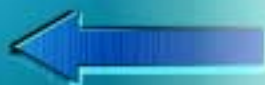
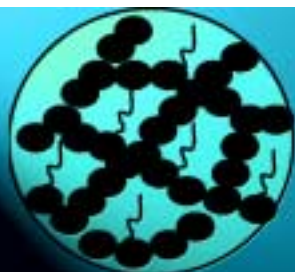


# BIOMATERIAIS PARA FIXAÇÃO DE PROTEÍNAS

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE VIDROS POROSOS VIA SOL-GEL PARA FIXAÇÃO DE PROTEÍNAS



**Herman S. Mansur** - mestre e doutor em físico-química  
**Rodrigo L. Oréfice** - mestre e doutor em engenharia de materiais  
**Wander L. Vasconcelos** - mestre e doutor em engenharia de materiais  
**Rúbia F. Silva** - mestre e doutora em engenharia de materiais  
Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Engenharia -  
Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais  
[bmansur@demet.ufmg.br](mailto:bmansur@demet.ufmg.br)  
**Zélia P. Lobato** - mestre em virologia e doutora em biologia molecular  
Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária -  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Fotos cedidas pelos autores

## Resumo

Realizou-se um estudo para desenvolvimento de um processo de fabricação de vidro poroso de sílica via sol-gel para fixação de proteínas. Utilizou-se tetrametilortossilicato (TMOS) como precursor em meio de etanólico e um tampão fosfato salino PBS, mantendo o  $\text{pH}=7,40 \pm 0,05$ . O processo de polimerização foi monitorado por meio de análise FTIR, sendo observado um período superior a 10 dias para obtenção de uma polimerização completa à temperatura ambiente. As análises dos substratos de vidros porosos incluíram medidas de porosidade e área superficial (B.E.T). Em seguida foram realizados testes preliminares para avaliação da eficiência de fixação da proteína albumina nos substratos de vidro poroso.

**Palavras Chaves:** Biomateriais, Proteínas, Sol-gel.

## Abstract

*In this work we report the development of a process for silica porous glass production with protein fixation based on sol-gel method. The glass was obtained using TMOS in ethanol and phosphate buffered saline (PBS) solution with  $\text{pH}=7.40 \pm 0.05$ . The polymerisation of the material during the gelation process was monitored through FTIR and no significant change of the spectra after 10 days was observed. Porosity and surface area were analysed by B.E.T and the results have shown an increase of the average pore size when albumin protein macromolecules were added to gelation solution.*

**Keywords:** Biomaterials, Proteins, Sol-Gel Glass.

## 1. INTRODUÇÃO

A elevada eficiência apresentada pelas macromoléculas biológicas na seleção de reagentes e na especificidade da interação com sítios de reação tem promovido o crescente interesse de pesquisa envolvendo filmes finos de macromoléculas associadas a materiais avançados [1-2]. As proteínas, em especial, são macromoléculas biológicas de elevada importância e o estudo de suas interações com os diversos materiais e meios químicos é fundamental para o aprofundamento do conhecimento orgânico e funcional dos seres vivos. Os estudos envolvem geralmente a fixação ou imobilização de uma ou mais proteínas em substratos, por meio de diversos mecanismos, tais como, ligação covalente, adsorção física, ligações cruzadas, polarização e estereoquímica, etc. Um ou mais desses mecanismos citados devem estar envolvidos no processo de fixação da proteína com o substrato. Os vários parâmetros do

processo, tais como pH, temperatura, área superficial, íons e agentes quelantes, agentes complexantes etc. certamente determinam os níveis de eficiência e o grau de seletividade das interações proteína-substrato.

Pesquisas recentes têm demonstrado que vidros silicatos obtidos por meio da tecnologia de processamento sol-gel podem oferecer um substrato para fixação de macromoléculas de proteínas sem a perda de características funcionais biológicas das mesmas [3-6]. Ao contrário dos métodos convencionais de fusão de sílica vítrea que requerem elevadas temperaturas, o processamento sol-gel envolve baixas temperaturas nas reações de hidrólise e condensação, ideal para a grande variedade de moléculas orgânicas sensíveis a altas temperaturas, como a classe das proteínas que podem desnaturar e perder sua atividade biológica [7].

Tipicamente, uma solução contendo um alcóxido líquido, tal como  $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$

(tetrametilortossilicato, TMOS), conduz à reação de polimerização sob condições apropriadas e a viscosidade da solução aumenta até o gel ser obtido. O gel é subsequentemente secado e aquecido para produzir os produtos desejados. Durante a polimerização, a evolução da forma e do tamanho dos polímeros, que determinam a interação reológica entre eles são os fatores-chaves que afetam a dependência tempo-viscosidade da solução. Uma etapa fundamental no processo sol-gel é a produção do gel poroso, preparado geralmente através da hidrólise e condensação de alcóxidos. Tal evolução conduz eventualmente à formação de um gel poroso, que posteriormente pode ser convertido em vidro poroso pela desidratação do material. As características de controle de porosidade, a elevada superfície de interação e estrutura amorfa dos vidros obtidos por processamento sol-gel os qualificam como substrato ideal para a construção de sistemas biológicos heterogêneos envolvendo

materiais inorgânicos e macromoléculas de proteínas. O controle da distribuição e do tamanho médio de poros é fundamental para a propriedade de fixação de proteínas do substrato, oferecendo um maior ou menor número de sítios de interação, dependendo do volume de poros e da área superficial sólido-poros da matriz vítrea obtida [8].

A porosidade e a elevada superfície específica intrínseca dos vidros porosos obtidos via sol-gel permitem a captura de macromoléculas sem a necessidade de uma ligação com os sítios biologicamente ativos, o que portanto, não compromete a eficiência da propriedade de seletividade do sistema construído.

Neste trabalho foi realizado um estudo de análise de FTIR da formação de uma matriz de sílica-gel porosa com incorporação de proteína BSA. Foram feitas análises da variação da porosidade média da matriz obtida com a adição de macromoléculas de proteína durante o processamento sol-gel e também após a gelação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (> 99,5%), fornecidos pela VETEC foram utilizados sem purificação posterior.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (> 99,0%),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (> 99,0%) e  $\text{NaCl}$  (> 99,0%), fornecidos pela VETEC, foram utilizados como reagentes para preparação do tampão fosfato PBS ("phosphate buffered saline").

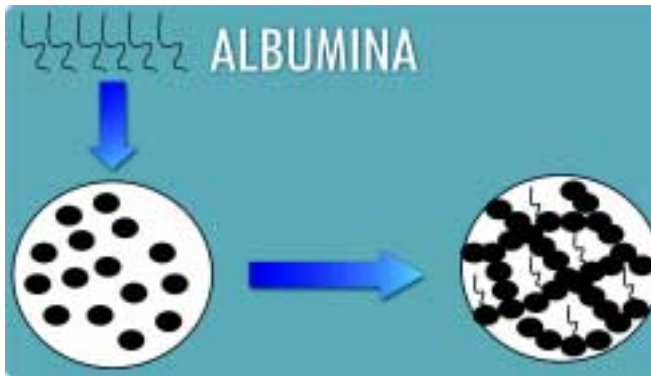
Foi preparada uma solução 1,0 N de  $\text{NaOH}$  (> 99,0%), fornecido pela MERK, para correção do pH da solução utilizada no processo sol-gel.

A albumina bovina (BSA - fração V > 99,5%),  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (absoluto >99,8%) e  $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$  (TMOS >98%) foram adquiridos da SIGMA-ALDRICH e utilizados sem purificação posterior.

### 2.1. Preparação do Substrato Sol-Gel

a) Método-1 - Sem adição de albumina

Preparou-se uma solução de TMOS (1,0 ml), etanol (1,2 ml) e um tampão fosfato salina (PBS, pH=7,4, 0,6 ml), promovendo agitação moderada, à temperatura ambiente até ocorrência de gelação. A solução foi mantida em temperatura ambiente por 14 dias para polimerização completa. Foram realizados espectros de FTIR ao longo desse período de tempo para monitoramento da polimerização. Após uma semana, foi feita a adição de 250  $\mu\text{l}$  da solução de 1,0 % de albumina em tampão PBS, em cada amostra de gel de sílica.



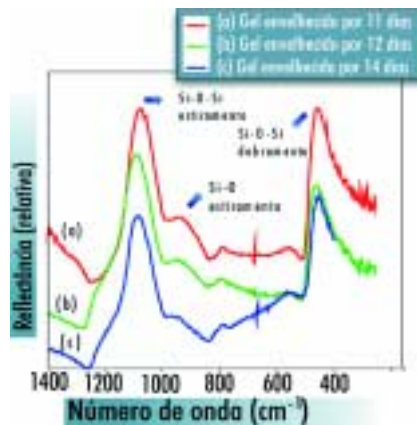
**Figura 1.** Representação esquemática das etapas de processamento sol-gel, com a incorporação de proteínas em matrizes dos vidros porosos obtidos

b) Método-2 - Com adição de albumina durante a gelação

Preparou-se uma solução de 1,0 % de albumina em tampão PBS e adicionou-se à mistura de TMOS-Etanol, agitando-se moderadamente em banho de gelo até que a gelação ocorresse. Manteve-se à temperatura ambiente por 14 dias para polimerização completa. A Fig.1 mostra um diagrama representativo do processo de incorporação de macromoléculas de proteínas durante o processamento sol-gel para obtenção de uma matriz vítrea de sílica.

### 2.2. Técnica de análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Utilizou-se o equipamento de análise FTIR Paragon-1000 da Perkin-Elmer, com o software Spectrum for Windows 1.0. Os espectros foram obtidos na faixa de número de onda de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  para



**Figura 2.** Espectros de infravermelho de amostras de géis de sílica em diferentes estágios de consolidação

acompanhamento da evolução durante a preparação do substrato de gel de sílica com a incorporação e adsorção de proteínas. Foram obtidos espectros de reflexão, utilizando-se o acessório Perkin-Elmer para reflexão difusa. Amostras monolíticas e na forma particulada foram analisadas.

### 2.3. Técnica de análise de porosidade por B.E.T.

Utilizou-se o equipamento de análise AUTOSORB-1 da Quantachrome. Os ensaios foram realizados com substratos de gel de sílica com diferentes concentrações de proteínas para avaliação da sua influência na área superficial e no tamanho médio dos poros obtidos.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. B.E.T.

Os resultados iniciais indicam uma influência significativa no tamanho médio de poros obtidos e na área superficial com a adição de macromoléculas da proteína albumina bovina (BSA) no processo de síntese de vidro de sílica porosa via sol-gel. Utilizando-se o Método-1, onde a proteína foi adicionada no oitavo dia de envelhecimento do gel, observou-se um valor médio de 75 Å para as amostras com concentração de albumina de 3% a 5 % e 50 Å para o gel de sílica sem adição de proteína. De modo análogo, as amostras fabricadas pelo Método-2, onde a proteína foi adicionada durante o processo de gelação, observou-se um tamanho médio de poro inferior ao obtido no Método-1, mas uma tendência similar de aumento do tamanho médio de poro (50-100%) com adição de 1% de BSA. Essa observação está de acordo com a literatura [3] que discute o aumento do tamanho do poro com a adição de macromoléculas orgânicas associado, principalmente, ao encapsulamento dessas macromoléculas nos poros, que impedem a contração durante o processo de envelhecimento do gel de sílica.

### 3.2. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada nesse trabalho para comprovar a eficiência do método de preparação no que se refere à incorporação de proteínas nos géis de sílica. Além disso, essa técnica foi ainda usada para monitorar os processos envolvidos na formação do reticulado inorgânico do gel de sílica.

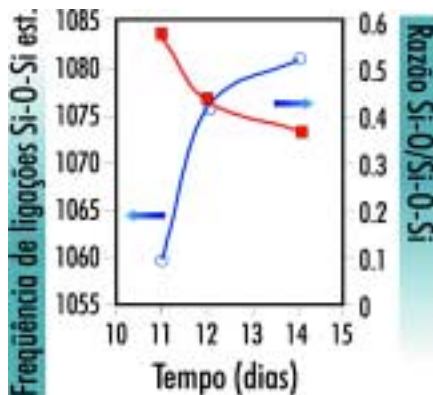
Como salientado anteriormente, a formação do gel de sílica via sol-gel inclui o processamento de uma série de reações

químicas que envolvem os alcóxidos metálicos e seus derivados, frutos de reações de hidrólise e condensação. O processamento de tais reações leva ao surgimento e crescimento de cadeias poliméricas inorgânicas, as quais interagem entre si, culminando com a eventual formação de um reticulado tridimensional (gel). A espectroscopia de infravermelho permite o acompanhamento da evolução estrutural que ocorre durante a transformação sol para gel e após a formação do gel, a partir da avaliação do ambiente químico associado às ligações da sílica.

A Fig.2 mostra os espectros de infravermelho de géis de sílica em diferentes etapas de consolidação. Nesse caso, géis coletados após 11, 12 e 14 dias após gelação foram submetidos à análise. Os espectros exibidos na Fig.2 mostram o pico característicos das ligações Si-O-Si (modo de estiramento) entre 1100-1000  $\text{cm}^{-1}$ , o pico relacionado com as ligações rompidas Si-O- entre 950-900  $\text{cm}^{-1}$  e, entre 450-400  $\text{cm}^{-1}$ , o pico associado com as ligações Si-O-Si no modo de dobramento. A análise desses espectros provê informações relacionadas com a estrutura dos géis de sílica no que diz respeito à formação do reticulado tridimensional. Percebe-se, através dos espectros, uma mudança progressiva da frequência dos picos relativos às ligações Si-O-Si (estiramento) para maiores números de onda em géis envelhecidos por tempos mais longos. Além disso, observa-se uma redução gradual da intensidade do pico relacionado com as ligações rompidas para maiores tempos de envelhecimento. Tais resultados estão explicitados na Fig.3.

Os resultados da Fig.3 fornecem informações importantes relacionadas com o processo de consolidação da estrutura dos géis de sílica. A mudança do pico localizado aproximadamente em 1080  $\text{cm}^{-1}$  para frequências maiores é uma indicação de que o reticulado da sílica se torna mais rígido à medida que o tempo de envelhecimento aumenta. Quanto maior o número de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas inorgânicas, maior é a rigidez da rede e maior é a energia necessária para a ocorrência das transições vibracionais das moléculas. Ao mesmo tempo, a redução do número de ligações quebradas (Fig.3) é uma indicação do prosseguimento das reações de condensação entre grupos silanol (-SiOH) mesmo após a gelação. Tais reações aumentam a densidade de ligações cruzadas no gel, levando a um enrijecimento da rede inorgânica.

Informações obtidas via espectroscopia de infravermelho, como as discutidas nas Fig.2 e Fig.3, são úteis na definição do estágio ótimo de consolidação dos géis para impregnação de macromoléculas (processamento Método 1). Tal estágio ótimo deve incluir uma série de características estruturais que possibilite a penetração e fixação



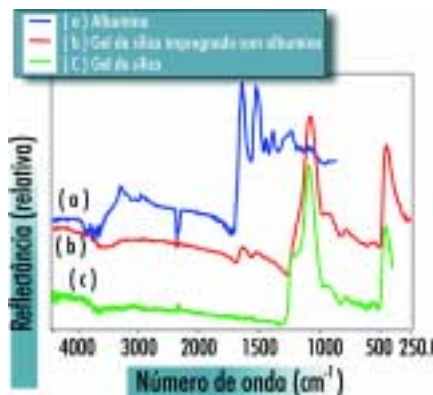
**Figura 3.** Mudanças observadas na frequência e intensidade de bandas de absorção em géis de sílica analisados em diferentes estágios de consolidação.

das macromoléculas. Entre essas características citam-se: textura de poros, rigidez da rede, concentração de grupos silanol (ligações quebradas), entre outras.

### 3.3. Avaliação da presença de proteínas nos géis de sílica

A espectroscopia de infravermelha foi usada na determinação da eficiência dos métodos de incorporação de proteínas nos géis. Na Figura 4, são mostrados espectros de albumina pura (Fig.4a), de géis de sílica puros (Fig.4c) e de géis de sílica com albumina (Fig.4), obtidos pelo processo tipo (a).

Os picos característicos da albumina, que envolvem os grupamentos amida primária (1620 a 1680  $\text{cm}^{-1}$ ) e amida secundária (1480 a 1580  $\text{cm}^{-1}$ ), estão claramente exibidos na Fig.4a. Os picos observados nos espectros de FTIR de amida-I e amida-II estão de acordo com as bandas descritas para proteínas na literatura [9-10]. Esses picos se encon-



**Figura 4.** Espectros de infravermelho de albumina, gel de sílica e gel de sílica incorporado com albumina

tram também presentes no espectro do gel preparado com albumina, revelando, assim, a capacidade do método usado em incorporar macromoléculas em matrizes de sílica.

## 4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido um processo de obtenção de uma matriz de vidro poroso via sol-gel para incorporação de proteínas. Observou-se um aumento do tamanho médio poro da matriz com o aumento da concentração de proteína BSA. Verificou-se ainda a incorporação da proteína BSA adicionada por meio da técnica espectroscópica de FTIR.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq/CAPES/FINEP/FAPEMIG pelos recursos concedidos para utilização nesse projeto. Os autores agradecem também a Wesler G. Schmidt pelas análises de porosidade realizadas pelo método B.E.T.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MCLEAN, M.A.; STAYTON, P. S.; SLIGAR, S. G., Engineering Protein Orientation at Surfaces to Control Macromolecular Recognition Events, *Anal. Chem.*, v.65, p.2676-2678, 1993.
- [2] MURAMATSU, H.; DICKS, J.; TAMIYA, E.; KARUBE, I., Piezoelectric Crystal Biosensor Modified with Protein-A for Determination of Immunoglobulins, *Anal. Chem.*, 1987, v.59, pp.2760-2763.
- [3] DAVE, B.C.; DUNN, B.; VALENTINE, J. S.; ZINK, J. L., Sol-Gel Encapsulation Methods for Biosensors, *Analytical Chemistry*, v.66, n.22, 1994.
- [4] BRAUN, S.; RAPPOPORT, S.; ZUSMAN, R.; AVNIR, D.; OTTOLENGHI, M. *Mater. Lett.*, 1990, v.10, pp.1.
- [5] ELLERBY, L. M.; NISHIDA, C. R.; NISHIDA, F.; YAMANAKA, S.A.; DUNN, B.; VALENTINE, J. S.; ZINK, J.L., *Science*, 1992, v.255, pp.1113.
- [6] WU, S.; ELLERBY, L.M.; COHAN, J.S.; DUNN, B.; VALENTINE, J.S.; ZINK, J.I., *Chem. Mater.*, 1993, v.5, pp.115.
- [7] HENCH, L.L.; WEST, J.K., *Chem. Rev.*, 1990, v.90, pp.33.
- [8] HENCH, L.L.; VASCONCELOS, W.L. Sol-Gel Silica Science, *Annual Review of Materials Science*, v.20, 1990, 269-298.
- [9] CHITTUR, K. K., FTIR and Protein Structure at Interfaces, Chemical and Materials Engineering Department, University of Alabama in Huntsville, AL 35899; [http://eb-p5.eb.uah.edu/~kchittur/bmreview\\_11-ago-1998](http://eb-p5.eb.uah.edu/~kchittur/bmreview_11-ago-1998).
- [10] MOSS, D., NABEDRYK, E., BRETON, J.; MANTELE, W., *Eur. J. Biochem.*, v.187, pp.1990, 565-572.