minuto das imobilizações realizadas da crotoxina, marcada radioativamente, com CMC

Amostra analisada	Radioatividade (cpm)		
	<i>Média (3 unidades)</i>	<i>Média/unidade</i>	<i>Imobilização (%)</i>
Copolímeros sem CMC	1006	335	2,29
Copolímeros com CMC	1385	462	3,15

Tabela 7. Resultado da contagem por minuto das imobilizações realizadas da crotoxina, marcada radioativamente, com EDAC

Amostra analisada	Radioatividade (cpm)		
	Média (3 unidades)	Média/unidade	Imobilização (%)
Copolímeros sem EDAC	2450	817	6,29
Copolímeros com EDAC	2885	962	8,68

5.13 Avaliação biológica do biomaterial

5.13.1 Atividade enzimática

A curva cinética (concentração do produto formado em função do tempo) obtida com o copolímero imobilizado com crotoxina, frente a três concentrações do substrato (0,89; 2,0 e 3,0 mM) esta na figura 27.

Figura 27. Curva de atividade enzimática da crotoxina imobilizada no copolímero PEBD-g-PHEMA, em 3 concentrações de substrato: 0,89, 2 e 3mM

5.13.2 Citotoxicidade ($IC_{50\%}$)

As curvas de citotoxicidade “in vitro” do copolímero de enxerto PEBD-g-PHEMA e do polímero base (PEBD) avaliados com células CHO-K1, estão apresentadas na figura 28. Como resultado da citotoxicidade do material analisado pode-se constatar que o copolímero não apresentou toxicidade, conforme figura 28, revelando um comportamento semelhante ao controle negativo.

Figura 28. Curvas de citotoxicidade do polímero virgem (PEBD) e copolímero PEBD-g-PHEMA, com 50 % de enxertia

5.14 Obtenção das Microesferas de PCL encapsuladas com crotoxina

As microesferas de policaprolactona foram analisadas quanto à cinética de liberação da crotoxina incorporada. Na figura 29 pode-se observar que a liberação da crotoxina ocorre rapidamente no início do teste, e conforme o teste prossegue a curva vai atingindo um nível de equilíbrio, ou seja, ocorre uma liberação controlada.

Figura 29. Liberação “in vitro” de crotoxina das microesferas de PCL em solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) a 37 °C contendo 2 % (m/v) de Tween 80®.

5.15 Análise Morfológica das Microesferas e Distribuição de Tamanhos

O aspecto morfológico das microesferas e a distribuição de tamanhos foram efetuados por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e pelo software Hlimage ++, respectivamente. A figura 30 refere-se à imagem obtida das microesferas por meio da MEV. Por meio desta micrografia das microesferas pôde-se notar que, a maioria das microesferas apresentaram tamanhos semelhantes e estrutura esférica com superfície lisa e algumas imperfeições. Algumas das microesferas, a minoria, visualiza-se uma superfície mais rugosa, rica em poros.

Figura 30. Micrografia MEV das microesferas de PCL contendo crotoxina.

5.16 Ensaio de atividade biológica - Administração prolongada

O índice de variação de peso dos animais com diferentes tratamentos foi acompanhado por 20 dias. Na figura 31 são apresentadas variações de peso dos grupos que receberam a administração diária de crotoxina ou o implante das microesferas encapsuladas com crotoxina. O peso dos animais mostra que não houve alteração, em todos os grupos; no entanto é perceptível o início da queda de peso do grupo injetado com crotoxina livre.

Figura 31. Gráfico da variação do peso dos animais, injetados com crotoxina livre e implantados com microesferas de liberação contínua de crotoxina.

A figura 32 apresenta a comparação do grupo da crotoxina livre com o controle, tratado com salina. Pôde-se observar que o grupo crotoxina livre obteve perda de peso, em relação ao outro.

Figura 32. Comparação da variação de peso dos grupos injetados diariamente com crotoxina livre e salina

Na figura 33 está disposto os dados dos grupos com copolímero PEBD-g-PHEMA e PEBD-g-PHEMA-i-crotoxina. O resultado obtido revelou que não houve variação no peso dos animais, durante todo o ensaio.

Figura 33. Gráfico da variação do peso dos animais implantados com copolímero de enxerto na ausência e presença de crotoxina

Após os 20 dias, os animais foram sacrificados e alguns órgãos foram coletados e pesados e os dados foram dispostos na figura 34. Os órgãos retirados foram: cérebro, coração, pulmão, rins, fígado e baço.

Figura 34. Análise gravimétrica dos órgãos retirados dos animais tratados com crotoxina livre, imobilizada, com salina e copolímero de enxerto

6 DISCUSSÃO

6.1 Obtenção e caracterização da crotoxina

A crotoxina preparada para este trabalho apresentou peso molecular e atividades biológicas compatíveis com as características descritas na literatura. Na análise em eletroforese a crotoxina foi tratada com dodecil sulfato de sódio (SDS) para anular o efeito das cargas intrínsecas da cadeia protéica. No entanto, este detergente também promove a dissociação das cadeias, o que explica o peso molecular ao redor de 15 kDa (entre 14,4 e 20,1 kDa) referente à fosfolipase. A crotapotina não está presente no range de resolução deste gel, por ter peso molecular de aproximadamente 8,9 kDa.

Há um leve arraste na banda de fosfolipase A₂, o que pode sugerir pequenas quebras na cadeia polipeptídica. A presença de uma banda de alto peso molecular (aproximadamente 72 kDa) sugere a presença de agregados na preparação, porém, em baixa concentração. Considerando que os agregados, em geral, são inativos e a DL₅₀ obtida no ensaio de toxicidade “in vivo” foi compatível com dados de outros autores, pode-se dizer que a porcentagem de agregados, fragmentos e/ou contaminantes na preparação é desprezível^[16].

O ensaio com NOBA também se mostrou sensível e linear podendo ser adequado para testes qualitativos de atividade enzimática da crotoxina, assim como para detectar sua atividade nos biomateriais.

A curva de viabilidade celular em CHO-K1 mostrou a relação dose resposta esperada, embora a IC_{50%} obtida seja muito superior à DL₅₀ obtida. A diferença na resposta provavelmente está relacionada à linhagem celular utilizada. Esta linhagem celular não é alvo da crotoxina, no entanto, esta célula foi escolhida porque é a referência da norma internacional ISO 10.993-5, para os ensaios com biomateriais.

As curvas de viabilidade com as demais células também não reproduziram os resultados de outros autores como Rudd e col.^[6]. As IC_{50%} obtidas foram superiores às obtidas por estes autores que estiveram entre 2,5 e 10 µg/mL, enquanto que os resultados obtidos neste trabalho foram superiores a 200 µg/mL. Além disso, observou-se que não houve diferença entre os resultados obtidos com o emprego das células tumorais e normais de pulmão (humano), dessa forma pode-se concluir que a crotoxina não é seletiva para células tumorais. Este resultado não pode ser afirmado para todas as linhagens celulares, pois provavelmente o mecanismo de ação da crotoxina deve ser diferenciado dependendo da célula. Outro fato observado foi da maior sensibilidade das células de pulmão humano, tanto normais quanto tumorais, em comparação com as células tumorais de mama humana e as de ovário de hamster chinês. Esta maior sensibilidade não pôde ser melhor explicada neste trabalho devido à falta de outros estudos mais detalhados, mas uma das possibilidades desse fato pode ser a velocidade de multiplicação celular, ou seja, quanto mais rápido a divisão celular maior a sensibilidade da crotoxina. Portanto, esta observação é bastante plausível já que as células de pulmão, com divisão celular mais imediata que as células tumorais de mama, apresentaram-se mais sensíveis em contato com a crotoxina. Os dados obtidos neste trabalho corroboraram com as publicações de Baldi e col., 1988^[20].

É interessante destacar que estudos clínicos são promissores para este trabalho, como demonstrados em outros trabalhos realizados os quais comprovaram a ação anti-tumoral da crotoxina. O mecanismo de ação da crotoxina não está bem definido, e dessa forma há apenas idéias descritas da provável forma de atividade desta toxina. Ainda há muito a ser feito.

Não ocorreram alterações comportamentais evidentes. Também não ocorreram reações inflamatórias no local do implante dos biomateriais. O menor ganho de peso dos animais tratados, com crotoxina, também poderia ser resultante do estresse das injeções diárias. Este resultado é em relação ao grupo da crotoxina livre, enquanto que a perda de peso, no grupo das microesferas encapsuladas, pode ser devido à ação tóxica da toxina liberada, demonstrando assim a liberação da crotoxina desse implante.

6.2 Obtenção do copolímero de enxerto

O corpo e seus fluidos estão essencialmente em meio aquoso, e quando se pretende obter materiais para contactá-los deve-se verificar a possível adequação de materiais hidrofílicos. Os géis poliméricos hidrofílicos, hidrogéis, tiveram sua primeira aplicação descrita por Wichterle e Lim em 1960 que consistia em hidrogéis sintéticos baseados em poli(metacrilato de 2-hidroxietila) PHEMA usados como lentes de contato e que apresentaram biocompatibilidade com o tecido^[41]. Desde então os hidrogéis têm sido relatados como possuidores de boa compatibilidade sanguínea^[51] e muitos são os trabalhos publicados que descrevem seu uso. Hoffman e col. estudaram extensivamente a aplicação de hidrogéis poliméricos em diferentes substratos e suas correspondentes propriedades de biocompatibilidade^[44]. Hisue e col.^[52-53] e Lee e col.^[54] estudaram a enxertia do PHEMA em borracha de silicone através da enxertia induzida por plasma para a obtenção de córneas artificiais.

A irradiação desencadeia a formação de sítios ativos de HEMA obtendo-se PHEMA, enquanto que no PEBD possibilita a união com o PHEMA formado e, conseqüentemente, a obtenção do copolímero de enxerto^[8]. A técnica de enxertia via irradiação simultânea foi empregada no trabalho de Stanett, o qual a aplicou para obtenção do sistema polietileno-ácido acrílico^[67]. O PEBD em contato com HEMA foi imediatamente desgaseificado e encaminhado para a irradiação. Dessa forma, o período curto de contato entre monômero e polímero base pôde favorecer a enxertia apenas superficial, enquanto que com um maior intervalo a enxertia poderia ocorrer no interior da matriz polimérica^[56].

Devido a fragilidade dos filmes e a excessiva homopolimerização, observadas em copolímeros com alta dose de radiação, houve a perda de algumas superfícies poliméricas. Alguns copolímeros foram perdidos após a retirada da ampola e outros durante o processo de lavagem, pois não foi possível a retirada total de PHEMA dessas superfícies perdidas.

De acordo com os dados da tabela 5, apresentada nos resultados, pôde-se constatar que foi obtido copolímeros com vários graus de enxertia. Os diversos graus de enxertia apresentados na tabela 5 provam o que influenciou na variação dos dados obtidos. Pôde-se verificar que a taxa de dose e dose de radiação não

foram os principais responsáveis pelas mudanças na enxertia. Os resultados obtidos revelaram que, alguns copolímeros trabalhados com a mesma dose ou taxa de dose, a concentração de HEMA foi responsável pela variação no grau de enxertia. De acordo com a tabela 5, estes fatos podem ser observados comparando-se as amostras 13 e 16, com diferentes concentrações de HEMA, os quais apresentaram uma diferença significativa na enxertia.

Além disso, comparando-se as amostras obtidas no primeiro ensaio (amostras 3 a 8) pode-se observar que estas amostras obtiveram variação no grau de enxertia apesar de terem a mesma concentração de monômero. Essa variação pode ser devido à desgaseificação, ou seja, em algumas amostras essa etapa deve ter ocorrido por causa do maior ou menor vácuo aplicado. O vácuo pode ter sido perdido também graças a uma vedação irregular das ampolas de vidro, utilizadas na desgaseificação. Esse dado pode ser notado comparando-se a amostra 3 com a 4, do primeiro ensaio desenvolvido, conforme apresentado na tabela 5.

Dessa forma conclui-se que as diferentes condições impostas na copolimerização foram responsáveis pela obtenção de vários graus de enxertia, sendo que a concentração de monômero hidrofílico se destacou, mas houve a colaboração da taxa de dose e da dose de radiação também.

6.3 Hidrólise dos copolímeros de enxerto

Antes da imobilização da crotoxina sobre o copolímero de enxerto houve a hidrólise das superfícies poliméricas. Esse teste teve a finalidade de disponibilizar grupamentos químicos favoráveis à ligação com uma proteína. O homopolímero PHEMA após sofrer a hidrólise teve sua ramificação transformada em ácido carboxílico (COOH). A proteína usada nesse trabalho, crotoxina, se liga covalentemente à ramificação carboxílica formada. Essa união é semelhante a ligação química responsável pela união dos aminoácidos e, conseqüentemente, pela obtenção das proteínas.

A hidrólise também pode ser empregada com o objetivo de certificar a obtenção de um copolímero de enxerto. A enxertia tem a função de originar um copolímero, no entanto há possibilidades de obtenção de uma blenda. A diferença

entre as duas formas poliméricas está na forma que o monômero se une ao polímero base. No copolímero há uma ligação química enquanto que na blenda ocorre apenas uma adsorção, ou seja, uma união física. Quando uma blenda sofre hidrólise esta é dissolvida. Dessa forma pode-se dizer que este trabalho obteve um copolímero de enxerto, pois não ocorreu nenhum problema quanto ao desligamento de PHEMA do copolímero, ou seja, houve uma ligação química entre o homopolímero e PEBD^[68].

6.4 Teste de sorção de água

Neste teste avaliou-se a hidrofilicidade do copolímero de enxerto e o coeficiente de difusão da água em contato com material polimérico. Por meio dos resultados obtidos do teste de sorção de água pôde-se provar a presença de HEMA na superfície de PEBD. Esta afirmação leva em consideração a característica hidrofílica do monômero utilizado.

Os resultados obtidos nesta etapa provam que o grau de enxertia está intimamente relacionado com a presença de PHEMA, ou seja, quanto maior o grau de enxertia apresentado pelo copolímero, maior é a sorção de água (adsorção e absorção), independente da temperatura analisada.

Como já foi discutido, o aumento da hidrofilicidade é consequência da enxertia de hidrogel na matriz polimérica. O intumescimento dos hidrogéis em meio aquoso é favorecido por inúmeros fatores, dentre eles destaca-se a flexibilidade das cadeias poliméricas, baixa densidade de ligações cruzadas, fortes interações com a molécula de água e a existência de um potencial osmótico^[64].

6.4.1 Coeficiente de difusão

Quanto ao coeficiente de difusão pôde-se notar que copolímeros com níveis superiores a 30 % de enxertia sofrem alteração na propriedade de sorção de água, consequentemente há uma diminuição drástica na hidrofilicidade. Esta mudança ocorre graças ao aumento das ligações cruzadas entre as cadeias de HEMA,

durante a enxertia. Este aumento promove a formação de uma rede polimérica rígida, portanto com poucos poros, e também impede a maior interação com moléculas de água. De acordo com Ratner (1989), a hidrofiliabilidade de um polímero é facilitada diante de baixa densidade de ligações cruzadas, o que não é visto a partir de copolímeros com graus de enxertia superiores a 30 %^[69]. Este fenômeno é observado tanto a temperatura ambiente quanto a 37 °C.

6.5 Espectroscopia em infravermelho

A espectroscopia no infravermelho com ATR permite detectar alterações superficiais, pois apenas os espectros refletidos na membrana polimérica são detectados. As mudanças são visualizadas graças a vibrações das ligações químicas as quais são alongadas, contraídas ou deformadas, ou seja, ocorre distanciamento, aproximação ou mudança de posição dos átomos^[70].

Nos espectros em infravermelho foi traçado a porcentagem de luz transmitida em função do comprimento de onda (número de ondas em cm^{-1}). Na figura 17 está o espectro de PHEMA, no qual pode-se notar a presença das bandas carbonila e hidroxil, características do homopolímero. Essas bandas também foram visualizadas na análise do copolímero de enxerto. Na figura 18 estão os espectros de PEBD e PEBD-g-PHEMA. Nessa comparação percebe-se que bandas nas regiões de 3400 cm^{-1} e 1730 cm^{-1} são decorrentes de PHEMA presente na superfície do copolímero. Dessa forma pode-se afirmar que a enxertia obteve êxito. As duas bandas são provenientes de PHEMA, pois não são visualizadas no espectro de PEBD. Esta análise também foi realizada por Xue e Wilkie (1995)^[68] no trabalho, envolvendo filmes de poli(tereftalato de etileno) (PET) com ácido metacrílico, e por Almeida (2000) na obtenção de copolímeros de PET com HEMA^[66].

6.6 Microscopia eletrônica de varredura

O MEV foi utilizado para mostrar a influência de PHEMA na mudança superficial de PEBD.

Como pode ser visto nas micrografias das figuras 20 e 21, o copolímero apresentou uma superfície rugosa. Enquanto que no polímero base pode-se verificar a sua superfície lisa, figura 19. Esta característica do copolímero é devido a presença de PHEMA, o qual causou significativas mudanças superficiais. As diferenças topográficas também foram observadas na enxertia de dimetilacrilamida (DMMA) em poli(tetrafluoretileno) (PTFE) por Razzak (1988)^[71].

6.7 Imobilização da crotoxina sobre o copolímero de enxerto

Após a obtenção, hidrólise e caracterização, o copolímero de enxerto foi imobilizado superficialmente com a crotoxina. O ensaio foi realizado, primeiramente, com a crotoxina marcada. Além disso, nessa etapa foi estudado o emprego de duas carbodiimidas. Após a avaliação com a proteína marcada realizou-se a imobilização da crotoxina livre.

A imobilização protéica pode ser realizada de várias formas obtendo diferentes resultados finais. A forma que a proteína é imobilizada, de acordo com o modo de fixação, pode ser inclusa em matriz ou adsorvida com ligação covalente^[72-74]. A crotoxina foi fixada por meio de ligação covalente, na superfície do copolímero PEBD-g-PHEMA.

6.8 Imobilização da toxina marcada

No teste com CMC e EDAC pôde-se verificar que a imobilização usando carbodiimidas resultou em membranas com maior radioatividade, em comparação com o teste das membranas colocadas em contacto com a toxina marcada sem carbodiimidas. Portanto, tanto CMC quanto EDAC mostraram a sua ação na imobilização da crotoxina sobre PEBD-g-PHEMA. Com EDAC, a radioatividade foi ligeiramente superior em comparação com CMC, mas estes dados não foram suficientes para provar qual carbodiimida age melhor. A radioatividade retida nas membranas apenas colocadas em contato com o marcado, foi devido ao copolímero

ter em sua estrutura um hidrogel, o qual tem bastante afinidade com a água, no caso a solução aquosa da toxina marcada.

Como os resultados apresentados na imobilização demonstraram que as duas carbodiimidas favoreceram a união protéica, o ensaio posterior com crotoxina livre empregou o CMC como carbodiimida de escolha.

6.9 Imobilização da toxina

Na imobilização da crotoxina obteve-se uma baixa ligação protéica. Esse resultado sugere que a concentração de proteína aderida superficialmente a um polímero qualquer depende da quantidade de grupamentos químicos disponíveis, ou seja, em copolímeros com maior grau de enxertia a imobilização seria maior. Neste ensaio o copolímero utilizado apresentava 12 % de enxertia. Apesar do baixo rendimento da imobilização, o resultado foi favorável. Além disso, a imobilização não foi aconselhável em copolímeros com maior nível de enxertia tendo em vista os resultados na determinação do coeficiente de difusão. A partir de 30 % de enxertia, como discutido no coeficiente de difusão, a interação entre água e polímero foi menor e isso levava a crer que o comportamento seria semelhante na ligação com uma proteína em polímero, já que muitos grupamentos estariam interiorizados em enxertias mais elevadas. Entretanto, outros copolímeros com níveis de enxertia intermediários não foram imobilizados, devido à baixa disponibilidade de crotoxina purificada.

6.10 Atividade enzimática

A atividade apresentada por crotoxina livre foi maior que a imobilizada, como visto nas figuras 17 e 27. A curva cinética evidenciou que a crotoxina imobilizada manteve a atividade fosfolipásica, embora tenha ocorrido uma moderada diminuição desta atividade.

A imobilização pode ter causado certos problemas à toxina como limite do acesso ao substrato, por meio do sítio ativo da proteína, impedimento estérico e até

mudança em sua conformação^[72]. Outro fato que pode explicar a diferença de ação da crotoxina imobilizada e a livre é a concentração da toxina, no copolímero imobilizado a toxina estava em menor concentração que a livre (conforme calculado pelo rendimento da imobilização).

O teste de atividade enzimática também pode ser utilizado para análise da eficiência da imobilização. No trabalho de Rodas (1997), no estudo da atividade de enzimas com potencial para uso clínico, as proteínas permaneceram ativas após a sua ligação ao suporte polimérico^[8]. Na imobilização de crotoxina sobre PEBD-g-PHEMA, com o resultado da ação contínua da toxina em contato com o substrato NOBA, pode-se afirmar que a proteína foi aderida ao polímero.

6.11 Teste de citotoxicidade

O método utilizado segue a norma internacional ISO 10.993-5 e é baseado no procedimento original desenvolvido por Borefreund e col.^[62], o qual avalia possíveis agentes citotóxicos, sobre uma monocamada de células. O resultado é baseado na avaliação quantitativa da viabilidade celular em exposição a agentes tóxicos, pela incubação com corante vital MTS e reagente acoplador de elétrons, PMS. Quanto maior a incorporação de MTS pelas células, maior será a absorbância apresentada (Cory e col.)^[57]. No ensaio de citotoxicidade devem ser incluídos os controles positivo (tóxico) e negativo (não tóxico) para adequar o processo, monitorando e assegurando a sua eficiência^[58].

No ensaio desenvolvido o controle positivo (fenol 0,2 %) revelou sua toxicidade e o controle negativo (PEAD) não gerou a morte de uma população celular maior que 50 %. O copolímero de enxerto (PEBD-g-PHEMA) foi avaliado e pôde-se verificar que este não apresentou toxicidade, como visto na Figura 28, provando a sua biocompatibilidade e podendo assim ser utilizado como biomaterial.

6.12 Administração prolongada

Este teste apresenta também que a liberação da crotoxina encapsulada é contínua, sendo maior no início, resultado semelhante com fármacos usados em sistemas de liberação dirigida. Em sistema de liberação controlado de fármaco é necessário que o fármaco seja liberado em grande quantidade no início, entretanto após um determinado tempo deve-se permanecer inalterada a sua concentração tornando a liberação contínua.

O resultado obtido com a toxicidade “in vivo” (DL_{50}) foi semelhante ao apresentado em outros trabalhos que caracterizam a toxina em questão^[16-17, 75]. A dose letal foi de 0,09 mg/g de animal, dessa forma pode-se concluir que a concentração imobilizada de crotoxina no copolímero PEBD-g-PHEMA não será letal, pois encontra-se abaixo do valor considerado tóxico “in vivo”.

O ensaio de administração prolongada demonstra que os animais não sofreram alteração de peso corpórea significativa, como pode ser visto na figura 31. No entanto a curva da crotoxina injetável evidencia a perda de peso deste grupo. O grupo salina elimina a possibilidade do stress das injeções diárias limitando o efeito à ação da toxina.

Quanto ao comportamento pode-se observar que os animais tratados com crotoxina e a salina, via intraperitoneal, tornaram-se um pouco mais agressivos. Entretanto os animais implantados com copolímero (com ou sem crotoxina) permaneceram com o mesmo comportamento, peso e atividade motora preservada durante todo o ensaio. Além disso, no grupo administrado com a microesfera de ctx/PCL e controle não foi detectado alteração no comportamento, peso e movimentos.

Este ensaio, embora preliminar, permite observar que a liberação controlada da crotoxina pode ser uma abordagem promissora para diminuir seus efeitos tóxicos nos tratamentos clínicos.

PEBD-g-PHEMA apresentou biocompatibilidade “in vitro”, observada no teste de citotoxicidade. Esses dados e o da toxicidade “in vivo” reforçam a propriedade de biocompatibilidade destinada ao copolímero desenvolvido. A compatibilidade biológica compete particularmente ao PHEMA presente na superfície de PEBD. De acordo com o trabalho Cífková e col. (1990)^[76], PHEMA aplicado em borracha de

silicone e implantado em tecidos de organismos vivos, apresenta biocompatibilidade semelhante àquela observada em implantes de superfícies de PHEMA puro do trabalho de Almeida^[66].

7 CONCLUSÕES

A crotoxina foi purificada e sua caracterização revelou um grau de pureza não absoluto e que sua atividade permaneceu mesmo após a imobilização. O copolímero foi imobilizado com uma concentração não considerada tóxica, em comparação com os dados obtidos no teste de dose letal, mantendo sua atividade enzimática fosfolipásica.

Na comparação entre as células tumorais e normais de pulmão humano, pôde-se perceber que não há seletividade tumoral ocasionando em morte de células normais na mesma proporção que as tumorais. Dessa forma conclui-se que a crotoxina deve ser utilizada como fármaco anti-tumoral em sistema de liberação, de preferência local, pois esta forma não desencadeará efeitos adversos devido à toxicidade da crotoxina.

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

Após a copolimerização foram observadas as configurações estruturais do PEBD enxertado por espectroscopia no infravermelho (ATR). No perfil espectroscópico do copolímero estavam presentes bandas características do homopolímero PHEMA. Por meio da detecção dos grupos funcionais, característicos de PHEMA, provou-se a presença de HEMA na superfície de PEBD. Dessa forma pode-se comprovar a eficiência do processo de enxertia.

As mudanças superficiais nos copolímeros foram visualizadas por MEV. As micrografias do PEBD mostraram uma superfície lisa enquanto que o copolímero

apresentou superfície rugosa, referente a presença de PHEMA. O copolímero hidrolisado revelou uma superfície levemente rugosa. Este último resultado mostra que a hidrólise não removeu PHEMA da superfície, apenas transformou as ramificações em ácido carboxílico. Conclui-se, portanto, que a enxertia promoveu a aquisição de copolímero de enxerto.

No teste de sorção de água foi visto que a hidrofiliabilidade estava relacionada ao grau de enxertia do copolímero, ou seja, quanto maior era a enxertia maior seria o grau de hidrofiliabilidade. Portanto, a hidrofiliabilidade foi influenciada pela quantidade de PHEMA presente na superfície do copolímero. O coeficiente de difusão mostrou que a afinidade pela água diminui a partir de 30 % de enxertia, independente da temperatura. Dessa forma cuidou-se em fazer-se a imobilização de proteínas em copolímeros com níveis de enxertia menores que 30 %.

No teste de citotoxicidade o copolímero foi provado como não citotóxico, portanto pôde ser considerado como biocompatível e usado como biomaterial.

Como possíveis aplicações futuras, a crotoxina imobilizada no copolímero (PEBD-g-PHEMA-i-ctx) poderia ser empregada na hidrólise dos fosfolípidos presentes nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), do soro humano; pela sua ação catalítica fosfolipásica. Por outro lado, a crotoxina encapsulada nas microesferas de PCL (crotoxina/PCL) poderia ser desenvolvida como sistema de liberação dirigida (local) da crotoxina, destinada à terapia tumoral.

ANEXO 1

Tabela 1. Técnicas principais de obtenção de copolímero de enxerto^[8]

Técnica	Descrição	Vantagem / Desvantagem	Esquema da reação
Preirradiação	O polímero de cadeia principal, P _x , é irradiado na ausência de oxigênio e antes de entrar em contato com o monômero, M _y , que pode estar na forma de líquido ou vapor.	<u>Vantagem:</u> o elétron acelerado pode ser usado para uma linha de operação direta. <u>Desvantagem:</u> o polímero pode ser degradado, reticulado ou ocorrer outra mudança.	$P_x \rightarrow P_x^\bullet + H^\bullet$ $H^\bullet + P_x \rightarrow P_x^\bullet + H_2$ $P_x^\bullet + M_y \rightarrow P_x\text{-}g\text{-}P_y$ (copolímero de enxerto)
Peroxidação	Polímero, P _x , é irradiado na presença de oxigênio para induzir a produção de hidroperóxidos. <i>Também é um processo de preirradiação.</i>	<u>Vantagem:</u> não há a necessidade de um gás inerte durante a radiação. <u>Desvantagem:</u> degradação do polímero por causa da presença de oxigênio.	$P_x \rightarrow P_xO_2^\bullet \rightarrow P_xOOH$ $\rightarrow P_xO^\bullet + HO^\bullet$ $P_xO^\bullet + M_y \rightarrow P_xOM_y^\bullet$ (copolímero de enxerto) $^\bullet OH + M_y \rightarrow HOM_y^\bullet$ (homopolímero)
Irradiação simultânea	Polímero é irradiado com a presença ou ausência de oxigênio, sendo esta última a melhor condição, juntamente com o monômero (vapor, líquido ou em solução). <i>Ocasiona na formação de radicais livres ativos no polímero e monômero que levam a obtenção do copolímero de enxerto.</i>	<u>Vantagem:</u> Técnica mais eficiente de enxertia. <u>Desvantagem:</u> aumento na produção do homopolímero. Possui limitações	$P_x \rightarrow P_x^\bullet, M_y \rightarrow M_y^\bullet$ $P_x^\bullet + M_y \rightarrow P_xM_y^\bullet$ (copolímero de enxerto) $M_y^\bullet + P_x \rightarrow P_xM_y^\bullet$ (copolímero de enxerto) $M_y^\bullet + M_y \rightarrow M_yM_y^\bullet$ (homopolímero)

ANEXO 2

Tabela 2 – Esquema da Organização internacional para padronização (ISO) 10.993, referente à avaliação biológica de dispositivos médicos^[13]

Parte	Descrição
1	Guia de seleção de testes.
2	Requisitos de bem-estar dos animais de laboratório.
3	Testes para genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva.
4	Seleções de testes para interações com sangue.
5	Teste de citotoxicidade: testes “in vitro”.
6	Testes para efeitos locais após implantação.
7	Resíduos de esterilização por óxido de etileno.
8	Investigação clínica.
9	Degradação de materiais relacionados aos testes biológicos.
10	Testes para irritação e sensibilização.
11	Testes para toxicidade sistêmica.
12	Preparação das amostras comuns e de referência.

ANEXO 3

Tabela 3. Orientação para testes de avaliação inicial do biomaterial^[13]

Categoria dos dispositivos		Efeito biológico							
Local de contato	<i>Duração do contato</i> A = até 24 horas B = 1-30 dias C > 30 dias	Citotoxicidade	Sensibilização	Irritação ou reatividade intracutânea	Toxicidade sistêmica (aguda)	Toxicidade sub-crônica (toxicidade sub-aguda)	Genotoxicidade	Implantação	Hemocompatibilidade
Superfície	Pele	A	X	X	X				
		B	X	X	X				
		C	X	X	X				
	Membranas de mucosas	A	X	X	X				
		B	X	X	X				
		C	X	X	X		X	X	
	Superfícies comprometidas ou lesadas	A	X	X	X				
		B	X	X	X				
		C	X	X	X		X	X	
Comunicação externa	Passagem direta do sangue	A	X	X	X	X			X
		B	X	X	X	X			X
		C	X	X		X	X	X	X
	Tecido / osso / dente	A	X	X	X				
		B	X	X			X	X	
		C	X	X			X	X	
	Circulação sanguínea	A	X	X	X	X			X
		B	X	X	X	X		X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X
Implante	Tecido / osso	A	X	X	X				
		B	X	X			X	X	
		C	X	X			X	X	
	Sangue	A	X	X	X	X		X	X
		B	X	X	X	X		X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X

ANEXO 4

MATERIAIS

A. PRINCIPAIS REAGENTES

- HEMA (metacrilato de 2-hidroxietila) - Grau de pureza: Para uso em laboratório - Sigma[®] Chemical Co-Germany.
- Etanol (álcool etílico) - Grau de pureza: Absoluto - Merck
- Metanol (álcool metílico) - Grau de pureza: P.A. - Reagentes analíticos– CAAL.
- Hidróxido de sódio (NaOH) - Grau P.A. - Merck
- Ácido clorídrico (HCl) - Grau P.A. - Merck
- Meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) - Gibco[®]
- Tripsina – Sigma[®]
- Soro fetal bovino – Gibco[®]
- EDTA – Sigma[®]
- Antibiótico (Penicilina 10.000 UI/mL e estreptomicina 10 mg/mL) - Cultilab[®]
- Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) – Carlo Erba[®]
- Vermelho de fenol (Phenol red) – Gibco[®]
- MTS (Corante vital) – Promega[®]
(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólico).
- PMS (Agente acoplador de elétrons) – Promega[®]
(fenazina metasulfato)

B. EQUIPAMENTOS

- Espectroscópio em infra-vermelho - Modelo: MB-Series - Bomem
- Microscópio eletrônico de varredura – Philips - Modelo: XL30
- FPLC – Pharmacia
- Espectrofotômetro UV/Visível - Pharmacia Biotech - Ultrospec III[®]

C. SOLUÇÕES PREPARADAS

- Tampão de resolução
Tris base (1,5 M) _____ 18,17 g
Água destilada _____ qsp 100 mL
pH 8,8 (titular com HCl)
- Tampão de empilhamento
Tris base (0,5 M) _____ 6,06 g
Água destilada _____ qsp 100 mL
pH 6,8 (titular com HCl)
- Tampão Tris-HCl 0,08 M
Tris base _____ 0,969 g
HCl 0,1 M pH 8,1
Água destilada _____ qsp 100 mL
- Tampão de amostra (5 x concentrado)
Tris-HCl 0,08 M
SDS _____ 2 %
Glicerol _____ 10 %
Azul de bromofenol _____ 0,001 %
- Tampão de corrida
Tris base _____ 3 g
Glicina _____ 14,4 g
SDS 20 % _____ 5 mL
Água destilada _____ qsp 1 L
- Solução corante
Comassie Blue R250 _____ 1 g
Metanol P.A. _____ 450 mL
Ácido acético glacial _____ 100 mL
Água destilada _____ qsp 1 L
Filtra a solução.
- Solução descorante
Ácido acético glacial P.A. _____ 5 %
Metanol P.A. _____ 10 %
Água destilada _____ qsp 1 L

- Solução de secagem

Solução descorante _____ 450 mL

Glicerol _____ 50 mL

- Acrilamida Bis 30 %

Acrilamida _____ 29,2 g

Acrilamida-Bis _____ 0,8 g

Água destilada _____ qsp 100 mL

- Gel de resolução (12 %)

Acrilamida-Bis (30 %) _____ 6 mL

Tampão de resolução _____ 3,75 mL

SDS (10 %) _____ 150 µL

PA (10 %) _____ 50 µL

TEMED _____ 25 µL

Água destilada _____ qsp 15 mL

- Gel de empilhamento (4 %)

Acrilamida-Bis (30 %) _____ 2 mL

Tampão de empilhamento _____ 3,75 mL

SDS (10%) _____ 150 µL

PA (10 %) _____ 50 µL

TEMED _____ 25 µL

Água destilada _____ qsp 15 mL

- Tripsina

Solução 1

Tripsina _____ 0,5 g

PBS (10 x concentrado) _____ 50 mL

Água Milli Q _____ qsp 400 mL

Adicionar vermelho de fenol (Phenol red) _____ 0,3 mL

Solução 2

EDTA _____ 0,2 g

PBS (10 x concentrado) _____ 50 mL

Água Milli Q _____ qsp 400 mL

Adicionar vermelho de fenol _____ 0,3 mL

Juntar as duas soluções e acertar o pH para 7,4. Adicionar 2 mL de glicose a 50 %, completar para 1 L com água Milli Q. Filtrar e armazenar a -20 °C.

- Meio de cultura RPMI (sem soro fetal bovino)

RPMI em pó _____ 1 pacote

Bicarbonato de sódio _____ 2 g

Água Milli Q _____ qsp 1 L

pH 7,2 (titular com NaOH)

Filtrar e armazenar em geladeira.

- Meio de cultura RPMI (com soro fetal bovino)

Soro fetal bovino _____ 10 %

Antibiótico _____ 1 %

L-glutamina _____ 1 %

Meio RPMI preparado _____ qsp 500 mL

Filtrar e armazenar em geladeira.

ANEXO 5

Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida. 1 → A: cuba de eletroforese, B: , C: placa de cerâmica (alumina), D: placa de vidro, E: espessadores, D: pente.

2 → Esquema do procedimento da eletroforese em gel de poliacrilamida

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMARGO, A.C.M, The Sweet Side of Venom - Center for Applied Toxinology. ***Drug Discovery Technology***, p. 1-4, 2004.
2. DEKKER, M., ***Rattlesnake Venoms – Their Actions and treatment***, 1 ed., USA, N.Y.: Dekker, p. 5, 86, 1982.
3. FRAENKEL-CONRAT, H.L.; SLOTTA, C.H., Purificação e cristalização do veneno da cobra Cascavel. ***Memórias do Instituto Butantan***, v. 12, 505-512, 1938.
4. FRAENKEL-CONRAT, H.; SINGER, B., Fractionation and Composition of Crotoxin. ***Arch. Of Biochem. And Biophys.***, v. 60, p.64-73, 1956.
5. CORIN, R.E.; VISKATIS, L.J.; VIDAL, J.C.; ETCHEVERRY, M.A., Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells *in vitro*. ***Invest. New Drugs***, v. 11 (1), p. 11-15, 1993.
6. RUDD, C.J.; VISKATIS, L.J.; VIDAL, J.C.; ETCHEVERRY, M.A., *In vitro* comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumors and a normal human epidermal keratinocyte cell line, ***Investigational New Drugs***, v. 12, p.183-184, 1994.
7. CURA, J.E; BLANZACO, D.P.; BRISSON, C.; CURA, M.A.; CABROL, R.; LARRATEGUY, L.; MENDEZ, C.; SECHI, J.C.; SILVEIRA, J.S.; THEILLER, E.;ROODT, A.R.; VIDAL, J.C, Phase I and Pharmacokinetics Study of Crotoxin (Cytotoxic PLA₂, NSC-624244) in Patients with Advanced Cancer. ***Clinical Cancer Res.***, v. 8, p. 1033-1041, 2002.
8. RODAS, A.C.D, ***Utilização da radiação ionizante na obtenção de suportes poliméricos para imobilização de enzimas com potencial de uso clínico.***

1997. Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
9. MARTELLINI, F, **Matrizes poliméricas obtidas mediante radiação ionizante para a sua utilização como sistemas de liberação controlada de fármacos**. 1998. Tese (doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
10. RAMAKRISHNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, K.W., Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, p. 1189-1224, 2001.
11. RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMOS, J.E., **Biomaterials Science – An introduction to Materials in Medicine**, 1 ed., USA, N.Y.: Academic Press, p. 1, 11-12, 14, 21-33, 37, 50-51, 57, 59, 60-67, 125-129, 283, 346-355, 1996.
12. WILLIAMS, D.F, **Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials**, Chester, England, March 3-5, 1986. Amsterdam: Elsevier, 1987, p. 38 (progress in biomedical engineering, 4).
13. ISO document 10993-1, **Biological evaluation of medical devices – Guidance on selection of testes**, Part 1, 1992.
14. AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V.; KRUGGEL, W.G, A complete Amino Acid Sequence for the Basic Subunit of Crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 249 (2), p.296-300, 1986.
15. AIRD, S.D.; YATES, J.R.; MARTINO, P.A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F.; KAISER, I.I, The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1040 (2), p.217-224, 1990.

16. NASCIMENTO, N., **Caracterização Bioquímica e Imunológica dos principais produtos gerados pela irradiação de crotoxina**, 1995, Tese (doutorado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
17. MURATA, Y., **Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus***, 1988, Dissertação (mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
18. SILVA, J.A.A., **Aspectos estruturais e de atividade biológica da gioxina (enzima trombina símile) do veneno da cascavel brasileira, *Crotalus durissus terrificus***, 2004, Dissertação (mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
19. DONATO, N.J.; MARTIN, C.A.; PEREZ, M.; NEWMAN R.A.; VIDAL, J.C.; ETCHERVERRY, M., Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Activity by Crotoxin, a Snake Venom Phospholipase A₂ Toxin. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 1535-1543, 1996.
20. BALDI, A.; MORDOH, J.; MEDRANO, E.E.; BONAPARTE, Y.P.; LUSTIG, E.S.; RUMI, L., Informe especial. Estudios tendientes a determinar las posibles propiedades antitumorales del veneno de cobra y del complejo crotoxina A y B. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 48, p. 337-344, 1988.
21. SHEN, Z.; CHO, W., Highly efficient immobilization of phospholipase A₂ and its biomedical applications. **J. Lipid Resid.**, v. 36, n. 5, p. 1147-1151, 1995.
22. TEKE, M.; ONAL, S.; KILINC, A.; TELEFONCU, A., Immobilization of phospholipase A₂ on porous glass and its application for lowering serum cholesterol concentration. **Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.**, v. 31, n. 4, p. 467-478, 2003.

23. RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S. In: Hidrogels for medical and related applications, ANDRADE, J.D., **ACS Symposium**, série 31, Washington D.C., 1976.
24. BEDOWS, C.G.; GUTHRIE, J.T., The immobilization of enzymes onto hydrolyzed polyethylene-g-co-2-HEMA. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 35, p.135-144, 1988.
25. ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr., L.V., **Farmacotécnica – Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**, 6 ed., São Paulo, SP: Premier, p.236-245, 2000.
26. ROGERO, S.O.; LORENZETTI, S.G.; CHIN, G.; LUGÃO, A.B., Hidrogel de poli(1-vinil-2-pirrolidona) (PVP) como matriz polimérica para sistema de liberação de fármaco. **Revista Bras. de Pesq. e Desenv.**, v. 4, n. 3, p. 1447-1449, 2002.
27. NEWMAN, R.A.; VIDAL, J.C.; VISKATIS L.J.; JOHNSON, J.; ETCHEVERRY, M.A., VRCTC-310. A novel compound of purified animal toxins separates antitumor efficacy from neurotoxicity. **Invest New Drugs**, v. 11, p. 151-159, 1993.
28. RINGSDORF, H., Synthetic Polymeric Drugs. In KOSTELNIK, R.J., **Polymeric delivery systems**, New York, N.Y.: Gordon and Breach Science, p.197-223, 1978.
29. EDELMAN, E.R.; LINHARDT, R.J.; BOBECK, H.; KOST, J.; ROSEN, H.B.; LANGER, R., Polymer based drug delivery: magnetically modulated and bioerodible systems. In: SHALABY, S.W.; HOFFMAN, A.S.; RATNER, B.D.; HORBETT, T.A., **Polymers as biomaterials**, New York, N.Y.: Plenum Press, p. 279-292, 1984.
30. HOFFMAN, A.S., Application of synthetic polymers biomaterials in medicine and biotechnology. In: PHKINE, HOFFMAN, A.S., **Polymers biomaterials**, Nato ASI Series, 1986, p.1-14.

31. FERRUTI, P.; SCAPINI, G.C.; RUSCONI, L.; TANZI, M.C., New polymeric and oligomeric matrices as drug carriers. In: CHIELLINI, E.; GIUST, P., ***Polymers in medicine***, New York, N.Y.: Plenum, 1983.
32. SAN ROMÁN, J.; GALLARDO, A., New polymers for biomedical applications: synthesis and characterization of acrylic systems with pharmacological activity. ***Macromol. Symp.***, v. 84, p. 145-158, 1994.
33. SAN ROMÁN, J.; GALLARDO, A.; LEVENFELD, B., Polymeric drug delivery systems. ***Adv. Mater.***, v. 7, n. 2, p. 203-208, 1995.
34. ROSIAK, J.M.; ULANSKI, P.; PAJEWSKI, L.A.; YOSHII, F.; MAKUUCHI, K., Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes-Some remarks and comments. ***Radiat. Phys. Chem.***, v. 46 (2), p.161-168, 1995.
35. SILVA, C.E.R., ***Estudo de blendas potencialmente biodegradáveis de poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e polietileno de baixa densidade (PEBD)***, 2001, Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
36. MANO, E.B; MENDES, L.C., ***Introdução a polímeros***, 2 ed. rev. amp., São Paulo, SP: Edgard Blücher, p. 1-5, 14, 54, 1999.
37. HUNG, L.C., ***Imobilização de resinas de troca iônica em polímeros***, 1994, Dissertação (mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
38. PEPPAS, N.A.; MOYNIHAN, Structure and physical properties of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. In: PEPPAS, N.A., ***Hydrogels in Medicine an Pharmacy – Volume II Polymers***, USA, Florida: CRC Press, p. 50-51, 54, 69-79, 1987.
39. MORRISON, R.T.; BOYD, R.N., ***Organic Chemistry***, 6 ed., USA, N.J.: Prentice Hall, p. 590-597, 1077-1084, 1992.

40. IKADA, Y., Interfacial Bicompatibility. In: SHALABY, S.W.; IKADA, Y.; LANGER, R.; WILLIAMS, J., **Polymers of biological and biomedical significance**, USA, Washington: American Chemical Society, p. 35-47, 1994.
41. WICHTERLE, O.; LIM, D, Hydrophilic gels for biological use. **Nature**, v. 9, p. 117-147, 1960.
42. CHEN, W.K.W.; MESROBIAN, R.B.; BALLANTINE, D.S.; METZ, D.J.; GLINES, A., Studies on graft copolymers derived by ionizing radiation. **J. Polym. Sci.**, v. 23, p.903-913, 1957.
43. CHAPIRO, A, Radiation chemistry of polymeric systems. In: MARK, H.; MARVELL, C.S, **High Polymers**. New York, N.Y.: Interscience, p. 596-691, 743-761, 1962.
44. HOFFMAN, A.S.; HOBERTT, T.A.; RATNER, B.D, Interaction of blood and blood components at hydrogel interfaces. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 283, p. 373-380, 1977.
45. PENICHE, C.; ZALDIVAR, D.; SAN ROMAN, J., Biocompatible hydrogels of controlled hydrophobicity from copolymers of hydroxyethyl methacrilate and furfuryl acrylate, ABPol, v. II, 4-8/Setembro/1994, Gramado, Brasil.
46. SAUNDERS, C.B.; DICKSON, L.W.; SINGH, A., **Gamma and electron beam curing of polymers and composites**, Canada, Canada: Atomic Energy of Canada Limited, p.1-6, 1987.
47. HIGA, O.Z.; KUMAKURA, M., Preparation of polymeric urease discs by an electron beam irradiation technique. **Biomaterials**, v. 18, p.697-700, 1997.
48. De QUEIROZ, A.A.A; FRANÇA, E.J.; ABRAHAM, G.; ROMÁN, J.S., Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone by iodine charge-transfer complex.

- Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics**, v. 40, n. 8, p. 714-722, 2002.
49. De QUEIROZ, A.A.A.; HIGA, O.Z.; ALVES, S.B., Digital image processing for biocompatibility studies of clinical implante materials. **Artificial Organs**, v. 27, n. 5, p. 444-446, 2003.
50. De QUEIROZ, A.A.A.; BARRAK, E.R.; GIL, H.A.C.; HIGA, O.Z., Surface studies of albumin imobilized into PE and PVC films. **J. Biomater. Sci. Polym.**, v. 8 (9), p.667-681, 1997.
51. De QUEIROZ, A.A.A.; VITOLO, M.; OLIVEIRA, R.C.; HIGA, O.Z., Invertase immobilization onto radiation-induced graft copolymerized polyethylene pellets. **Rad. Phys. Chem.**, v. 47 (6), p.873-880, 1996.
52. HSIUE, G.; LEE, S.; WANG, C.C.; CHANG, P.C., The effect of plasma-induced graft copolymerization of pHEMA on silicone rubber towards improving corneal eptelial cells growth. **J. Biomater Sci. Polym.**, v. 5 (3), p. 205-220, 1992.
53. HSIUE, G.; LEE, S.; CHANG, P.C., Surface modification of silicone rubber membrane by plasma induced graft copolymerization as artificial cornea. **Artif. Organs**, v. 20 (11), p. 1196-1207, 1996.
54. LEE, S.; HSIUE, G.; KAO, C.; CHANG, P.C., Artificial cornea: surface modification of silicone rubber membrane by graft polymerization of pHEMA via glow discharge. **Biomaterials**, v. 17 (6), p. 587-595, 1996.
55. OKUNO, E.; CALDAS, I.L.; CHOW, C., **Física para ciências biológicas e biomédicas**, São Paulo, SP: Harper & Row do Brasil, p. 5-7, 1982.
56. LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E., **Caracterização de Polímeros – Determinação de peso molecular e análise térmica**, Rio de Janeiro, RJ: e-papers, p. 13-33, 2001.

57. CORY, A.H., Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Comm.**, v. 3, 207-212, 1991.
58. ISO document 10993-5, **Biological evaluation of medical devices – Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods**, Part 5, 1992.
59. BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
60. LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (London)**, v. 227, p. 680-685, 1970.
61. HOLZER, M., MACKESSY, S.P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 34 (10), p. 1149-1155, 1996.
62. BOREFREUND, E.; PUENER, J.A., "A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90)". **J. Tissue Cult. Meth.**, v. 9 (1), 7-9, 1984.
63. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), **Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms**, Geneva, n. 58, p. 4-44, 1981.
64. CRANK, J., **The mathematics of diffusion**, USA, Oxford: Oxford University Press, 1975.
65. RIBELA, M.T.C.P.; BIANCO, A.C., BARTOLINI, P., The use of recombinant human thyrotropin produced by Chinese Hamster Ovary Cells for the preparation of immunoassay reagents, **J. Clinical Endocrinology and metabolism**, v. 81, n. 1, 1993.

66. ALMEIDA, A.T, **Obtenção de superfícies hemocompatíveis por meio da modificação de materiais poliméricos pela radiação ionizante**, 2000, Dissertação (mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
67. STANNETT, V.T, Radiation Grafting - state-of-the-art. **Radiat. Phys. Chem.**, v.35, n. 1-3, p. 82-87, 1990.
68. XUE, T.J.; WILKIE, C.A, The interaction of vinyl monomers and poly(ethylene-terephthalate) in the presence of various initiators produces a physical mixture, not a graft copolymer. **J. Polym. Sci. Part A – Polym. Chem.**, v. 33 (16), p. 2753-2758, 1995.
69. RATNER, B.D. Biomedical applications of synthetic polymers. In: ALLEN, G.; BEVINGTON, J, **Comprehensive polymer science**, USA, N.Y.: Pergamon, p. 201-247, 1989.
70. RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; HANSON, S.R.; HARKER, L.A.; WHIFFEN, J.D., Blood-compatibility-water-content relationships for radiation-grafted hydrogels. **J. Polym. Sci.: Polym.Symp.**, v. 66, p.363-375, 1979.
71. RAZZAK, M.T, **Radiation Grafting Studies on the Modification of Fluoropolymers and Natural Rubber for Biomaterials**, 1988, Tese (Doutorado) – Department of Nuclear Engineering, Faculty of Engineering, University of Tokyo, p. 287, Tokyo.
72. BERSET, C, Enzimas imobilizadas. In: SCRIBAN, **R. Biotecnologia**. São Paulo, SP: Manole, p. 221-237, 1985.
73. HARTMEIER, W, **Immobilized biocatalysts – an introduction**, Berlin, Berlin: Springer-Verlag, p.212, 1988.

74. GACESA, P.; HUBBLE, J. **Tecnologia de lãs enzimas**, Zaragoza, Zaragoza: Ascribia, p. 94-95, 1990.
75. SAMPAIO, S.C., **Mecanismos envolvidos no efeito inibitório do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a fagocitose por macrófagos**, 2004, Tese (doutorado), Instituto Butantan, São Paulo.
76. CIFKOVÁ, I.; LOPOUR, P.; VONDRÁČEK, P.; JELÍNEK, F, Silicone rubber-hydrogel composites as polymeric biomaterials. I-Biological properties of the silicone rubber-p(HEMA) composite. **Biomaterials**, v. 11, p. 393-396, 1990.