

ENXERTIA DO ÁCIDO ACRÍLICO (AA) EM POLIETILENO (PE) E POLIPROPILENO (PP) PARA IMOBILIZAÇÃO DA UREASE

Andrea C. D. Rodas, Mônica Taoda, Olga Z. Higa
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP)
Travessa R, 400-Cidade Universitária-USP-SP
E-mail: arodas@net.ipen.br

COLEÇÃO PTC
DEVOLVER AO BALCÃO DE EMPRÉSTIMO

RESUMO

Grânulos de polietileno (PE) e polipropileno (PP) foram superficialmente modificados pela enxertia de ácido acrílico (AA) utilizando-se a técnica da irradiação simultânea de uma fonte de raios gama (^{60}Co), para formar copolímeros de enxerto. Os grupos químicos dos copolímeros, característica esta fornecida pelo AA enxertado, foram ativados para a fixação da enzima por ligação covalente. Diferentes graus de enxertia foram obtidos variando-se a dose e a concentração do monômero, sendo que o máximo conseguido para o PE foi na dose de 9kGy com o AA na concentração de 40% em água e para o PP, na dose de 11kGy com AA na concentração de 36,5% em metanol. Em PE-g-AA, o máximo de eficiência na imobilização da urease ocorreu com 10% de enxertia e para o PP-g-AA, com 2 a 5% de enxertia.

Descritores: Enxertia, ácido acrílico, polietileno, polipropileno, imobilização, urease

ABSTRACT

Pellets of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) were modified by grafting acrylic acid (AA) using the simultaneous irradiation technique in a gamma ray source (^{60}Co), to form graft copolymers. Chemical groups of the copolymers can be activated to fix the enzyme by covalent bound. Different grafting levels were obtained increasing the irradiation dose and monomer concentration. For the PE, at the dose of 9kGy and 40% AA in water, the maximum grafting level was achieved. For the PP, this maximum happened at the dose of 11kGy and 36,5% of AA in methanol. The urease immobilization efficiency occurred with the copolymers of PE-g-AA with 10% grafting and PP-g-AA with 2 to 5% grafting.

Key words: Grafting, acrylic acid, polyethylene, polypropylene, immobilization, urease

INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas, anticorpos, drogas, células etc, sobre ou dentro de materiais processados por radiação tem sido bastante estudada, desde que estes biocomponentes tem um grande potencial de uso em clínica ou laboratório clínico^{1,2}.

Para a obtenção de suportes para imobilização de enzimas, materiais podem ser preparados pela enxertia ("grafting") por irradiação de monômeros hidrofílicos sobre superfícies de materiais poliméricos hidrofóbicos. A extensão e a deposição do enxerto, a composição e o conteúdo de água desses copolímeros enxertados podem ser facilmente variados³.

Grânulos de polietileno (PE) e polipropileno (PP) enxertados com ácido acrílico (AA) apresentam características importantes para a imobilização de enzimas: alta insolubilidade, resistência mecânica, propriedades hidrofílicas e abundância de grupamentos carboxílicos quimicamente ativáveis⁴.

Neste trabalho, para a imobilização da enzima urease, foram estudados inicialmente os parâmetros de enxertia por irradiação do AA sobre os polímeros PE e PP. Os vários níveis de enxertia obtidos foram

correlacionados com a eficiência de imobilização da urease.

MATERIAIS E MÉTODOS DE ANÁLISE

Enxertia do ácido acrílico.

Grânulos de PE e PP, empregados como polímeros base, foram previamente lavados com água e detergente neutro a 10%, água destilada deionizada, acetona e posteriormente submetidos a secagem no dessecador sob vácuo durante uma noite. Monômero ácido acrílico (AA), fornecido pela Dow Chemical foi utilizado sem prévia destilação. Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

Para o processo de enxertia, foram pesados cerca de 5g de PP e PE, e colocados em ampolas de vidro juntamente com soluções de AA. As ampolas foram submetidas ao fluxo de gás nitrogênio por 5 minutos, seladas e expostas a fonte de ^{60}Co As amostras receberam doses de irradiação de 2,0 a 15,0kGy, nas taxas de dose de 0,21kGy/h para o PE e 0,31kGy/h para o PP. O AA foi diluído nas concentrações de 10 a 50% em água para o PE e metanol para o PP.

IPEN / CNEN - SP

BIBLIOTECA
Produção Científica

IPEN-DOC- 4646

Após a reação de enxertia, o homopolímero formado foi extraído por imersão das amostras em metanol, durante 72 horas. Em seguida os grânulos foram lavados com acetona e mantidos no dessecador sob vácuo para secagem até peso constante e armazenamento.

Os níveis de enxertia (E%) dos grânulos foram avaliados conforme a expressão (A):

$$E\% = [(m_f - m_i) / m_i] \times 100 \quad (A)$$

onde: m_f = massa final dos grânulos após enxertia
 m_i = massa inicial dos grânulos antes da enxertia

Imobilização da urease

Para ativação dos suportes poliméricos foi utilizado o método de Coulet⁵.

Grânulos de PE-g-AA, com graus de enxertia de 0 a 14,6% e PP-g-AA, com graus de enxertia de 0 a 17,72%, foram colocados em balões de vidro de fundo redondo, aos quais foram adicionados 30 ml de uma mistura de metanol e ácido sulfúrico concentrado, na proporção de 50:1. Deixou-se os balões em refluxo a 60°C por 3 dias, 8 horas/dia. Em seguida, os grânulos foram lavados com água destilada e deionizada até atingir pH entre 5,0 e 7,0. Transferidos para as ampolas de vidro, foram colocados em contato com solução de hidrazina 4% v/v em água destilada por aproximadamente 3 dias.

A solução de hidrazina foi retirada e os grânulos foram imersos em 35 ml de ácido clorídrico 4M e 2 ml de nitrato de sódio 0,5 M e mantidos sob agitação em banho de gelo por 25 minutos. Em seguida foram lavados com solução de cloreto de sódio 0,1M.

Para a imobilização enzimática, os grânulos foram imersos em solução de enzima a 1mg/ml em cloreto de sódio 0,1M, dentro de ampolas de vidro.

A determinação protéica foi realizada pelo método de Bradford⁶, que envolve a ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 com a proteína, produzindo o máximo da absorção espectrofotométrica a 595 nm. Este método foi utilizado para quantificação da urease.

A cada 24 horas após o contato com a solução enzimática, retirou-se uma alíquota de 500µl de cada apola, para análise da parcela de enzima imobilizada nos grânulos, obtendo-se o coeficiente de imobilização (CI), conforme a expressão (B):

$$CI\% = \frac{Abs\ i - Abs\ f}{Abs\ i} \times 100 \quad (B)$$

onde: Abs i = leitura da absorbância da concentração inicial (1mg/ml)

Abs f = leitura da absorbância da concentração final

Enxertia do ácido acrílico

Os dois parâmetros importantes da técnica de enxertia são mostrados nas figuras 1 e 2.

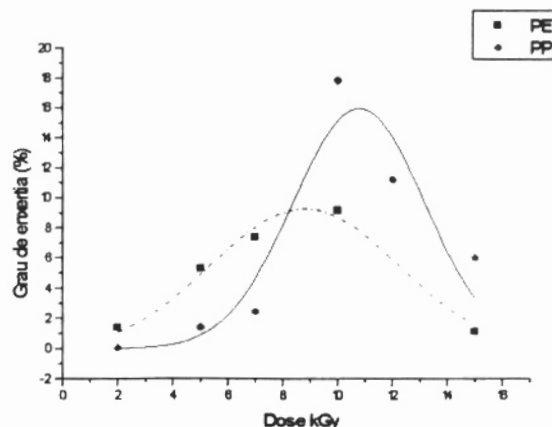


Figura 1-Determinação do grau de enxertia em função da dose de irradiação. PE: taxa de dose=0,21kGy/h, [AA]=30% em metanol; PP: taxa de dose= 0,31kGy/h, [AA]=30% em água.

Na Figura 1 observa-se que um máximo de grau de enxertia foi atingido na dose de irradiação de 9kGy para o PE, e 11kGy para o PP, com uma posterior diminuição para ambos.

Este fenômeno deve ocorrer pela formação de uma grande quantidade de radicais livres do AA em solução quando se aumenta a dose de irradiação, o que leva à rápida formação de homopolímero de AA, prejudicando o processo de enxertia⁷.

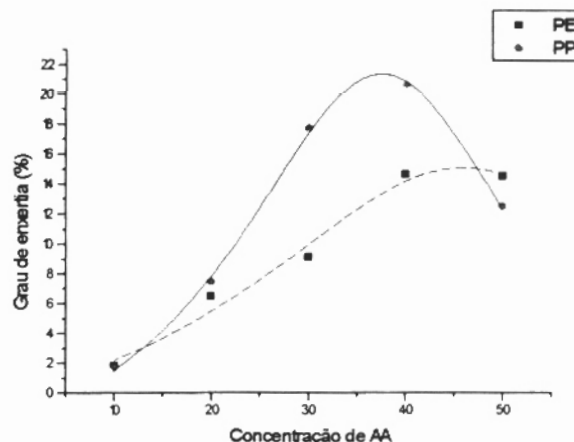


Figura 2-Determinação do grau de enxertia em função da concentração do AA. PE: dose de irradiação= 10kGy, taxa de dose= 0,21kGy/h; PP: dose de irradiação= 10kGy, taxa de dose= 0,31kGy/h

Na Figura 2 observa-se que o maior grau de enxertia alcançado foi a 40% de AA em água para o PE, e a 40% em metanol para o PP. A partir dessa concentração do monômero, observou-se uma diminuição do processo de enxertia.

A diminuição do nível de enxertia com o aumento da concentração pode ser devido à baixa difusão do monômero nas matrizes, causado pela fácil homopolimerização em concentrações altas do monômero. Como no caso anterior, a formação do homopolímero desfavoreceu a reação de enxertia⁸.

Imobilização da urease

Os diferentes níveis de enxertia do AA nos suportes de PE e PP resultaram em diferentes coeficientes de imobilização de urease.

No suporte de PE-g-AA, como observamos na Figura 3, maiores coeficientes de imobilização foram alcançados com o aumento do nível de enxertia do ácido acrílico, chegando à saturação no grau de 10%. A saturação foi provavelmente devido a formação de ligações cruzadas entre o ácido acrílico enxertado, levando a uma diminuição dos grupos carboxílicos disponíveis para a ativação química⁹.

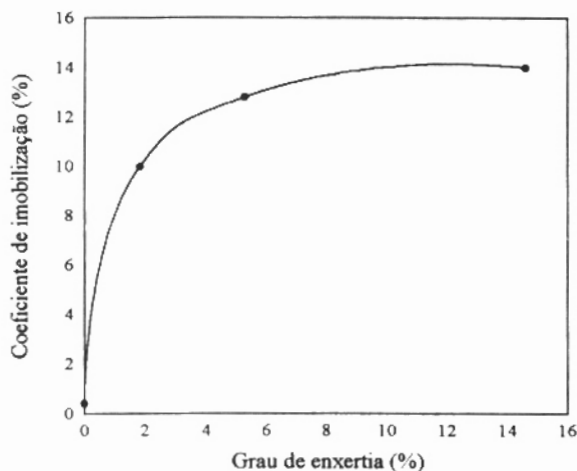


Figura 3-Relação entre coeficiente de imobilização (%) da enzima urease e grau de enxertia (%) de PE-g-AA em 72h de contato a 5°C.

Para o PP-g-AA (Figura 4), uma maior eficiência na imobilização foi conseguida na faixa de 2 a 5% de enxertia. Neste caso, o aumento do grau de enxertia do ácido acrílico resultou na redução do coeficiente de imobilização da urease. A diferença no comportamento entre o PP e o PE pode ser explicada pela porosidade dos grânulos. Os grânulos de PP são mais porosos que os de PE, o que favorece a enxertia e a formação das ligações cruzadas, diminuindo os grupos carboxílicos ativáveis para imobilização da urease.

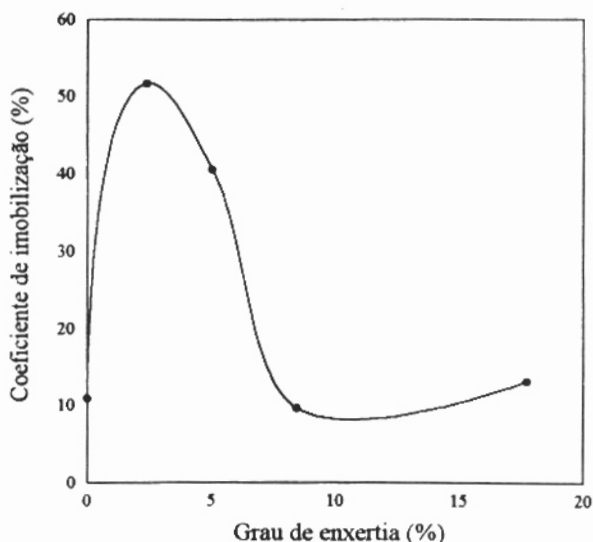


Figura 4-Relação entre o coeficiente de imobilização (%) da enzima urease e grau de enxertia (%) de PP-g-AA em 72 h de contato a 5°C.

CONCLUSÕES

Diferentes graus de enxertia foram obtidos variando-se a dose e a concentração do monômero, sendo que o máximo conseguido para o PE foi na dose de 9kGy com o AA na concentração de 40% em água e para o PP, na dose de 11kGy com AA na concentração de 36,5% em metanol.

Os graus de enxertia dos polímeros influenciaram na quantidade de enzima imobilizada. Em PE-g-AA, o máximo de eficiência na imobilização da urease ocorreu com 10% de enxertia. Para o PP-g-AA, uma maior eficiência na imobilização foi conseguida na faixa de 2 a 5% de enxertia.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- (1)KAETSU,I.; KUMAKURA,M.; FUJIMURA,T., YOSHIDA,M.; ASANO,M.; KASAI,N.; TAMADA,M. Studies on the immobilization of biofunctional components by radiation polymerization and their applications. *Radiat. Phys. Chem.* **27** (4): 245-263, 1986.
- (2)KAETSU,I.; KUMAKURA,M. Immobilization on enzyme and antibody by low energy electron beam polymerization. *Radiat. Phys. Chem.* **30** (4): 263-270, 1987
- (3)GARNET,J.L. Grafting. *Radiat Phys. Chem.* **14**: 29-37, 1979.
- (4)STANNETT,V.T. Radiation grafting- state-of-the-art *Radiat. Phys Chem.*, **35**(1-3): 82-87, 1990.
- (5)COULET, P. R.; JULLIARD, J. H.; GAUTHERON, D. C. A Mild Method of General Use for Covalent Coupling of Enzymes to Chemically Activated Collagen Films *Biotechnol. Bioeng.*, **16**: 1055-1068, 1974.
- (6)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.*, **72**: 248-254, 1976.

(7) CHAPIRO, A. Chapter XII IN: CHAPIRO, A. *Radiation Chemistry of Polymeric Systems* Interscience Publishers. John Wiley & Sons, New York-London, 1962, pp 596-691.

(8) de QUEIROZ, A. A. A *Obtenção de copolímero de enxerto via radiação ionizante, caracterização e estudo de suas propriedades hemocompatíveis*. Tese de Doutorado. IPEN/CNEN-SP, 1993. 141pp.