

ENSAIOS BIOQUÍMICOS DE USO COMUM PARA DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E PREPARO DE NOVAS FORMAS FARMACÊUTICAS

Anna Caroline F. Alexópulos¹; Maria Beatriz O. Silva¹; Daniel B. Tagliarenha¹; Márcio A. Paschoal²; Maribel C. Silva²; Juliana M. G. Geraldi²; Erika F. Anjos² e Eneida de Paula².

¹ Bolsista Pic Jr.; ² Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia / UNICAMP.

e-mail: annah_caroline@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Este projeto de Iniciação Científica Júnior teve por objetivos propiciar aos alunos de ensino médio um contato prévio com a Universidade, especificamente com atividades de pesquisa desenvolvidas em laboratórios do Departamento de Bioquímica, IB/Unicamp.

Durante o estágio, os bolsistas tiveram contato com diferentes técnicas, algumas das quais são mostradas neste pôster:

- 1) Cultura de células é um termo que descreve o conjunto de técnicas que permitem cultivar células isoladas fora do organismo de origem, mantendo suas características próprias.^[1] Neste trabalho utilizamos células Balb/C 3T3 (fibroblasto de camundongo) para testar a toxicidade de um fármaco: o anestésico bupivacaína.
- 2) Lipossomas são vesículas lipídicas com compartimento aquoso interno e que podem ser usadas para liberação sustentada de fármacos. A composição lipídica e o método de preparo dos lipossomas determinam sua morfologia, tamanho e capacidade de encapsulação.^[2] Aqui preparamos lipossomas compostos de fosfatidilcolina de ovo, EPC (2,3mM) e colesterol (1,7mM), para carrear bupivacaína.

RESULTADOS

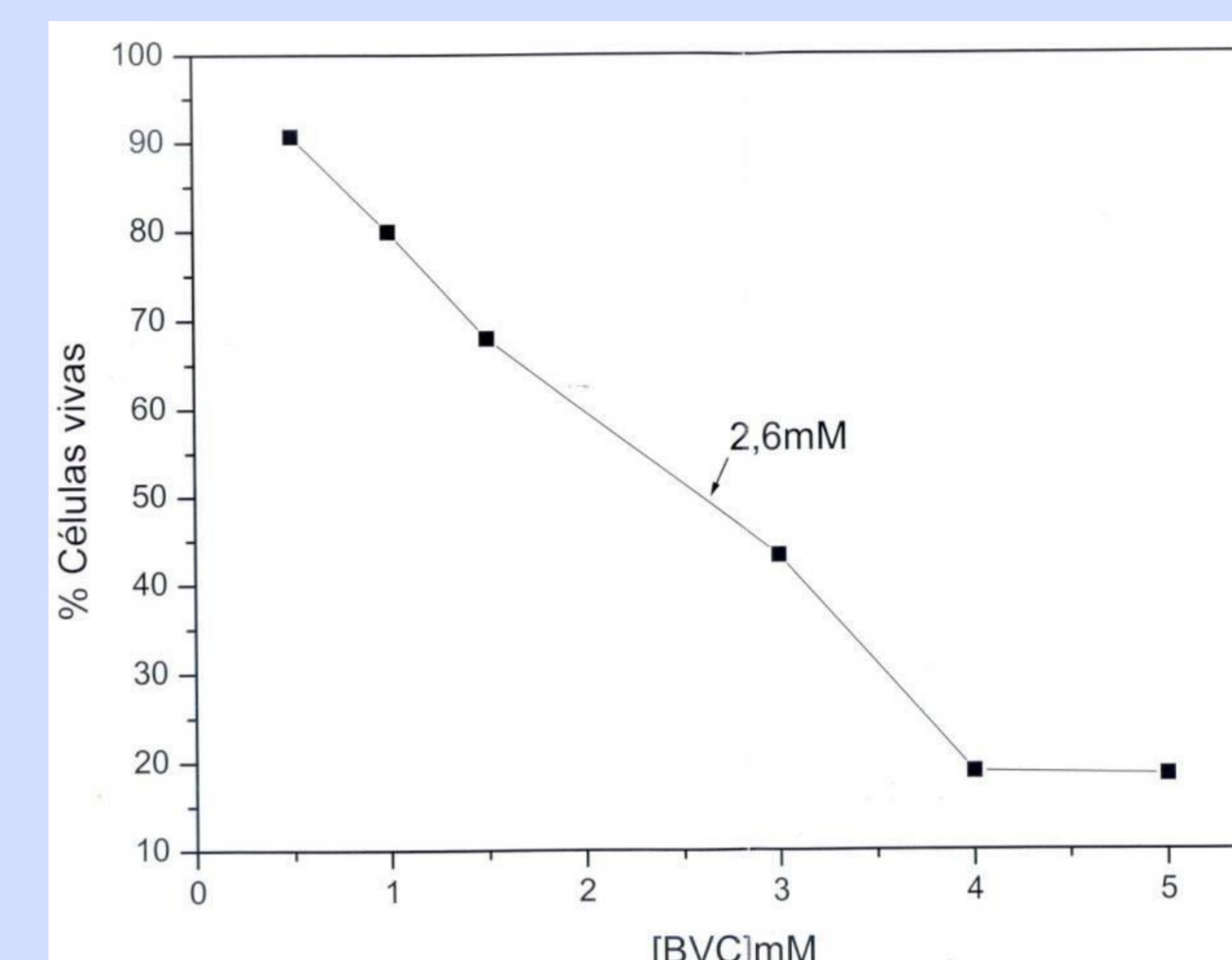
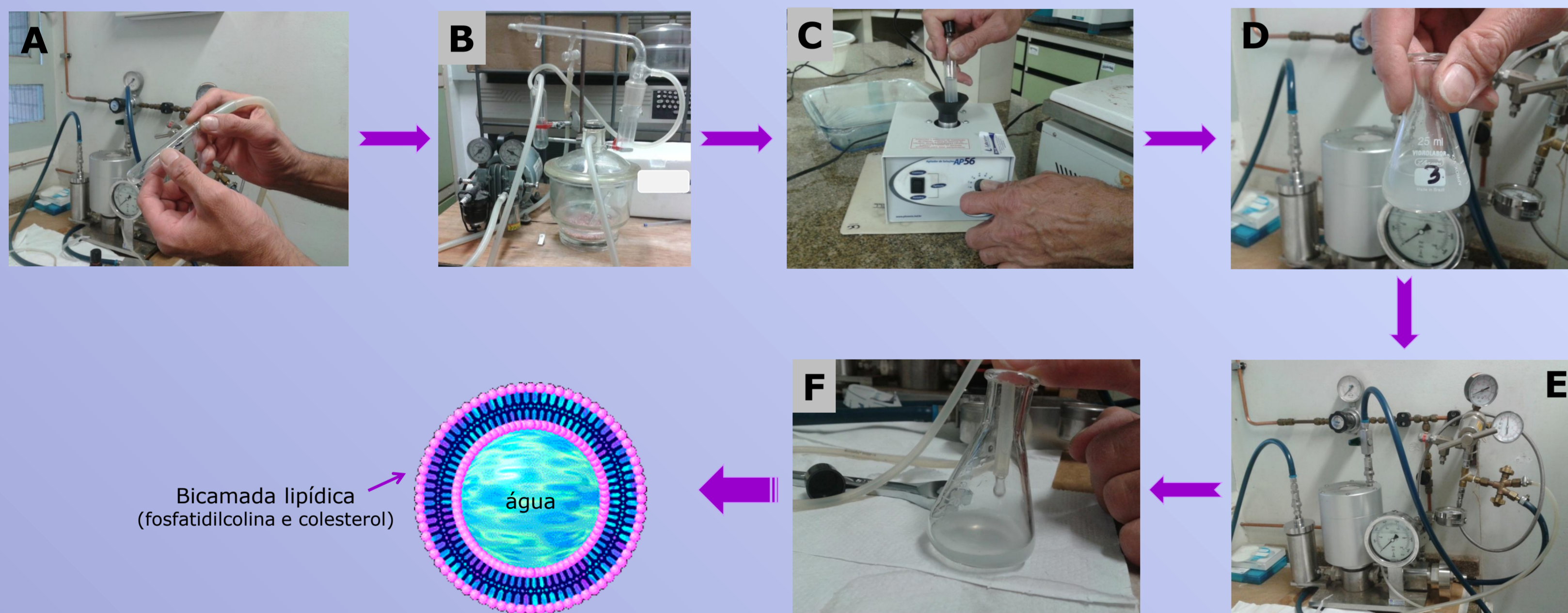
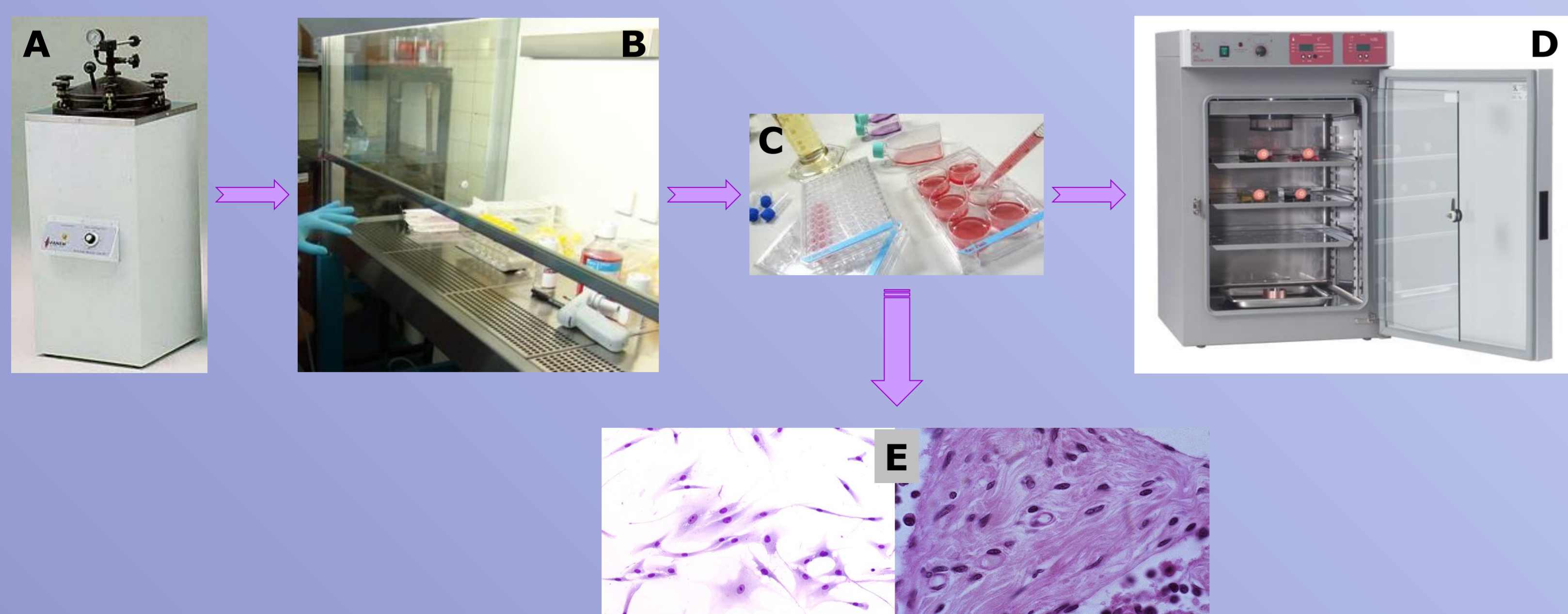


Figura 1. Efeito tóxico da bupivacaína sobre a viabilidade de células Balb/C 3T3 em cultura, medida fotometricamente pela formação do corante formazan ^[1,3]. A concentração de bupivacaína capaz de causar a morte de 50% das células = 2,6mM.

MATERIAIS E MÉTODOS



Preparo de lipossomas ^[2]: **A.** Preparação de filme seco; **B.** evaporação do solvente residual (clorofórmio); **C** e **D.** Hidratação e agitação (lipossomas multilamelares); **E.** extrusão sob pressão; **F.** suspensão de lipossomas unilamelares.



Cultura de Células ^[1,3]: **A.** Esterilização de materiais em autoclave; **B.** Câmara de fluxo laminar, ambiente estéril; **C.** Plaqueamento de células usando corante MTT (brometo de difenil tetrazólio) que produz corante formazan, púrpura; **D.** incubadora para crescimento das células a 37°C e 5% CO₂; **E.** Imagens de microscopia de células no início da divisão celular e já confluentes (após 48h).

Dosagem de Colesterol ^[4]: conforme Rose *et al.*, usando kit comercial, método enzimático e colorimétrico.

Dosagem de Fosfato ^[5]: conforme Brito *et al.*, dosagem de fosfato inorgânico.

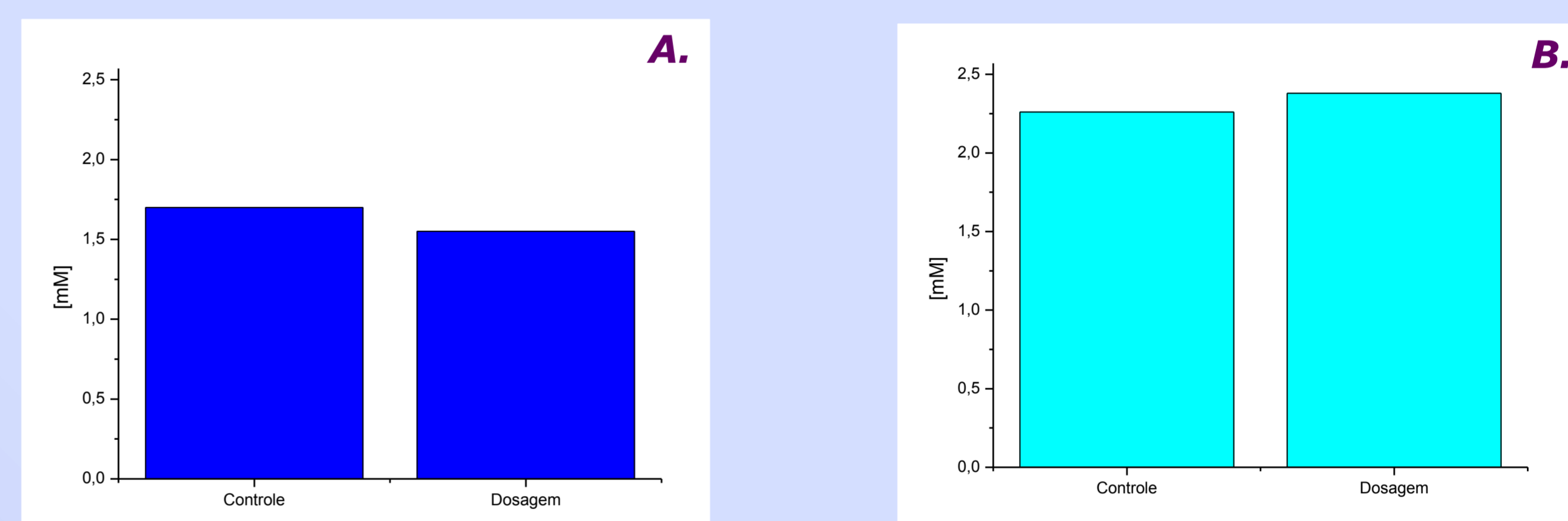


Figura 2. A. Dosagem de Colesterol em lipossomas. Valor encontrado = 1,55mM (média de 3 medidas). **B.** Dosagem de fosfolípidios em lipossomas. Valor encontrado = 2,55mM (média de 3 medidas).

CONCLUSÃO

⇒ Com este projeto os bolsistas PIC Jr tiveram contato com técnicas de pipetagem, preparo de soluções, esterilização de materiais, pHmetria, fotometria, etc...

Essas técnicas foram usadas para realizar 2 procedimentos, aqui relatados em detalhe:

- ⇒ Técnica de cultura de células aderidas – e ensaio da toxicidade de um fármaco (bupivacaína, que foi capaz de matar 50% das células com 2,6mM);
- ⇒ Preparo de lipossomas – e quantificação dos componentes: fosfatidilcolina e colesterol, com resultados bem próximos (1,55/1,7 e 2,55/2,3mM, respectivamente) aos esperados teoricamente.

REFERÊNCIAS

- [1] Peres, C.M & Curi, R.; Como cultivar células. Guanabara Koogan, 1ª ed., 2005.
- [2] Cereda, C.M.; de Araújo D.R.; Brunetto, G.B. & de Paula, E.; Lipossomal prilocaine, preparation, characterization, and in vivo evaluation. J. Pharm. Pharm. Sci. 7:235-240, 2004.
- [3] de Araujo, D.R.; Cereda, C.M.; Brunetto, G.B.; Vomero, V.U.; Pierucci, A.; Neto, H.S.; de Oliveira, A.L.; Fraceto, L.F.; Braga Ade, F & de Paula, E.; Pharmacological and local toxicity studies of a lipossomal formulation for the novel local anaesthetic ropivacaine. J. Pharm. Pharmacol. 60:1449-57, 2008.
- [4] Rose, H.G. & Oklander, M. Improved procedure for the extration of lipids from human erythrocytes. J. Lipd Res. 6:428-431, 1965.
- [5] Brito, M.A.; Silva, R.M.; Matos, D.C.; Silva, A.T. & Brites, D.T.. Alterations of morphology and lipid composition by hyperbilirubinemia. Clin. Chim. Acta, 249:149-165, 1996.