

Tensão Interfacial Dinâmica de Hialuronidase Testicular Bovina e Sua Imobilização em Filmes Lipídicos de Galactocerebrosideo e DPPC.

Douglas Santos Monteiro^{1*} (PG), Thatyane M. Nobre² (PQ) e Maria Elisabete D. Zaniquelli¹ (PQ).

1) Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, São Paulo. Brasil. douglasmonteiro@usp.br

2) Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brasil.

Palavras Chave: Imobilização de Hialuronidase, filmes de Langmuir-Blodgett.

Introdução

A Hialuronidase (HAase) é uma enzima presente em importantes mecanismos nos seres vivos. Nos mamíferos, ela tem a função de facilitar a penetração do espermatozóide através da zona pelúcida. Isso acontece por meio da clivagem do seu substrato, o ácido hialurônico (HA) e, portanto, facilita a fecundação do óvulo.

Filmes lipídicos de Langmuir-Blodgett (LB), por sua vez, são reconhecidos como sistemas modelos de biomembranas. Além disso, são úteis para imobilização de biomoléculas para a construção de biossensores e biorreatores.

Propriedades interfaciais de proteínas e outras biomacromoléculas são importantes em diferentes processos bioquímicos¹. Atualmente propriedades interfaciais de líquidos biológicos têm recebido atenção por causa da sua relação direta com a detecção de doenças do nosso organismo^{1,2}.

Nesse contexto, propusemo-nos a estudar as propriedades interfaciais da HAase. Medidas de tensão interfacial dinâmica para soluções de várias concentrações de HAase foram realizadas utilizando o método da gota pendente, na presença ou na ausência de monocamadas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

Filmes LB constituídos de três camadas de ácido dihexadecilfosfatídico (DHP) mediadas por Zn^{2+} foram depositados. Uma última camada lipídica de DPPC ou galactocerebrosideo (GCER) foi depositada, e a adsorção da proteína a partir de solução quantificada utilizando a técnica da microbalança a cristal de quartzo (QCM).

Resultados e Discussão

Soluções com concentrações de HAase inferiores a $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ não apresentaram variação de tensão superficial comparada à água pura (Fig. 1). Entretanto, na presença da monocamada de DPPC variações de pressão ($\Delta\pi$) de até 25 mN m^{-1} foram detectadas (Fig. 2), mostrando que a proteína interage fortemente com DPPC, mesmo em elevados empacotamentos da monocamada (Fig. 2). Essa concentração foi então utilizada para imobilizar a enzima a partir de solução em filmes LB de DPPC e GCER.

Sobre o filme de DPPC foram depositadas $218,0 \pm 37 \text{ ng}$ de enzima, sem perdas significativas após dois enxágües sucessivos do filme. No entanto, para o filme GCER, a massa de HAase depositada teve baixa reprodutibilidade ($130,6 \pm 123 \text{ ng}$) e desprende-se do filme com apenas uma etapa de enxágüe.

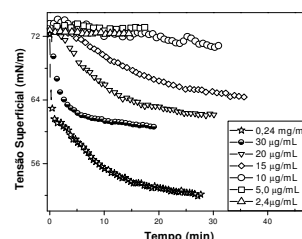


Figura 1. Cinética de adsorção de HAase na interface líquido-ar.

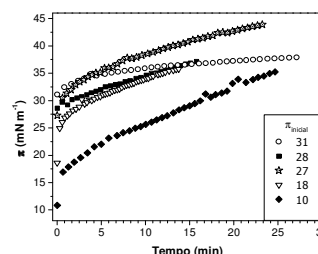


Figura 2. Cinética de adsorção de HAase em presença de DPPC em diferentes pressões iniciais.

Conclusões

A enzima HAase pôde ser imobilizada em filme fosfolipídico mesmo em concentrações e intervalos de tempo nos quais não se observa nenhuma atividade superficial da enzima em interface água-ar. Melhor reprodutibilidade na deposição da hialuronidase foi obtida sobre filmes LB de DPPC.

Agradecimentos

CAPES, CNPq e FAPESP.

¹ Trukhin, D. V.; Sinyachenko, O. V.; Kazakov, V. N.; Lylyk, S. V.; Belokon, A. M. e Pison, U., *Colloids Surf. B*, **2001**, 21, 231.

² Kazakov, V. N.; Sinyachenko, O. V.; Fainerman, V. B.; Pison, U. e Miller, R., *Dynamic Surface Tensiometry in Medicine*, **2000**, Elsevier. Amsterdã, Países Baixos.