



ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS E PROPRIEDADES ANTI-TROMBOGENICAS DE FILMES DE ALGINATO

L. D. Lima¹; C. S. Campelo¹; L. M. Rebelo²; R. S. Vieira^{1,3}

1 - Grupo de Pesquisas em Separação por Adsorção - Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, CE – Brasil

2 – Departamento de Física – Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, CE – Brasil

3 – Campus Universitário do Pici, Bl. 709 – CEP: 60455-760 – Fortaleza, CE – Brasil

Telefone: (85) 3366-9611 – Email: rodrigo@gpsa.ufc.br

RESUMO: Alginato é um biopolímero extraído da matriz intracelular de algas marrons. Nesse estudo pretende-se avaliar propriedades adsorptivas e anti-trombogênicas de filmes de alginato, para que possam possivelmente ser utilizados em dispositivos biomédicos que tenham contato com sangue. Os filmes de alginato foram preparados, reticulados com cloreto de cálcio, e avaliados quanto a adsorção de proteínas (BSA e fibrinogênio) em pH fisiológico. Plasma humano foi colocado em contato com os filmes e avaliou-se a adesão plaquetária (ocorrência de formação de trombos na superfície dos filmes) utilizando microscopia de força atômica (AFM). Contatou-se, analisando as imagens de microscopia feitas no ensaio de adesão plaquetária, a formação de trombos e conclui-se que o alginato apresenta atividade trombogênica considerável, apesar de possuir baixa capacidade de adsorção de BSA e fibrinogênio.

PALAVRAS-CHAVE: alginato, adsorção de proteínas, trombogenicidade, adesão plaquetária. AFM.

ABSTRACT: Alginate is a biopolymer extracted from brown algae intracellular matrix. This study aims to assess adsorptive properties and anti-thrombogenic alginate films so that they can possibly be used in biomedical devices that have contact with blood. The alginate films were prepared, crosslinked with calcium chloride, and evaluated for the adsorption of proteins (BSA and fibrinogen) at physiological pH. Human plasma was placed in contact with the films and evaluated the platelet adhesion (occurrence of thrombus formation on the surface of the films) using atomic force microscopy (AFM). It was observed, analyzing the microscopy images made in the platelet adhesion assay, the formation of thrombus and it was concluded that the alginate exhibits significant thrombogenic activity, despite having low adsorption capacity for BSA and fibrinogen.

KEYWORDS: alginate, protein adsorption, thrombogenicity, platelet adhesion, AFM.

1. INTRODUÇÃO

O alginato, ou ácido algínico, é um polímero de origem natural extraído da matriz intracelular das algas marrons, onde possui função estrutural, garantindo flexibilidade e resistência mecânica. O alginato de sódio, sal oriundo do tratamento do alginato com carbonato de sódio, é um polímero aniônico de grande interesse em várias indústrias, como alimentícia, cosmética e biotecnológica.

De acordo com Siddhesh *et al* (2012) esse biopolímero possui capacidade de formar filmes mecanicamente resistentes, embora possuam natureza hidrofílica, devido aos grupos hidroxila presentes na sua estrutura, como pode-se observar na Figura 1. Por isso o biopolímero é submetido a modificações químicas para alteração de propriedades existentes. No caso da solubilidade desses filmes em água a modificação é feita através da reticulação do biopolímero com cloreto de cálcio, que pode ser feita internamente (ainda no



preparo da solução do alginato, verificando a formação de gel) ou externamente (submetendo os filmes a um banho com solução de cloreto de cálcio após secagem).

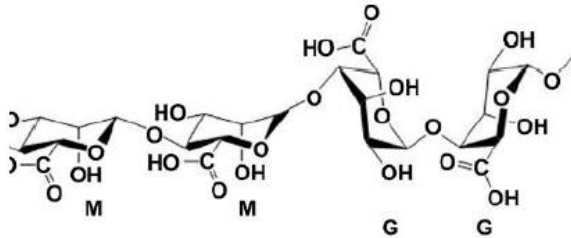


Figura 1. Estrutura do alginato.

Atualmente vários biopolímeros têm sido estudados para aplicações biomédicas que envolvem contato com o sangue, o que pode gerar adsorção de proteínas e células. O primeiro passo para a coagulação sanguínea é a adsorção de proteínas globulares. Segundo Keuren *et al* (2003), esse fenômeno pode ser um problema, pois, dependendo da natureza de cada proteína, é possível ocorrer a formação de trombos, oriundos da seguinte seqüência de eventos: adesão plaquetária, ativação plaquetária e início da coagulação. Desse modo é importante ter conhecimento das propriedades trombogênicas dos biopolímeros.

O polímero mais utilizado em aplicações que envolvem contato com o sangue como anticoagulante terapêutico é a heparina, pois possui baixa atividade trombogênica. Essa propriedade deve-se à capacidade da heparina de adsorção da antitrombina, proteína da família das serinas que possui ação inibidora no processo de coagulação, pois limita a atividade de enzimas livres, evitando a formação de trombos. De acordo com Björn (2000), a antitrombina sozinha não possui uma atividade anticoagulante muito eficiente, mas ao formar complexo com a heparina sua propriedade antitrombogênica é aumentada, inativando agentes da coagulação sanguínea, como a trombina, que é um dos fatores principais da coagulação, sendo responsável pela ativação de plaquetas e pela conversão de fibrinogênio em rede de fibrina, e o fator Xa, responsável pela ligação entre diferentes plaquetas ativadas.

Estudos têm sido desenvolvidos para substituição do uso da heparina, originada de fonte animais, o que acarreta riscos de contaminação com agentes patogênicos. Assim para viabilizar seu uso é necessário que a heparina passe por

processos mais refinados de purificação, tornando a sua produção excessivamente cara. O alginato, como citado anteriormente, é extraído de algas, o que diminui o risco de contaminações, por consequência necessita de menos etapas de purificação, originando um produto com menor custo de produção e por isso é um biopolímero promissor, embora seja necessário avaliar suas propriedades anti-trombogênicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Alginato de sódio da marca Dinâmica (Brasil), cloreto de cálcio, fosfato de potássio monobásico, hidróxido de sódio, glicerol, TRIS, ácido clorídrico todos da marca Vetec (Brasil), albumina bovina da marca INLAB (Brasil) e fibrinogênio da marca Sigma (EUA). Todos os reagentes foram obtidos em grau analítico.

2.3. Preparação dos filmes de alginato

Preparou-se a solução adicionando-se lentamente 2 g de alginato de sódio a 100 ml de água destilada contendo 1,2 g de glicerol. A mistura foi feita em um agitador magnético até que a solução se tornasse homogênea. Posteriormente, adicionou-se uma solução de CaCl_2 0,01 M até atingir a taxa de 0,04 g de CaCl_2 /g de biopolímero, na vazão de 1 mL/min, durante 30 minutos, mantendo a agitação intensa com agitador mecânico para evitar a formação de bolhas de gel (reticulação por método interno). A solução foi colocada em placas de petri de vidro, ficando em repouso por 24 h. Após esse período, foram levadas para a estufa por cerca de cinco horas, a 65 °C para secagem. Depois de secos, os filmes foram postos em uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 1,5 M, onde permaneceram por 24 h para reticulação por difusão (método externo). Em seguida, foram retirados da solução, lavados com água destilada, transferidos para placas de plástico e levados para o dessecador, para secagem final.

2.4. Ensaio de equilíbrio de adsorção

O ensaio de equilíbrio de adsorção foi feito cortando-se pequenos pedaços dos filmes de alginato (20 mm x 5 mm) que foram colocados na solução proteica de BSA ou fibrinogênio. Essa solução foi preparada em tampão fosfato, de concentração 0,25 M, ajustado com hidróxido de sódio até atingir o pH 7,4. A concentração teórica



de proteína foi de 1,0 mg/mL. A proteína foi deixada em repouso até completa dissolução, para evitar desnaturação. Quando a solução se tornou homogênea, 3 mL da mesma foi transferida para um tubo de ensaio de plástico pequeno, onde foi colocado o filme. Os tubos foram levados para o agitador rotatório por duas horas, em agitação branda (16 rotações por minuto). Depois, o filme foi retirado da solução e efetuou-se a leitura da concentração da proteína restante através do uso de um espectrofotômetro, ajustado no comprimento de onda de 280 nm, verificando a absorvância e relacionando com a concentração através da curva de calibração. A quantidade de proteína adsorvida pelo filme foi calculada através da Equação 01:

$$q = (C_0 - C_f) \frac{Vol}{Área} = \text{mg/cm}^2 \quad (01)$$

Onde:

q = quantidade de proteína adsorvida (mg/cm²)

C₀ = concentração inicial de proteína (mg/mL)

C_f = concentração final de proteína (mg/mL)

Vol = volume de cada experimento (3 mL)

Área = área superficial dos filmes (100 mm²)

2.5. Ensaios de adesão plaquetária

2.5.1. Coleta de sangue: As amostras de sangue foram coletadas em tubos Vacuette, da marca Greiner Bio-One (São Paulo, Brasil) que usam uma solução de citrato de sódio 0,109M / 3,2% como agente anticoagulante.

2.5.2. Adesão plaquetária: Após coletado, o sangue foi transferido para tubo Falcon. O procedimento foi feito em duplicata. As amostras de sangue coletadas foram incubadas com solução de mepacrina sob agitação suave de 50 rpm a 37°C durante 15 minutos. Depois do ensaio, lavou-se as amostras com tampão TRIS de pH 7,4 (preparado misturando 31,25 mL de solução de TRIS, de concentração 0,04 M e 26 mL de solução de HCl de concentração 0,36 M, completando com água destilada até atingir volume final de 250 ml) para retirada das plaquetas não aderidas. As amostras foram acondicionadas em placas de Petri.

2.5.3. Microscopia de força atômica (AFM): Os filmes foram cortados em quadrados de aproximadamente 10 mm de lado, e fixados no porta amostra do equipamento com o auxílio de

fitas duplas. O equipamento utilizado foi um Nanoscope Multimode IIIa (Bruker), no modo contato. A sonda utilizada possui constante de mola de 0,57N/m (modelo OTR8, Bruker). As imagens foram adquiridas em ar e temperatura ambiente. A taxa de varredura foi de 1Hz, e as imagens possuem resolução de 512 x 512 linhas (resolução máxima do equipamento). Foram obtidas imagens de altura e deflexão.

3. Resultados e Discussão

3.1. Ensaio de Equilíbrio de adsorção

As proteínas utilizadas nos ensaios foram escolhidas devido a abundância das mesmas no plasma humano, ressaltando que a albumina bovina simula a albumina humana. Segundo Thiane *et al* (2013), essas proteínas variam em tamanho e em cargas elétricas, mudando de acordo com as condições dos experimentos. O fibrinogênio é uma proteína grande, possuindo conseqüentemente pouca mobilidade, e possui também densidade de cargas negativas menor que a BSA no pH do ensaio. Esses fatores indicam que a BSA apresentaria maior repulsão à superfície dos filmes. Entretanto, nos experimentos percebeu-se que a quantidade de BSA adsorvida pelos filmes foi maior do que a quantidade de fibrinogênio adsorvida. Isso pode ter ocorrido devido à modificação da superfície dos filmes através do crosslinking com cloreto de cálcio, o que pode ter deixado a superfície com certa densidade de cargas positivas, gerando uma maior afinidade da proteína BSA. É possível perceber que o alginato apresenta baixa adsorção de proteínas, o que é importante, já que este é o passo inicial do processo de coagulação sanguínea e conseqüente formação de trombos, como já explicitado anteriormente.

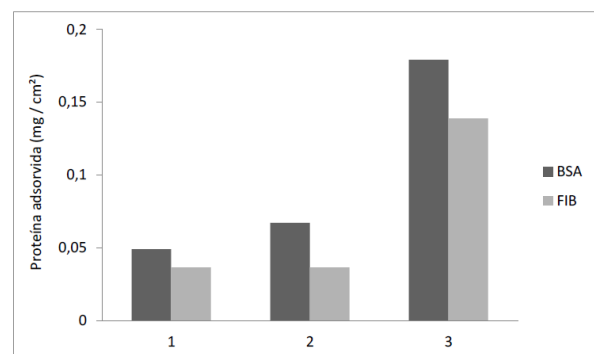


Figura 2. Equilíbrio de adsorção de proteínas (BSA e fibrinogênio).



3.2. Ensaio de adesão plaquetária

O sangue após o ensaio apresentava-se coagulado, o que era indicativo de que o filme de alginato possui alta trombogenicidade, apesar de não adsorver grande quantidade de BSA e de fibrinogênio. Isso acontece por que o complexo formado entre a antitrombina e o alginato na adsorção não é tão forte quanto o complexo formado entre a heparina e a antitrombina. Esse resultado foi confirmado no estudo de Jeffrey *et al* (2003). Confirmou-se então a atividade trombogênica do polímero.

3.2.2. Microscopia de força atômica (AFM):

Usualmente, para observação e análise de material nesse tipo de ensaio, utiliza-se técnicas de microscopia eletrônica de varredura, porém a preparação das superfícies para análise não garantiria a viabilidade das células. Diante disso, e como foi mostrado nos estudos de Karagkiozaki *et al* (2008), a microscopia de força atômica foi escolhida para avaliar se houve modificação na superfície dos filmes gerada por formação de trombos após o teste de adesão plaquetária, já que essa técnica permite a obtenção de imagens de alta resolução, tornando possível a análise sem causar grandes danos às células. Estudando as diferenças existentes entre as Figuras 3 e 4 percebe-se que a altura da superfície sofreu considerável modificação após o teste.

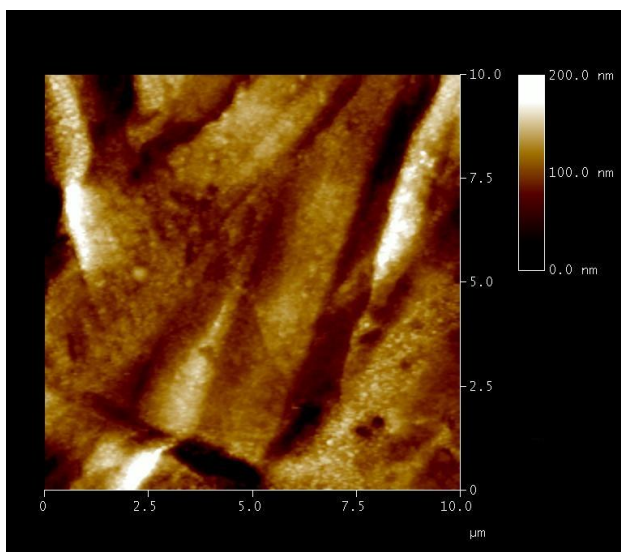


Figura 3. Topografia do filme de alginato sem contato sem sangue.

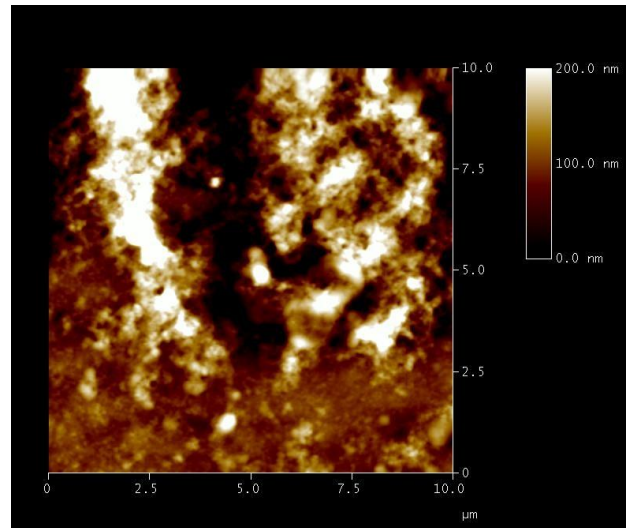


Figura 4. Topografia do filme de alginato após contato com sangue.

O alginato sem contato com o sangue possuía a maior parte da superfície por volta de 100 nm. Após o teste, percebeu-se que a maior parte da superfície do alginato passava a possuir uma altura de 200 nm, o que pode ser indicativo de deposição de material biológico. Essa diferença pode ser melhor observada pelas imagens de topografia 3D, nas Figuras 5 e 6. Nas imagens de deflexão percebeu-se que, após o teste, houve formação de estruturas na superfície que possuíam características de trombos, evidenciando que pode ter ocorrido adesão de plaquetas e que algumas passaram pelo processo de ativação, resultando em deposição de tecido sanguíneo, confirmando a trombogenicidade do filme de alginato, isso pode ser observado nas Figuras 7 e 8.

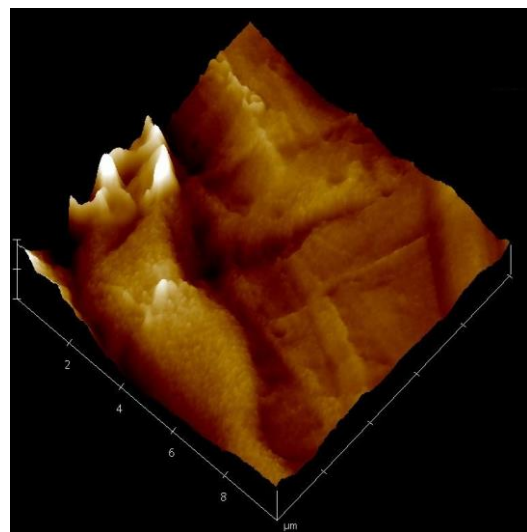


Figura 5. Topografia 3D do filme de alginato sem contato com sangue.

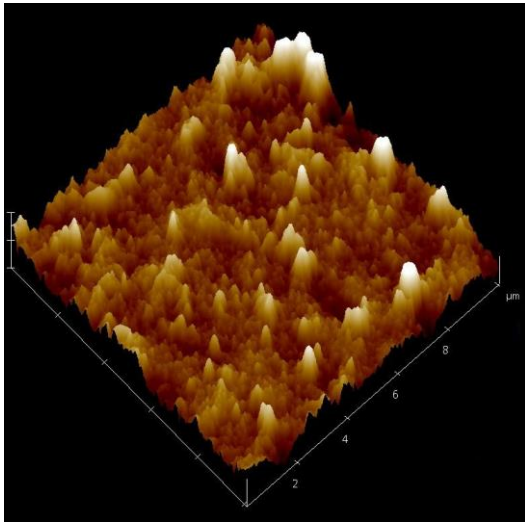


Figura 6. Topografia 3D do filme de alginato após contato com sangue.

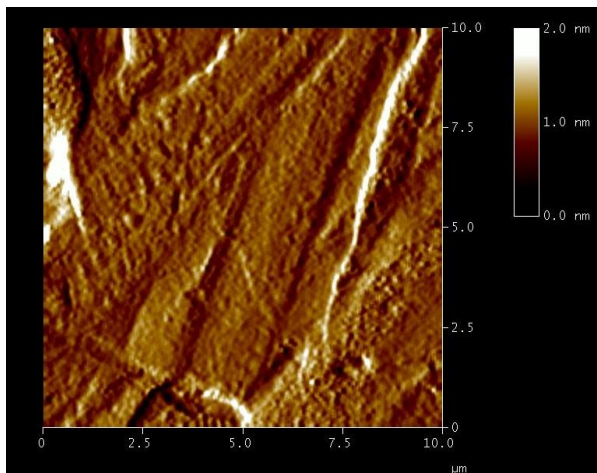


Figura 7. Deflexão do filme de alginato sem contato com sangue.

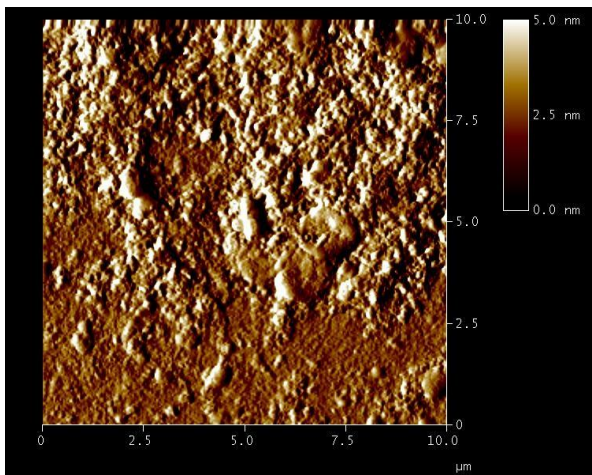


Figura 8. Deflexão do filme de alginato após contato com sangue.

4. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, percebeu-se que o alginato possui baixa adsorção de proteínas globulares, como BSA e fibrinogênio, mas possui uma atividade trombogênica considerável, já que não apresenta alta capacidade de adsorção de antitrombina, como a heparina, o que não gera a neutralização de importantes fatores de coagulação sanguínea, como a trombina e o fator Xa. Pelos resultados da microscopia de força atômica, foi possível avaliar a adesão plaquetária na superfície dos filmes de alginato, verificando que ocorre deposição de material biológico e formação de trombos, confirmando a atividade trombogênica do biopolímero. Diante de tudo o que foi explicitado, para que o alginato seja usado como substituto da heparina é necessário desenvolver métodos de modificação das propriedades desse biopolímero, a fim de diminuir a sua atividade trombogênica.

6. REFERÊNCIAS

CARNEIRO, T. N.; NOVAES; D. S.; RABELO, R. B.; CELEBI B.; CHEVALLIER P.; MANTOVANI D.; BEPPU M. M.; VIEIRA R. S. BSA and Fibrinogen Adsorption on Chitosan/k-Carrageenan Polyelectrolyte Complexes. **Macromolecular Bioscience**, v. 13, p. 1072–1083, 2013.

DAHLBÄCK, B. Blood coagulation. **The Lancet** v. 355, p. 1627 – 1632, 2000.

KEUREN, J. F. W.; WIELDERS, S. J. H.; WILLEMS, G. M.; MORRA, M.; CAHALAN, L.; CAHALAN, P.; LINDHOUT, T. Trombogenicity of polysaccharide-coated surfaces. **Biomaterials** v. 24, p. 1917–1924, 2003.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginato derivatization: A review of chemistry, properties and applications. **Biomaterials**. v. 33, p. 3279–3305, 2012.

KARAGKIOZAKI, V.; LOGOTHETIDIS, S.; LASKARAKIS, A.; GIANNOGLOU, G.; LOUSINIAN, S. AFM study of the thrombogenicity of carbon-based coatings for cardiovascular applications. **Materials Science and Engineering B** v. 152, p. 16 – 21, 2008.