

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

ANDRÉA MACHADO COSTA

**ESTUDO DE ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS EM HIDROXIAPATITA
E ZINCO- HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientadores:

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva –D.C.

Prof^a. Elena Mavropoulos Oliveira Tude – D.C.

Rio de Janeiro

2013

© 2013

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ

CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmear ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do autor e do orientador.

620.112 Machado Costa, Andréa.

A556c Estudo de Adsorção de Proteínas em Hidroxiapatita e Zinco-Hidroxiapatita Nanoestruturada/ Andréa Machado Costa; orientado por Marcelo Henrique Prado da Silva e Elena Mavropoulos O. Tude – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2013.

121 p.: il.

Tese (doutorado) – Instituto Militar de Engenharia – Rio de Janeiro, 2013.

1. Engenharia dos Materiais – teses, dissertações. 2. Engenharia dos Materiais. 3. Hidroxiapatita – Proteínas. I. Silva, Marcelo Henrique Prado da. II. Tude, Elena Mavropoulos O. III. Título. IV. Instituto Militar de Engenharia.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

ANDRÉA MACHADO COSTA

**ESTUDO DE ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS EM HIDROXIAPATITA
E ZINCO HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientadores: Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva – D.C.

Prof^a. Elena Mavropoulos Oliveira Tude – D.C.

Aprovada em 19 de Setembro de 2013 pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva – D.C. do IME – Presidente

Prof^a. Elena Mavropoulos Oliveira Tude – D.C. do CBPF

Prof. Luís Henrique Leme Louro – D.C. do IME

Prof. Eduardo de Sousa Lima – D.C. do IME

Profa. Maria Helena Miguez da Rocha Leão – D.C. da UFRJ

Prof. Alexandre Malta Rossi – D.C. do CBPF

Rio de Janeiro

2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela vida e por proporcionarem a base para a minha educação. Agradeço em especial a minha mãe Eldair que me ensinou a tolerância e o bom senso fundamentais para viver. Aos queridos irmãos Adriana e Amilton que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus orientadores Prof. Marcelo H. Prado da Silva, Elena Mavropoulos por todo o apoio, incentivo, paciência, ensinamentos, e em especial ao Prof. Alexandre Malta Rossi, que tem sido meu orientador desde o período de graduação em trabalhos no meio científico.

Aos professores desta banca que acompanharam o meu doutoramento, incentivaram a sua execução e examinaram este trabalho. Aos professores do Instituto Militar de Engenharia e do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, pelos ensinamentos que me deram uma base sólida para realizar este trabalho.

Aos amigos do Grupo de Biocerâmicas do CBPF, em especial, Dalva Neves, Suzana dos Anjos, Luciana Consentino, Cleonice Martins, Jessica Dornelas, Gisele Dornelas, Gil Sousa, Francisco de Assis, que estiveram sempre ao meu lado no laboratório, incentivando e ajudando experimentos. As amigas Marcia Sader da Coppe/UFRJ, Marisa Monte e Débora Sanches do CETEM pelo incentivo e apoio na execução desse trabalho.

Aos amigos do CBPF e do IME Alejandro Heredia, Marcelo Tanaka, Elvis Mesa, Fabricio Borghi, Leida Gomes, Mariana Giffoni, Paula Roberta N. A. Martins, Daniel Navarro, Daniele Gomes Carvalho, Rubens Marçal, Thiago Guerra, Major Willian Trindade, Felipe Nobre, Luís Carlos da Silva, Suzana Arleno, Heraldo Santos, Victor Talarico, Leticia Chaves, Rodrigo Gomes, Tatiana Skaf, e funcionários Joel, Heloísa e Sandra e tantos outros que me acompanharam no douramento.

Sempre a Deus por permitir a realização de um desejo de contribuir mesmo que de forma pequena ao desenvolvimento da Ciência e da Sociedade.

“A vida merece algo além do aumento da sua velocidade.”

MAHATMA GANDHI

SUMARIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	15
LISTA DE SIGLAS.....	16
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Materiais Nanoestruturados.....	19
1.2 Potencial Tecnológico dos Materiais Nanoestruturados na Engenharia	21
1.3 Potencial Tecnológico dos Materiais Nanoestruturados na Medicina	23
2 IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM MATERIAIS NANOESTRUTURADOS	31
2.1 Proteínas: Formação Biológica e Propriedades	33
2.2 Mecanismos de Adsorção de Proteínas	36
2.3 Adsorção de Proteínas em Hidroxiapatita	40
2.4 Adsorção de Albumina em Hidroxiapatita	43
2.5 Adsorção de Mioglobina em Hidroxiapatita	45
2.6 Adsorção de Insulina em Hidroxiapatita	47
3 OBJETIVO	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1 Síntese de Hidroxiapatita Nanoestruturada	53
4.2 Síntese de Hidroxiapatita Nanoestruturada Contendo Zinco	53
4.3 Adsorção de Proteínas	54
5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	56
5.1 Potencial Zeta (Z)	56
5.2 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível	58
5.3 Dicroísmo Circular (DC).....	60
5.4 Espectroscopia Vibracional no Infravermelho (FTIR).....	62
5.5 Difração de Raios X (DRX)	65
5.6 Espectrometria de Fluorescência De Raios X (FRX).....	66
5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	68

6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
6.1	Caracterizações da Hidroxiapatita e Zinco- Hidroxiapatita Nanoestruturadas	70
6.1.1	Difração de Raios X	70
6.1.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão - Met.....	72
6.1.3	Potencial Zeta, Comportamento ao Longo do pH.....	74
6.2	Adsorção de Albumina em Hidroxiapatita Nanoestruturada.....	75
6.2.1	Potencial Zeta, Comportamento ao Longo do pH.....	75
6.2.2	Análise Por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR).....	77
6.2.3	Análise Por Espectroscopia no Ultravioleta-Visível	81
6.2.4	Dicroísmo Circular no Ultravioleta (DC).....	84
6.2.5	Isotermas de Adsorção	87
6.3	Adsorção de Mioglobina em Hidroxiapatita Nanoestruturada.....	88
6.3.1	Potencial Zeta, Comportamento ao Longo do pH.....	88
6.3.2	Análise por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	90
6.3.3	Análise Por Espectroscopia No Ultravioleta-Visível	92
6.3.4	Dicroísmo Circular No Ultravioleta (DC).....	94
6.3.5	Isotermas De Adsorção.....	97
6.4	Adsorção De Insulina Em Hidroxiapatita Nanoestruturada	99
6.4.1	Potencial Zeta, Comportamento ao Longo do pH.....	99
6.4.2	Análise Por Espectroscopia No Infravermelho (FTIR)	100
6.4.3	Análise Por Espectroscopia No Ultravioleta-Visível	102
6.4.4	Dicroísmo Circular No Ultravioleta (DC).....	104
6.4.5	Isotermas De Adsorção.....	108
7	CONCLUSÕES.....	111
8	REFERÊNCIAS	113

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 1.1	Escala Nanométrica de Comparação de Nanomateriais, componentes biológicos e produtos industriais.	19
FIG. 1.2	Classificação de materiais nanoestruturados quanto à: 1) Dimensão, 2) Morfologia, 3) Composição, E 4) Aglomeração..	21
FIG. 1.3	Relação entre dimensão de Microestrutura e Resistência à Tração em Ligas de Alumínio.....	23
FIG. 1.4	Estrutura Hierárquica do osso em Macro e Nanoescala.....	24
FIG. 1.5	Esquema da vista de topo da Célula Unitária da Hidroxiapatita Hexagonal.....	25
FIG. 1.6	Principais Planos Cristalinos da Estrutura Hexagonal da Hidroxiapatita.	25
FIG. 1.7	Microscopia Óptica de Campo Claro e Microscopia de Fluorescência de amostras contendo Proteína Fluorescente Verde (EGFP)	27
FIG. 1.8	Esquema de múltiplas ligações do Zinco com uma Enzima com número de coordenação 4 (Quatro).	28
FIG. 1.9	Mapeamento de ZnCaP recobertos com alginato: a) 1h, b) 3h, c) 8h em pH 7,4, e) 1h, f) 3h, g) 8h em Ph 6,8; H) 1h, I) 3h, J) 8h Em pH 1,2 e d) amostra inicial de ZnCaP recoberta com alginato.	29
FIG. 1.10	Nível de Glicose no sangue em três ratos diabéticos ao longo do tempo após administração via oral de nanopartículas de ZnCaP contendo Insulina.....	29
FIG. 2.1	Representação Esquemática de várias estratégias de Imobilização de Biomoléculas	33
FIG. 2.2	Esquema dos Fenômenos de Transcrição e Tradução do DNA para Síntese proteica no Interior da Célula	34
FIG. 2.3	Formação da Ligação Peptídica a Partir de dois aminoácidos	34
FIG. 2.4	Estrutura secundária da Proteína: conformação α -Hélice e conformação Folha- β	35
FIG. 2.5	Etapas do Processo de Adsorção de Proteínas.	36
FIG. 2.6	Gráfico de Energia de Ligação de Interações fracas e fortes entre moléculas.	38
FIG. 2.7	Tipos de Isotermas segundo a classificação de Brunauer, Emmett e Teller.	38

FIG. 2.8	Perfis de Potencial Eletrostáticos das superfícies (a) (001) e (b) (010) da Hidroxiapatita Pura em Comparação com superfícies (c) (001) e (d) (010) da Hidroxiapatita Carbonatada.....	42
FIG. 2.9	Modelo da Molécula de Albumina sérica identificando regiões dos domínios I, II e III, e resíduos de aminoácidos básicos (azul), ácidos (vermelho), e neutros (amarelo) em pH neutro.	44
FIG. 2.10	Simulação de Isotherma de adsorção seguindo equação de Langmuir-Freundlich para valores de albumina bovina adsorvida em HA em tampão fosfato 0,01M....	44
FIG. 2.11	Estrutura da Mioglobina formada por oito α -Hélices ligadas ao ion Ferro presente no centro do grupo Heme	46
FIG. 2.12	Capacidade de adsorção de BSA, Mb e Lz pela HA em Função do seu tamanho de Partícula.....	47
FIG. 2.13	Estrutura da Insulina indicando as cadeias A (Azul) e B (Vermelho).	48
FIG. 2.14	Efeito da temperatura de incubação na adsorção de Insulina em tampão fosfato a pH 7,4 após 30 minutos.....	49
FIG. 2.15	Espectros de FTIR de solução de 5% em massa de Insulina em D ₂ O, de forma gradual a 25, 45, 55, 65 e 70°C.....	51
FIG. 5.1	Esquema da dupla camada elétrica formada na superfície de uma partícula carregada.	57
FIG. 5.2	Variação do Potencial Zeta em função do pH para TiO ₂ , SiO ₂ e FeO ₂	58
FIG. 5.3	Espectros de uma cadeia polipeptídica de Poli-L-Lisina: a) Uv-Vis e b) DC.....	61
FIG. 5.4	Modos vibracionais do grupo funcional, SiO ₄ ²⁻ , ativos na região do Infravermelho e seus respectivos valores de número de onda	62
FIG. 5.5	Esquema de análise de Difração De Raios-X em um monocristal.....	65
FIG. 5.6	Esquema de distribuição dos níveis eletrônicos com a ejeção de um elétron da camada K e possíveis preenchimento de vacância com elétrons dos níveis mais externos.	67
FIG. 5.7	Esquema de um aparelho de Fluorescência de Raios X por dispersão de Energia.	68
FIG. 5.8	Esquema de Componentes de um Microscópio Eletrônico de Transmissão para obtenção de: Padrão de Difração de Elétrons (Dp), Imagem (Final Image)	69
FIG. 6.1	Resultado gráfico do Refinamento de Rietveld dos Difratomogramas de Raios X das Amostras de HA (a) a ZnHA (b).....	71

FIG. 6.2	Eletromicrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão das amostras de HA (a) e ZnHA (b)	73
FIG. 6.3	Leituras de Potencial Zeta da amostra de Ha ao Longo do pH.	74
FIG. 6.4	Leituras de Potencial Zeta da Amostra de Znha ao longo do pH.....	75
FIG. 6.5	Leituras de Potencial Zeta da Amostra de HA após adsorção de BSA ao longo do pH.	76
FIG. 6.6	Leituras de Potencial Zeta da amostra de ZnHA após adsorção de BSA ao longo do pH.	77
FIG. 6.7	Espectro de FTIR da BSA (Sigma-Aldrich).....	77
FIG. 6.8	Espectro de FTIR das amostras de HA antes e após adsorção de BSA (2 mg/ml) a temperatura ambiente.	78
FIG. 6.9	Subtração de espectros de FTIR das amostras de HA antes e após adsorção de BSA na região de 1400 a 1750 cm^{-1}	79
FIG. 6.10	Subtração de Espectros de FTIR das amostras de ZnHA antes e após adsorção de BSA na região de 1400 a 1750 cm^{-1}	80
FIG. 6.11	Espectro de UV-Vis da Amostra BSA (Sigma-Aldrich) liofilizada.....	81
FIG. 6.12	Espectro de UV-Vis da amostra de HA.....	82
FIG. 6.13	Espectro de UV-VIS da amostra de ZnHA.	82
FIG. 6.14	Espectro de UV-Vis da amostra de HA + BSA a 37°C.....	83
FIG. 6.15	Espectro de UV-Vis da amostra de ZNHA+BSA a 37°C.	83
FIG. 6.16	Espectro de DC da solução de BSA (Sigma-Aldrich) 0,1mg/mL em tampão fosfato pH 6,0.	84
FIG. 6.17	Espectro de DC da dispersão em água da amostra de HA+BSA.	85
FIG. 6.18	Espectro de DC da dispersão em água da amostra de ZNHA + BSA.	86
FIG. 6.19	Simulação de curva segundo o modelo de Langmuir-Freundlich em experimento de adsorção de BSA em HA a 37°C.	87
FIG. 6.20	Simulação de Curva segundo o modelo de Langmuir-Freundlich em experimento de adsorção de BSA em ZnHa a 37°C.....	88
FIG. 6.21	Leituras de Potencial Zeta da amostra de HA após adsorção de Mioglobina ao longo do pH.	89
FIG. 6.22	Leituras de Potencial Zeta da amostra de ZnHA após adsorção de Mioglobina ao longo do pH.	89

FIG. 6.23	Subtração de Espectros de FTIR das amostras de HA antes e após adsorção de Mioglobina na região de 1400 a 1750 cm^{-1}	90
FIG. 6.24	Subtração de espectros de Ftir das amostras de ZnHA antes e após adsorção de Mioglobina na região de 1400 a 1750 cm^{-1}	91
FIG. 6.25	Espectro de UV-Vis da Mioglobina equina da Sigma-Aldrich.....	93
FIG. 6.26	Espectro de Uv-Vis da amostra de HA após adsorção de Mb a 37°C.....	93
FIG. 6.27	Espectro de Uv-Vis da Amostra de ZnHA após adsorção de Mb a 37°C.	94
FIG. 6.28	Espectro de DC da solução de Mb (Sigma-Aldrich) 0,1mg/mL em Tampão Fosfato pH 6,0.	95
FIG. 6.29	Espectro de DC da dispersão em água da amostra de HA+Mb.....	96
FIG. 6.30	Espectro de DC da dispersão em água da amostra de ZnHA + Mb.	97
FIG. 6.31	Simulação de curva segundo o modelo de Langmuir-Freundlich em experimento de Adsorção de Mb em HA a 37°C.	98
FIG. 6.32	Simulação de Curva segundo o Modelo de Langmuir-Freundlich em experimento de adsorção de Mb em ZnHA a 37°C.....	98
FIG. 6.33	Leituras de Potencial Zeta da amostra de HA após adsorção de Insulina ao longo do pH.	99
FIG. 6.34	Leituras de Potencial Zeta da amostra de ZnHA após adsorção de Insulina ao longo do pH.	100
FIG. 6.35	Subtração de Espectros de FTIR das amostras de HA antes e após adsorção de Insulina na Região de 1400 a 1750 cm^{-1}	101
FIG. 6.36	Subtração de espectros de FTIR das amostras de ZnHA antes e após adsorção de Insulina na região de 1400 a 1750 cm^{-1}	102
FIG. 6.37	Espectro de UV-Vis da Insulina Humana da Sigma-Aldrich.....	103
FIG. 6.38	Espectro de Uv-Vis da amostra de HA após adsorção de Ins a 37°C.....	103
FIG. 6.39	Espectro de UV-Vis da amostra de Znha após adsorção de Ins a 37°C.	104
FIG. 6.40	Espectro de DC da solução de Insulina Humana (Sigma-Aldrich) 0,1mg/mL em tampão fosfato pH 7.4.	105
FIG. 6.41	Espectro de DC da dispersão em água da amostra de HA + INS.....	106
FIG. 6.42	Espectro de DC da dispersão em água da amostra de ZnHA + INS.	107
FIG. 6.43	Simulação de curva segundo o modelo de Langmuir-Freundlich em experimento de adsorção de Insulina Humana em HA a 37°C.	108

FIG. 6.44 Simulação de curva segundo o modelo Langmuir-Freundlich em experimento de adsorção de Insulina Humana em ZnHA a 37°C..... 109

LISTA DE TABELAS

TAB. 2.1 Parâmetros das Isotermas de Langmuir obtidos pela adsorção de proteínas em amostras de HA e BCP, ZHU <i>et al</i> (2010).	50
TAB. 5.1 Bandas de FTIR características de ligação peptídica	63
TAB. 5.2 Bandas de FTIR relativas à estrutura secundária das proteínas. Adaptado de KONG <i>et al</i> (2007).	64
TAB. 6.1 Parâmetros de rede das amostras de HA and ZnHA obtidos no refinamento do Rietveld.	71
TAB. 6.2 Dimensões de Tamanho de cristalito das amostras de HA e ZnHA obtidos por refinamentos de Rietveld.	72
TAB. 6.3 Valores de deconvolução da banda de Amida I a partir do espectro de subtração da amostra HA + BSA, dados correlacionados a KONG <i>et al</i> (2007) e VAN DER WEET <i>et al</i> (2001).	79
TAB. 6.4 Valores de deconvolução da banda de Amida I a partir do espectro de subtração da amostra ZnHA + BSA.	80
TAB. 6.5 Estimativa de Estrutura Secundária da BSA em solução de 0,1mg/mL em tampão fosfato à partir do espectro de DC e correlação pelo software Dichroweb	85
TAB. 6.6 Estimativa de Estrutura Secundária da BSA adsorvida em HA.	85
TAB. 6.7 Estimativa de Estrutura Secundária da BSA adsorvida em ZnHA.	86
TAB. 6.8 Valores de deconvolução da banda de Amida I a partir do espectro de subtração da amostra HA + Mb.	91
TAB. 6.9 Valores de deconvolução da banda de Amida I a partir do espectro de subtração da amostra ZnHA + Mb.	92
TAB. 6.10 Estimativa de Estrutura Secundária da Mb em solução de 0,1mg/mL em tampão fosfato à partir dos espectro de DC e correlação pelo software Dichroweb.	95
TAB. 6.11 Estimativa de Estrutura Secundária da Mb adsorvida em HA.	96
TAB. 6.12 Estimativa de Estrutura Secundária da Mb adsorvida em ZnHA.	97
TAB. 6.13 Valores de deconvolução da banda de Amida I a partir do espectro de subtração da amostra de HA + Ins.	101
TAB. 6.14 Valores de deconvolução da banda de Amida I a partir do espectro de subtração da amostra ZnHA +Ins.	102

TAB. 6.15 Estimativa de Estrutura Secundária da Insulina Humana (Sigma-Aldrich) em solução de 0,1mg/mL em tampão fosfato à partir dos resultados e correlação pelo software Dichroweb .	105
TAB. 6.16 Estimativa de Estrutura Secundária da Ins adsorvida em HA.	106
TAB. 6.17 Estimativa de Estrutura Secundária da Ins adsorvida em ZnHA.	107
TAB. 6.18 Comparação de resultados de adsorção de BSA, Ins e Mb nas amostras de HA e ZnHA pelas técnicas de FTIR, UV-Vis e DC.	110

LISTA DE ABREVIATURAS

APTES	-	Aminopropiletoxisilano
BET	-	Área Superficial Específica segundo isoterma de BET (Brunauer, Emmett, Teller)
BSA	-	Bovine Serum Albumin
DC	-	Dicroísmo Circular
DRX	-	Difração de Raios X
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
FRX	-	Fluorescência de Raios X
FTIR	-	Fourier Transmission Infrared Analysis
HA	-	Hidroxiapatita Nanoestruturada
Lz	-	Lizosima
Ins	-	Insulina
Mb	-	Mioglobina
NanoCaP	-	Nanopartículas de Hidroxiapatita
RNA	-	Ácido Ribonucleico
ZnHA	-	Zinco-Hidroxiapatita Nanoestruturada
ZnCaP	-	Nanopartículas de Zinco-Hidroxiapatita
TEM	-	Transmission Electron Microscopy

LISTA DE SIGLAS

HA + BSA	Amostra de Hidroxiapatita adsorvida com albumina de soro bovino
ZnHA + BSA	Amostra de Zinco-hidroxiapatita adsorvida com albumina de soro bovino
HA + Mb	Amostra de Hidroxiapatita adsorvida com mioglobina equina
ZnHA + Mb	Amostra de Zinco-hidroxiapatita adsorvida com mioglobina equina
HA + Ins	Amostra de Hidroxiapatita adsorvida com insulina humana
ZnHA + Ins	Amostra de Zinco-hidroxiapatita adsorvida com insulina humana

RESUMO

Os materiais nanoestruturados têm sido uma nova fronteira de estudos em Engenharia dos Materiais. De um lado busca-se conhecer suas propriedades e modular seu desempenho, por outro lado novas exigências do mundo atual ditam novas características necessárias aos materiais para atender a sociedade de uma forma eficiente, segura e sustentável. Considerando a área da Medicina, dentre os materiais nanoestruturados existentes, destacam-se os fosfatos de cálcio, principalmente a hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Esse material é encontrado na sua forma natural em tecidos calcificados, ou obtido sinteticamente por diversas rotas de preparo. Neste trabalho estuda-se o processo de adsorção de Albumina de Soro Bovino (BSA), Mioglobina de Músculo Equino (Mb) e Insulina Humana (Ins) em amostras de Hidroxiapatita nanoestruturada (HA) e Zinco- Hidroxiapatita Nanoestruturada (ZnHA). A análise dos materiais contendo proteínas por espectroscopia por transformada de Fourier no Infravermelho (FTIR), espectroscopia no Ultravioleta-Visível (Uv-Vis) e Dicroísmo Circular (DC), permitiram avaliar as alterações na estrutura secundária das proteínas após adsorção na superfície da HA e ZnHA. Imagens de Microscopia Eletrônica por Transmissão avaliaram a morfologia dos cristais de HA e ZnHA, medidas de Potencial Zeta determinaram alterações na sua carga superficial devido a adsorção de proteínas no meio aquoso. Isothermas de adsorção a 37°C avaliaram a capacidade de adsorção dos materiais estudados. Os resultados indicaram que HA e ZnHA apresentam nanopartículas alongadas formando aglomerados da ordem de microns. A BSA mantém sua estrutura nativa quando adsorvida na HA e ZnHA, a Mb apresenta aumento de estrutura em conformação α -hélice, enquanto que a Ins diminui a sua conformação α -hélice. Transições de conformação α -hélice para estruturas β e vice-versa podem estar envolvidas no processo de adsorção. O processo de adsorção ocorre com formação de multicamadas para todas as amostras contendo proteína, com exceção a amostra de Ins adsorvida em ZnHA, que apresentou um processo de adsorção seguindo o modelo de Langmuir com formação de uma monocamada.

ABSTRACT

Nanostructured materials have been a new frontier studies in Materials Engineering. If one hand it seeks to know its properties and modulate their performance, on the other hand, new requirements nowadays dictate new features that are required for materials to attend the society in an efficiently, safe and sustainable way. Considering the field of medicine, from the existing nanostructured materials, we highlight the calcium phosphates, mainly hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. This material is found in its natural form in calcified tissues, or obtained synthetically by various routes of preparation. In this work we study the adsorption of Bovine Serum Albumin (BSA), myoglobin from equine muscle (Mb) and human insulin (Ins) in samples of nanostructured hydroxyapatite (HA) and Zinc nanostructured hydroxyapatite (ZnHA). Analysis of the materials containing proteins by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Ultraviolet-visible Spectroscopy (UV-Vis), and Circular Dichroism (CD), allowed to evaluate the changes in secondary structure of proteins after the adsorption on the HA and ZnHA surfaces. Images of Transmission Electron Microscopy (TEM) evaluated the morphology of crystals of HA and ZnHA. Zeta Potential measurements determined changes in the ceramics surface charge due to the adsorption of proteins in aqueous medium. Adsorption isotherms at 37 °C evaluated the adsorption capacity of the materials. The results indicated that HA and ZnHA have elongated nanoparticles forming clusters on micrometric scale. The BSA maintains its native structure when adsorbed onto the HA and ZnHA, Mb structure shows increase in α -helix conformation, whereas Ins decreases its α -helical conformation. Conformational transitions on α -helix structures to β and vice versa may be involved in the adsorption process. The adsorption process occurs with the formation of multilayers for all samples containing protein in the sample except Ins adsorbed ZnHA, which showed an adsorption process following the Langmuir model with a monolayer formation.

INTRODUÇÃO

1.1 MATERIAIS NANOESTRUTURADOS

Desde o desafio lançado por Richard Feynman em 1959 na palestra “There’s Plenty of Room at the Bottom”, sobre a possibilidade de reunir a Enciclopedia Britânica na cabeça de um alfinete, muito se desenvolveu na busca de técnicas e equipamentos que apresentem resolução na escala nanométrica. O desafio do caso citado foi solucionado pelo uso de um feixe de elétrons para escrita, técnica que atualmente é utilizada para confecção de máscaras de chips semicondutores (STEVENS, 2010).

A partir dessa nova forma de produção, surgiu uma nova classe de materiais, os nanomateriais, que podem ser definidos como materiais que possuem sua microestrutura com dimensões da ordem de nanômetros (10^{-9} m) em pelo menos uma direção, FIG. 1.1.

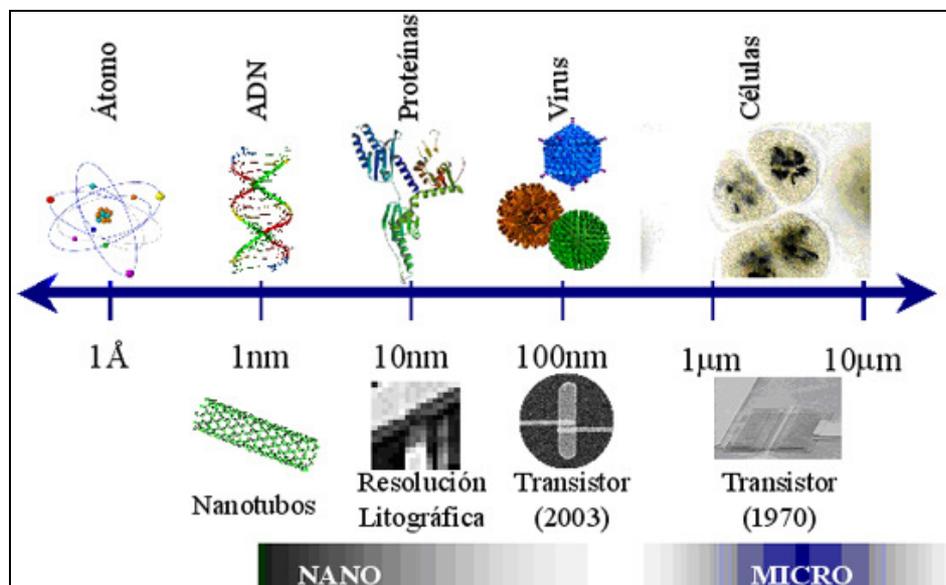


FIG. 1.1- Escala nanométrica de comparação de nanomateriais, componentes biológicos e produtos industriais. Fonte: NITZKE, figura disponível em domínio eletrônico.

Quanto à ocorrência, os nanomateriais podem ser divididos em 3 classes: i) naturais, como as nanopartículas de cinzas produzidas por queimadas e erupções vulcânicas, nanopartículas

de fosfato de cálcio depositadas biologicamente na matriz de tecidos calcificados; ii) resíduos industriais, que são produzidos em processos industriais muitas vezes de forma indesejada, como por exemplo o material particulado de escape de veículos a diesel ou as cinzas do processamento de óleo de xisto; iii) nanoestruturados, que são produzidos especificamente para possuir a dimensão nanométrica, o que lhes conferem propriedades diferenciadas em relação aos materiais tradicionalmente produzidos, como, maior espelhamento de luz na região do ultravioleta, maior dureza e força magnética e dielétrica superior quando comparado aos seus homólogos de dimensões micrométricas (STEVEN, 2006; ELLENBECKER & TSAI, 2011).

Considerando-se o caso dos materiais nanoestruturados, é possível perceber uma grande evolução ao longo da última década, devido ao desenvolvimento combinado de novas rotas de processamento e lançamento de produtos comerciais:

- Nanoestruturas passivas (2001): oriundas da pesquisa primária em materiais nanoestruturados ou via instrumentação e controle dos processos nanométricos, como nanotubos de carbono;

- Nanoestruturas ativas (2005): dispositivos de armazenamento e conversão de energia, instrumentos para a medicina molecular, nanoeletrônica, instrumentos em 3D e fabricação;

- Sistemas nanoestruturados (2010): nanoestruturas heterogêneas, terapia celular com nanodispositivos, interações quânticas de sistemas eletrônicos e eletromecânicos em nanoescala;

- Nanosistemas moleculares (2015): manipulação atômica para a concepção de novos sistemas atômicos e supramoleculares; dinâmica no nível única molécula; design de sistemas moleculares grandes e heterogêneos, (INAIL, 2010).

De acordo com Bystrzejewska-Piotrowska *et al.* (2009), os materiais nanoestruturados podem ser classificados quanto as suas características dimensionais, morfológicas, composição e aglomeração, FIG. 1.2:

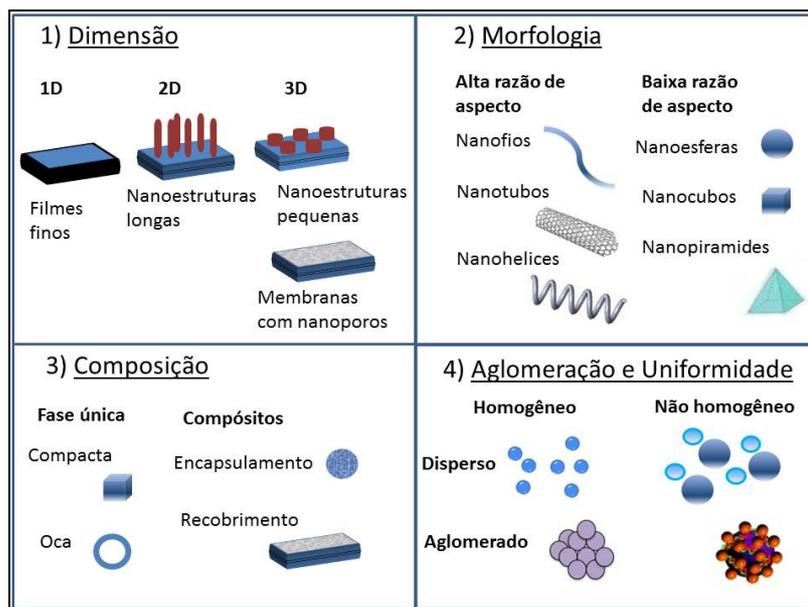


FIG. 1.2 - Classificação de materiais nanoestruturados quanto à: 1) dimensão, 2) morfologia, 3) composição, e 4) aglomeração. Figura adaptada de BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA *et al*, (2009).

O sucesso na produção dessa variedade de materiais deve-se à diversidade de mecanismos de produção, controle de nucleação e de crescimento de partículas, como por exemplo: dispersão coloidal, crescimento anisotrópico, litografia, miniaturização (top-down) e mimetização (bottom-up) (TAWAFI *et al*, 2012; TIWARI *et al*, 2012).

1.2 POTENCIAL TECNOLÓGICO DOS MATERIAIS NANOESTRUTURADOS NA ENGENHARIA

Devido à redução da dimensão, os materiais nanocristalinos apresentam uma fração maior de átomos localizados na superfície, incluindo-se os contornos de grão e interfaces. Desta forma espera-se que muitas propriedades de materiais nanocristalinos, tais como, a ductilidade, a dureza, os módulos elásticos, a difusividade, o calor específico, o coeficiente expansão térmica ou as propriedades magnéticas sejam diferentes em comparação com as os materiais correspondentes volumétricos (“*bulk*”).

O comportamento mecânico dos materiais está basicamente relacionado à resposta em deformação quando submetido à aplicação de uma força. A presença de heterogeneidades

internas (contorno de grão, contorno de fase) e externas (descontinuidades na superfície, carregamento mecânico, abrasão) afeta o comportamento no material.

Considerando a dimensão da microestrutura dos metais, uma relação entre a redução da dimensão do tamanho de grão em materiais policristalinos e o aumento da resistência mecânica foi proposta na década de 50, através da equação (1) de Hall-Petch (GREER *et al*, 2012):

$$\sigma_e = \sigma_0 + K_e \cdot d^{-1/2} \quad (1)$$

onde σ_0 e K_e são constantes que dependem do material e σ_e é o limite de escoamento, isto é a tensão máxima que o material suporta ainda no regime elástico de deformação. Esse comportamento ocorre geralmente em metais até um limite de 20-30 nm de tamanho de grão, devido ao acúmulo de discordâncias no contorno de grão, que provoca o aumento da resistência ao escoamento. Abaixo desse valor limite de tamanho de grão, o deslizamento no contorno de grão é limitado e a difusão atômica ou migração de volume por tensão no contorno de grão contribui para a deformação plástica (CHOI *et al*, 2011).

A FIG. 1.3 ilustra a relação entre a resistência à tração e dimensão de tamanho de grão de amostras de liga de alumínio na faixa de milímetros a nanômetros. Valores máximos de resistência à tração em torno de 1500 MPa foram obtidos para as ligas de alumínio nanoestruturadas. Este resultado foi superior ao das ligas de alumínio convencionais, ligas Ti-Al-V e ligas de grãos ultrafinos (UGF) (PEREPEZKO & HERBERT, 2002).

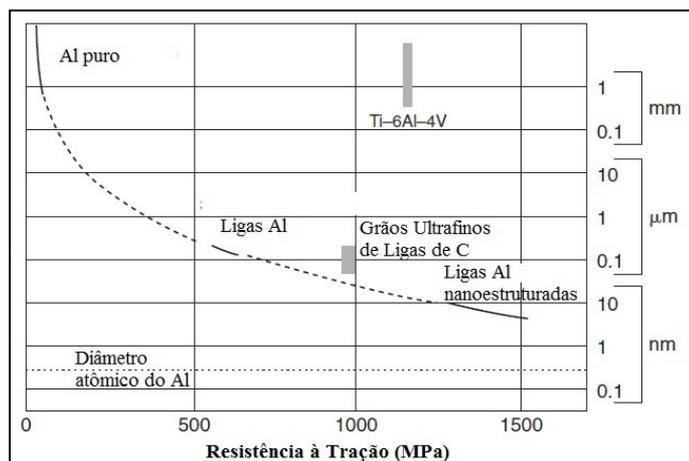


FIG. 1.3 – Relação entre dimensão de microestrutura e resistência à tração em ligas de alumínio (convencionais, Ti-Al-V, grãos ultrafinos UGF e nanoestruturadas). Figura adaptada de PEREPEZKO & HERBERT, 2002.

Outra característica presente em ligas de alumínio com grãos nanométricos refere-se à superplasticidade, sendo possível alcançar valores de até 600% de deformação plástica a 500° C, para amostras com grãos com dimensões de cerca de 20 nm. A mesma liga com tamanho de grão na faixa micrométrica apresenta superplasticidade apenas na faixa de 900-950°C. Essa propriedade apresenta grande aplicação para a indústria automobilística e aeronáutica na fabricação de peças complexas por ação de calor e pressão numa única etapa com qualidade, baixo peso e custo (MAYO, 1999).

1.3 POTENCIAL TECNOLÓGICO DOS MATERIAIS NANOESTRUTURADOS NA MEDICINA

Os recentes avanços em materiais nanoestruturados para aplicações médicas foram alcançados a partir: i) da evolução de novas técnicas de processamento e de caracterização de materiais; ii) do maior conhecimento do seu comportamento físico; iii) do maior conhecimento das propriedades biológicas de biomoléculas como, proteínas, vírus e DNA; e iv) do melhor entendimento da interação de materiais nanoestruturados com essas biomoléculas (NARAYAN, 2004).

Partindo desse ponto de vista, o entendimento da fisiologia dos tecidos desde o seu estudo macroscópico até a escala nanométrica, pode auxiliar no desenvolvimento de materiais capazes de estimular processos biológicos, ou até mesmo no processo de regeneração de tecidos, através da produção de materiais biomimeticamente nanoestruturados. O estudo do tecido ósseo torna-se um bom exemplo nesse sentido, pois este é formado principalmente por uma fase mineral de apatita carbonatada e uma fase orgânica de colágeno tipo I. Os cristais da fase mineral de apatita possuem dimensões nanométricas (~5 x70 nm) posicionados nas extremidades das cadeias de colágeno (~300 nm) FIG. 1.4. A estreita interação entre a fase mineral e o colágeno, o seu processo de maturação ao longo do tempo e o desenvolvimento hierárquico dessa macro e nanoestrutura, permite propor a formação do tecido ósseo como um processo de cristalização geneticamente controlado, e como um dos mais antigos exemplos de biomineralização na evolução animal (HEREDIA *et al*, 2013; KHANG *et al*, 2010; ALMORA-BARRIOS & DE LEEUEW, 2012).

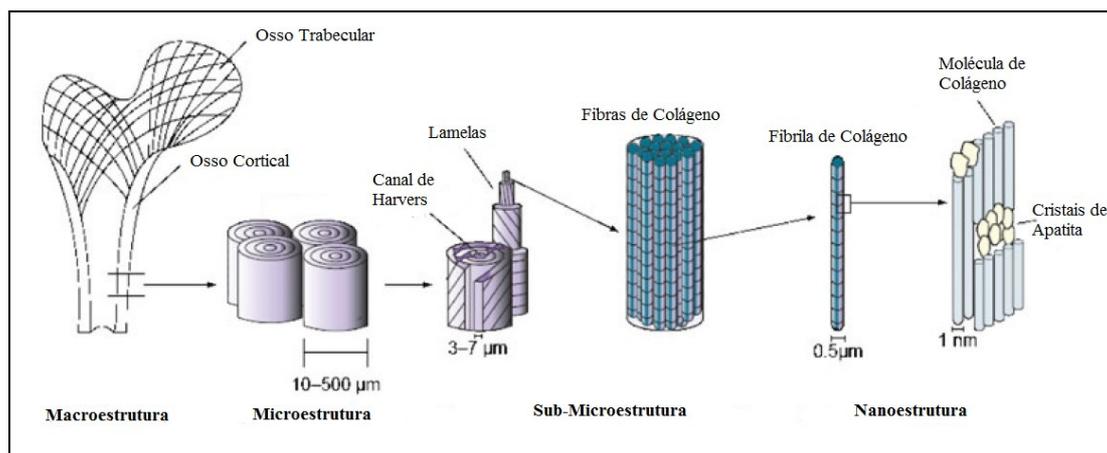


FIG. 1.4- Estrutura hierárquica do osso em macro e nanoescala. Figura adaptada de KHANG *et al*, 2010.

A hidroxiapatita, cuja fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ pertence à classe das apatitas e apresenta características similares à fase mineral do tecido ósseo. Na sua forma sintética é obtida de forma nanoestruturada, e quando convertida a material cerâmico, tem sido amplamente empregada para aplicações em medicina e odontologia como substituinte do tecido ósseo. Os parâmetros de rede dos cristais de hidroxiapatita são: $a = b = 9,4302 \text{ \AA}$, $c = 6,8911 \text{ \AA}$ e $\gamma = 120^\circ$, apresentando estrutura hexagonal, com grupo espacial $P6_3/m$, FIG. 1.5.

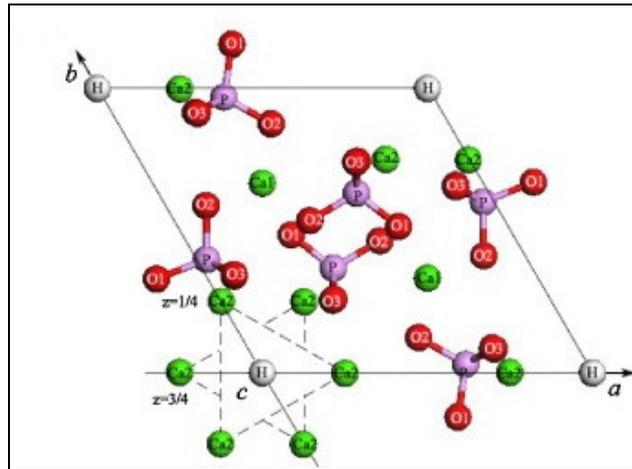


FIG. 1.5 – Esquema da vista de topo da célula unitária da hidroxiapatita hexagonal [LOUA *et al*, 2012).

Considerando a estrutura hexagonal, as principais faces dos cristais da HA podem ser descritos especialmente pelos planos {010}, {101}, {010}, e pelos planos terminais {100}-T1, {001}-T2 em seus extremos, como mostrado na FIG. 1.6 (MASICA *et al*, 2010).

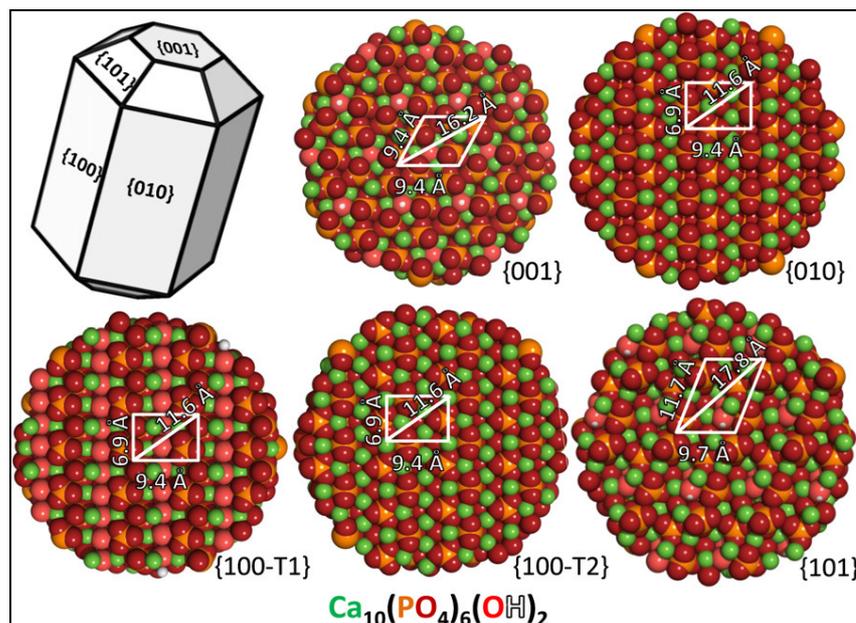
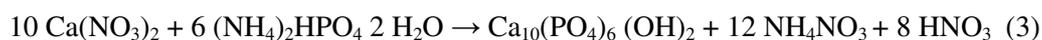
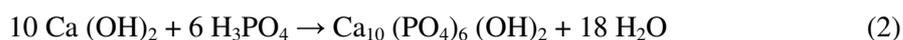


FIG. 1.6 - Principais planos cristalinos da estrutura hexagonal da Hidroxiapatita, (MASICA *et al*, 2010).

Várias formas de produção têm sido desenvolvidas para a síntese de pós de hidroxiapatita, sendo empregadas: a precipitação, a reação hidrotermal, o método de sol-gel e a microemulsão. No caso da via de precipitação química, em meio aquoso, as rotas mais utilizadas seguem principalmente duas reações químicas (2) e (3):



A reação 1 envolve um mecanismo de precipitação-dissolução, em que o ácido fosfórico dissolve o hidróxido de cálcio, Ca(OH)_2 , para formar hidroxiapatita. A reação 2 envolve um processo de precipitação, em que um sal de nitrato de cálcio, $\text{Ca(NO}_3)_2$, reage com uma base para formar a hidroxiapatita. Ambas as rotas requerem um controle de pH elevado, a fim de obter a hidroxiapatita, pois em condições de pH neutro ou levemente ácido formam-se outros compostos de fosfatos de cálcio. Um exemplo deste fato, seria a formação da hidroxiapatita em meio contendo ácido láctico, seguindo a reação 1. Neste caso, tem-se a formação de um material intermediário (monetita, CaHPO_4), que será gradualmente convertido em hidroxiapatita com o aumento do pH. (NARAYAN, 2004; KEDE *et al*, 2012).

Nanopartículas de hidroxiapatita (NanoCaP) tem se mostrado eficazes como transportadoras de biomoléculas, como DNA (ácido desoxirribonucleico) e proteínas. O tamanho e a forma dessas nanopartículas podem ser controlados, impedindo a ativação do sistema imunológico, e diminuindo, portanto, o risco de reações adversas no organismo. Atualmente estudos estão sendo efetuados com a utilização de hidroxiapatita como um transportador de DNA via processos de transfecção em células animais.

O processo de entrada do DNA em uma célula, atravessando a membrana plasmática e seguindo por todo o caminho para o núcleo é chamado transfecção. O DNA é então reconhecido pela célula e a biossíntese da proteína desejada é iniciada. Dessa forma, promove-se, via ação biológica, a produção de uma determinada proteína no organismo, sendo esse o principal foco da terapia gênica. A introdução de sequências genéticas desejadas em células de mamíferos pode ser realizada por agentes virais, polímeros ou nanopartículas inorgânicas, como por exemplo, ouro, magnetita e fosfatos de cálcio. Esses últimos apresentam grande interesse devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (TABAKOVIC *et al*, 2012).

Experimentos *in vitro* indicaram taxas de transfecção muito boas usando pós de NanoCaP. A eficiência da transfecção pode ser aumentada consideravelmente com a adição de uma nova

camada de fosfato de cálcio sobre as nanopartículas de NanoCaP recobertas com o DNA, prevenindo a sua degradação no interior da célula por organelas do tipo lisossomas, e de uma camada mais externa subsequente de DNA sobre as NanoCaP, oferecendo uma estabilização coloidal, tendo-se, portanto, multi-revestimentos.

A FIG. 1.7 mostra imagens de microscopia ótica e de microscopia de fluorescência de células que foram transfectadas com um fragmento de DNA (pcDNA3 –EGFP) que induz a produção de uma proteína fluorescente, o que facilita sua visualização ao término do experimento. As células ao adquirir tal capacidade, podem ser observadas por microscopia de fluorescência. Os resultados indicaram que as células transfectadas com partículas multirevestidas de NanoCaP apresentaram um grau superior de transfecção (SOKOLOVA *et al*, 2006).

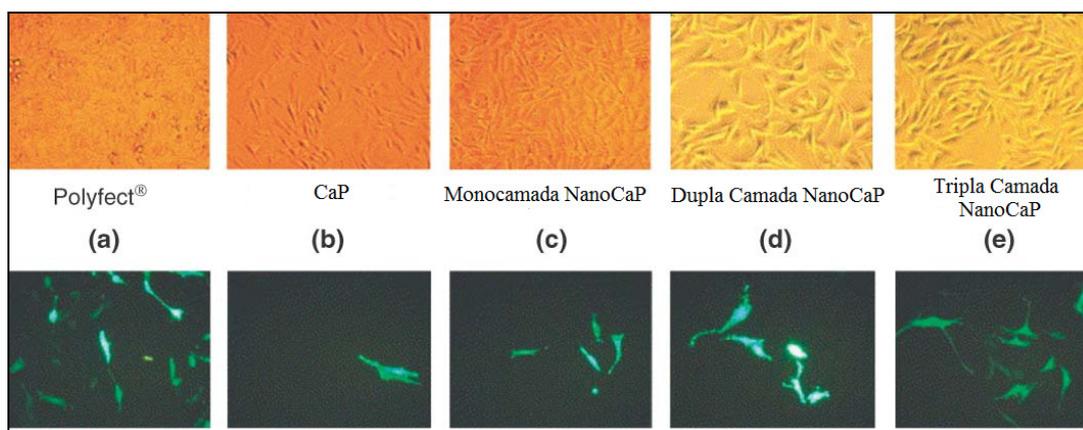


FIG. 1.7 - Microscopia ótica de Campo Claro (superior) e microscopia de fluorescência de amostras contendo proteína fluorescente verde (EGFP) (inferior), mostrando a morfologia das células e fluorescência após transfecção com DNA e material padrão (Polyfect), e com DNA revestido com camadas de NanoCaP (SOKOLOVA *et al*, 2006).

Como transportadores de droga, as nanopartículas de fosfato de cálcio tem algumas propriedades vantajosas. Eles são dissolvidos a um pH baixo (cerca de 4), por exemplo nos lisossomas, após a ingestão celular ou no ambiente de tumores sólidos, liberando, assim, fármacos incorporados ou biomoléculas. O seu tamanho pode ser facilmente controlado por agentes estabilizantes, tais como polímeros ou ácidos nucleicos.

As NanoCaP podem também atuar como transportadores para fármacos, como por exemplo, a insulina [20]. O trabalho de PAUL & SHARMA em 2012 ilustra a aplicação de

insulina em ratos diabéticos, a partir de nanopartículas de fosfatos de cálcio modificadas com zinco (ZnCaP) e recobertas com alginato, administradas por via oral. A escolha de um fosfato de cálcio com substituição parcial de cálcio pelo elemento zinco ocorreu devido à estabilização estrutural da insulina na presença desse elemento. A insulina na presença de zinco forma hexâmeros tanto no meio biológico quanto em soluções aquosas com concentrações acima de 1mgmL^{-1} .

O zinco é um metal não-tóxico, sendo encontrado em diversas enzimas, que desempenham funções variadas no organismo. De acordo com HAAS & FRANZ, 2009 a sua alta incidência em biomoléculas ocorre devido a sua capacidade de realizar múltiplas ligações com macromoléculas, isto é, número de coordenação, pois seu íon Zn^{2+} possui estado de oxidação estável e configuração eletrônica d^{10} , sem uma preferência de geometria de ligação de campo. Desta forma o zinco participa do metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos, etc. No caso das proteínas, o zinco encontra-se coordenado a aminoácidos específicos como a histidina e a cisteína, e em algumas vezes com a molécula de água, como mostrado na FIG. 1.8 a partir do trabalho de MARET & LI, 2009.

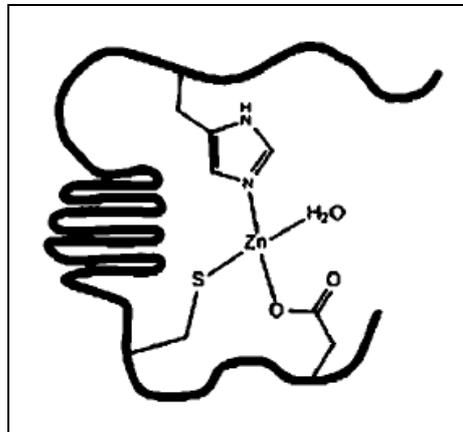


FIG. 1.8 - Esquema de múltiplas ligações do zinco com uma enzima (biomolécula) com número de coordenação 4 (quatro), (MARET & LI, 2009).

O mapeamento por espectroscopia Raman mostrou que o material composto de nanopartículas de ZnCaP e alginato apresentou dissolução diferenciada dependendo do pH do meio (FIG. 1.9). Considerando a cor vermelha como sinal de bandas vibracionais de fosfato e verde para o sinal de bandas de grupos carbonila presentes no alginato, percebe-se que em meio ácido, similar ao ambiente estomacal, ocorreu a predominância de alginato (em verde),

enquanto que em meio neutro, similar ao fluido biológico, ocorreu a predominância de ZnCaP (em vermelho).

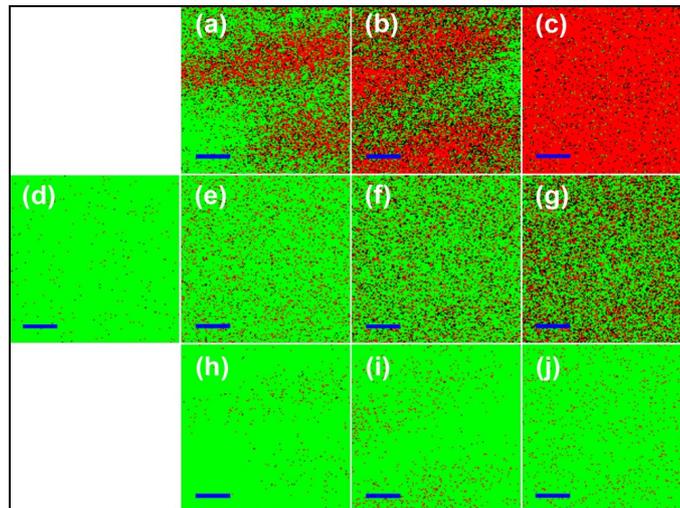


FIG. 1.9 - Mapeamento de ZnCaP recobertos com alginato: a) 1h, b) 3h, c) 8h em pH 7,4, e) 1h, f) 3h, g) 8h em pH 6,8; h) 1h, i) 3h, j) 8h em pH 1,2, e d) amostra inicial de ZnCaP recoberta com alginato, (PAUL & SHARMA, 2012).

Considerando testes *in vivo*, a aplicação via oral de composto de nanopartículas ZnCaP e alginato contendo insulina indicou uma acentuada queda no nível de insulina no sangue em ratos diabéticos nas primeiras 8hs de ensaio (FIG. 1.10). Este resultado indicou uma boa eficiência na administração de insulina via oral. Tem-se um efeito balanceado, onde a estrutura enovelada do alginato confere a capacidade de constrição em pH ácido, de forma a aprisionar a insulina no meio estomacal, e por outro lado, a degradação do alginato em meio neutro a levemente alcalino, facilita a sua liberação pela via intestinal.

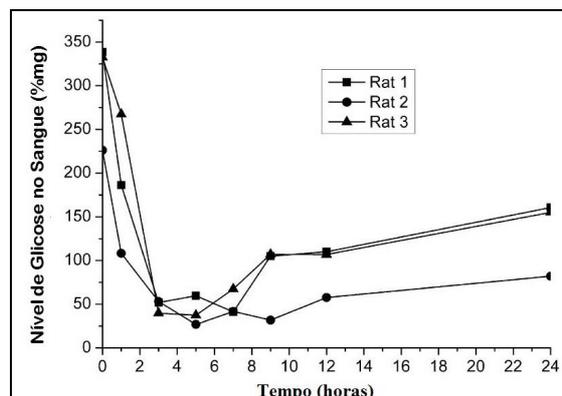


FIG. 1.10 - Nível de glicose no sangue em três ratos diabéticos (Rat 1, Rat 2 e Rat 3) ao longo do tempo após administração via oral de nanopartículas de ZnCaP contendo insulina, (PAUL & SHARMA, 2012).

Desta forma, percebe-se uma variedade de aplicações das nanopartículas e materiais nanoestruturados associados a biomoléculas na Medicina. O estudo de formas de associação entre materiais nanoestruturados e biomoléculas é, portanto, de grande importância a fim de estabelecer metodologias e facilitar o seu emprego de modo seguro e controlado na área de saúde.

2. IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM MATERIAIS NANOESTRUTURADOS

A imobilização de biomoléculas em materiais nanoestruturados possibilita aplicações em diferentes áreas, como, biotecnologia, biocatálise, biosensores e sistemas de liberação controlada. De modo geral, a grande área específica dos materiais nanoestruturados é o fator que permite um número maior de pontos de ancoragem, facilitando a associação de grandes biomoléculas. No entanto a composição e a estrutura dos materiais nanoestruturados influencia o tipo de interação, a orientação e a atividade biológica das biomoléculas, tornando a seleção desses materiais uma etapa de grande importância.

Os materiais empregados na imobilização de biomoléculas devem possuir as seguintes propriedades: (a) biocompatibilidade, (b) disponibilidade de grupos funcionais reativos necessários para a ligação ou devem ser facilmente funcionalizados, (c) estabilidade com alterações no microambiente (pH, força iônica), (d) assegurar a estabilidade da biomolécula e evitar lixiviação, (e) baixo custo e facilidade de preparação e (f) uso de reagentes não-tóxicos para a imobilização das biomoléculas (ANDREESCU *et al*, 2007).

A FIG. 2.1 apresenta os vários métodos que podem ser utilizados na imobilização de proteínas sobre a superfície dos materiais. Tais métodos são brevemente descritos abaixo:

Adsorção física - consiste na deposição simples da biomolécula sobre um suporte. Devido a fraca força de ligação envolvida, essa forma de imobilização torna a biomolécula mais susceptível a variações de pH, de temperatura, de solvente e de fortes alterações iônicas. Além disso, não proporciona um aumento da atividade biológica ou estabilidade operacional para um armazenamento a longo prazo (KARAJANAGI *et al*, 2004).

Ligação covalente - a imobilização por ligação covalente ocorre geralmente em duas etapas. A primeira envolve a ativação ou funcionalização da superfície do material para aumentar sua reatividade química (adição de grupos bifuncionais ou espaçadores, tais como

glutaraldeído, carbodiimida/succinimida ou aminopropiltriétoxissilano, i.e. APTES). O segundo passo consiste em ligar a biomolécula a esta superfície quimicamente ativada. A química envolvida no processo de imobilização depende do tipo de material utilizado e das suas características de superfície. Esse processo permite muitas vezes o aumento da estabilidade da biomolécula devido à ligação química forte. No entanto, uma redução na atividade da biomolécula poderá ocorrer, caso o processo de imobilização envolver a ligação entre os grupos essenciais para a atividade da biomolécula e a superfície ativada (GOMES, 2009).

Aprisionamento físico Um dos métodos mais simples de imobilização de enzimas é por aprisionamento físico dentro de um material inerte (por exemplo, monômeros polimerizáveis, matrizes de sol-gel). No entanto, em alguns casos a atividade da enzima pode ser afetada pelas propriedades físicas e químicas da matriz de imobilização. Este método tem algumas vantagens sobre os outros processos, tais como condições de baixo custo e alta estabilidade de enzima encapsulada. As limitações do método ocorrem principalmente devido a barreira de difusão no transporte do substrato e à possível lixiviação da biomolécula. Exemplos de materiais utilizados para encapsulamento incluem polímeros fotopolimerizáveis ou reticulados quimicamente (isto é, alginato e látex), polímeros eletroquimicamente preparados (polipirrol, poliacetileno polianilina e politiofeno) e argilas inorgânicas (ADNADJEVIC & JOVANOVIC, 2009).

Langmuir-Blodgett - envolve a formação de uma monocamada da biomolécula sobre a interface líquido-ar, seguido da transferência do filme formado para um suporte por um processo de imersão/emersão vertical. Atualmente este método de imobilização vem sendo estudado na elaboração de biossensores pelas possibilidades de controlar o ordenamento dos filmes a nível molecular e de fabricar estruturas multicamadas (AGUILAR, 2009).

Método de afinidade - esse método permite criar uma ligação de bio-afinidade entre um suporte ativado e um grupo específico de uma sequência presente na cadeia proteica. Os exemplos específicos de interações de afinidade incluem imobilização de enzimas que possuam grupos imidazol e tiol que se ligam facilmente a suportes contendo íons metálicos, como zinco e cobre, ou suportes contendo anticorpos policlonais ou monoclonais (PORATH & OLIN, 1983).

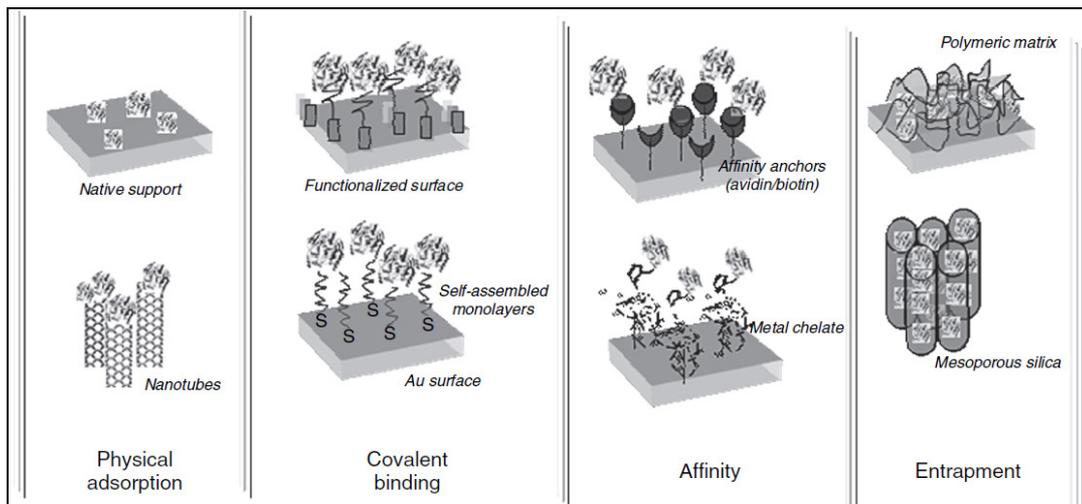


FIG. 2.1- Representação esquemática de várias estratégias de imobilização de biomoléculas, (ANDREESCU et al, 2007).

2.1 PROTEÍNAS: FORMAÇÃO BIOLÓGICA E PROPRIEDADES

As proteínas são formadas biologicamente através dos processos de tradução e transcrição do DNA celular. O DNA apresenta em sua sequência regiões que contem a informação para a síntese de diversas proteínas do organismo. No fenômeno de transcrição, uma determinada região do DNA será utilizada como molde para síntese de uma sequência complementar de RNA chamada de RNA mensageiro. No fenômeno de tradução, a molécula de RNA mensageiro, vai ser metabolizada transferindo suas informações para a síntese de proteína (ALBERTS *et al*, 2006) FIG. 2.2.

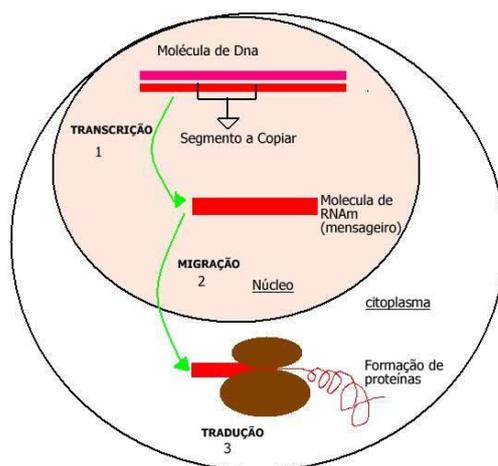


FIG. 2.2 – Esquema dos fenômenos de transcrição e tradução do DNA para síntese proteica no interior da célula (figura disponível em domínio eletrônico).

As proteínas são moléculas orgânicas presentes no ambiente biológico tanto intracelular quanto extracelular. São constituídas de aminoácidos ligados por ligações peptídicas formando uma longa cadeia polipeptídica, onde a sequência de aminoácidos origina a estrutura primária da proteína (FIG. 2.3).

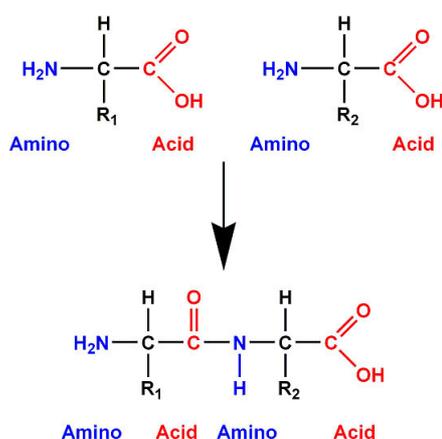


FIG. 2.3 – Formação da ligação peptídica a partir de dois aminoácidos, constituindo a cadeia primária proteica (figura disponível em: <http://www.infoescola.com/bioquimica/ligacao-peptidica/>).

Os aminoácidos são moléculas orgânicas que contêm um grupo amina, um grupo carboxila e uma cadeia lateral R, que é específica para cada aminoácido e lhe confere características de polaridade e acidez. Existem 21 aminoácidos, sendo que o organismo humano é capaz de sintetizar apenas 6 deles, chamados de aminoácidos não essenciais: alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, cistina, serina e tirosina. Os demais aminoácidos

são adquiridos pela alimentação, i.e., essenciais: fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano, histidina, valina, arginina, cisteína, glicina, glutamina, prolina, hidroxiprolina (ALBERTS *et al*, 2006).

De acordo com a sequência de aminoácidos existente na estrutura da proteína, grupos químicos ativos estarão distribuídos espacialmente de forma variada, conferindo-lhe características hidrofóbicas e hidrofílicas, além de carga, tornando-as positivamente carregadas, negativamente carregadas ou neutras. Portanto, a partir da sequência de aminoácidos, a cadeia polipeptídica apresentará especificidade e uma conformação espacial diferenciada. Os tipos básicos de conformação encontrados são: a α -hélice e a folha- β FIG. 2.4.

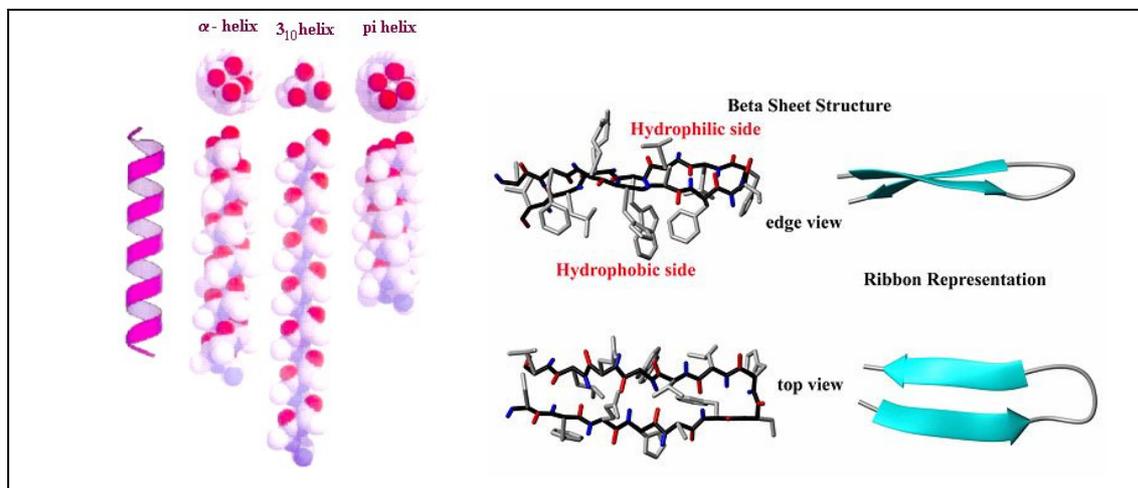


FIG. 2.4 - Estrutura Secundária da Proteína: conformação α -hélice e conformação folha- β , (figura disponível em http://en.citizendium.org/wiki/Protein_structure).

O alinhamento de duas α -hélices muitas vezes ocorre em condições onde cada cadeia polipeptídica assume direções opostas para reduzir a interação dipolo-dipolo. O dipolo de cada hélice é causado pelo alinhamento de ligações polares no interior da hélice. Além disso, frequentemente, um lado de uma α -hélice é hidrofóbico, enquanto o outro lado é hidrofílico. Essa mesma característica ocorre na conformação de folha- β , de forma a acomodar as interações entre elas, onde os aminoácidos hidrofóbicos situam-se no interior da estrutura enovelada final de cadeias polipeptídicas, deixando os aminoácidos hidrofílicos expostos ao meio aquoso. As extremidades das conformações em folha- β apresentam muitas vezes conformações mais retorcidas denominadas de alça- β (ALBERTS *et al*, 2006; QUINTAS *et al*, 2008).

2.2 MECANISMOS DE ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS

O processo de adsorção de proteínas em superfícies hidrofílicas tende a ser mais fraco do que em superfícies hidrofóbicas. Isso se deve ao fato da adsorção em superfícies carregadas, hidrofílicas, ter forte influência de fatores externos, como: a carga da proteína, o pH do meio, a carga da superfície e a força iônica. Considerando uma superfície hidrofóbica, haverá um ganho na entropia do sistema devido à liberação de moléculas de água que solvatam a molécula da proteína e que gradualmente serão substituídas por ligações com a superfície. De uma maneira geral, o processo de adsorção envolve 5 etapas principais como mostrado na FIG. 2.5 (ROACH *et al*, 2005; NORDE *et al*, 2005):

- 1) Transporte da proteína até a superfície;
- 2) Ancoragem da proteína na superfície;
- 3) Mudança conformacional da proteína;
- 4) Dessorção da proteína;
- 5) Transporte da superfície para o meio.

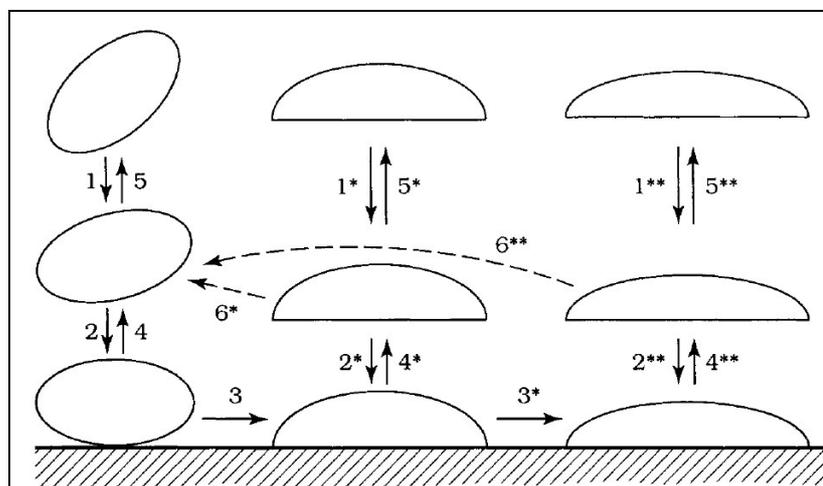


FIG. 2.5 – Etapas do processo de adsorção de proteínas (NORDE *et al*, 2005).

Vale ressaltar que nem toda aproximação da proteína à superfície levará a uma efetiva adsorção, uma vez que as faces externas das proteínas são diferentes. De um modo geral, a proteína apresenta domínios espaciais com características químicas diferentes. De acordo com os grupos ativos expostos na superfície da proteína e as características do meio haverá o

predomínio de domínios hidrofóbicos e hidrofílicos positivamente carregados, negativamente carregados e neutros.

A formação de uma camada proteica na superfície de um material provoca mudanças importantes na distribuição de carga da superfície do material, na capacidade de formação de ligações de H, interações eletrostáticas ou de Van der Waals, e conseqüentemente, na capacidade dessa nova superfície interagir com o ambiente químico e/ou biológico (NORDE *et al*, 2005).

Os estudos de adsorção de proteínas podem ser divididos em duas categorias: termodinâmicos e cinéticos. Os modelos termodinâmicos representam os aspectos energéticos envolvidos na adsorção de proteínas e preveem o estado de equilíbrio final, verificando normalmente a força de ligação e constantes de afinidade. Os modelos cinéticos descrevem os fenômenos ocorridos durante a adsorção ou dessorção. Esses normalmente começam considerando uma superfície intacta do material e seguem avaliando o grau de adsorção da proteína ao longo do tempo até que a superfície esteja saturada (FERNOGLIO *et al*, 2011). Vale a pena ressaltar, no entanto, que um modelo é uma construção teórica pautada na simplificação de um sistema real, e que ao mesmo tempo, tenta levantar os principais parâmetros que governam um determinado evento.

A isoterma de adsorção é usada para comparar a capacidade de adsorção de adsorventes em um material após atingir o equilíbrio. Existem duas categorias de adsorção: física e química. No caso de adsorção física, as interações entre o adsorbato e o adsorvente são fracas, envolvendo menores valores de energia de ligação. A adsorção química envolve interações com valores de energia superiores, tais como aqueles que operam na formação de ligações químicas covalentes entre o adsorbato e o adsorvente FIG. 2.6 (FIGUEIREDO, 2008).

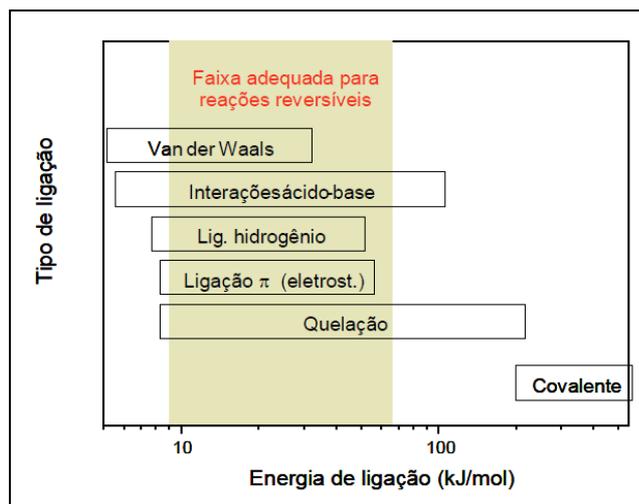


FIG. 2.6 – Gráfico de energia de ligação de acordo com tipos de interações fracas e fortes entre moléculas (FIGUEIREDO, 2008).

Três fenômenos podem estar envolvidos na adsorção física: adsorção monomolecular, adsorção multimolecular e condensação nos poros ou capilares. Assim, a interpretação de estudos de adsorção pode ser difícil. Brunauer *et al* classificaram as isotermas de adsorção física em cinco tipos mostrados na FIG. 2.7. As principais variações encontradas, que determinam a evolução da isoterma obtida são: a formação de mono ou multicamadas, equiparidade energética nas moléculas adsorvidas e prévia dimerização das moléculas durante a adsorção (KHALFAUOUI *et al*, 2003).

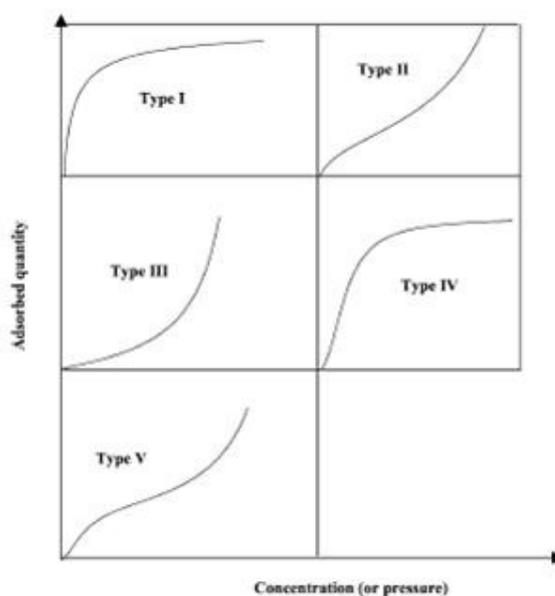


FIG. 2.7 - Os cinco tipos de isotermas segundo a classificação de Brunauer, Emmett, and Teller.

No caso dos modelos termodinâmicos, geralmente utilizam-se curvas de isotermas (temperatura constante), onde para uma dada concentração inicial de proteína, avalia-se o grau de adsorção após se alcançar o equilíbrio em tempos longos. Uma série de dados sobre a isoterma de adsorção até agora observados indicam que quanto maior a concentração em massa, maior a quantidade de proteína adsorvida, atingindo-se um nível de saturação. Portanto, os dados de adsorção às vezes são tratados com base em uma isoterma de adsorção de Langmuir (RABE *et al*, 2011).

A isoterma de Langmuir supõe, teoricamente, que a adsorção ocorre em sítios uniformemente distribuídos com igual energia de superfície, formando uma cobertura de superfície em monocamada, sem interações entre moléculas adsorvidas. O modelo de Langmuir pode ser descrito pela equação (4):

$$a = a_m K_{ce} / (1 + K_{ce}) \quad (4)$$

onde **a** (mmol L⁻¹) é a concentração do adsorbato sobre uma superfície de adsorvente ao atingir o equilíbrio, **c_e** (mmol L⁻¹) é a concentração do adsorbato em solução no equilíbrio. A constante **K** é a constante de equilíbrio que representa a afinidade entre a superfície do adsorvente e o adsorbato e **a_m** é a quantidade máxima adsorvida na superfície (mg/m²).

Um segundo modelo utilizado em estudos de adsorção é o modelo de isotermas de Freundlich, o qual pode ser expresso pela equação (5):

$$a = K c_e^{1/p} \quad (5)$$

onde **a** (mmol L⁻¹) é a concentração do adsorbato sobre uma superfície de adsorvente ao atingir o equilíbrio, **c_e** (mmol L⁻¹) é a concentração do adsorbato em solução no equilíbrio, **K** é a constante de equilíbrio entre a superfície do adsorvente e o adsorbato, e **p** é um parâmetro de energia, neste caso considera-se a formação de multicamadas de adsorbato. O modelo de Freundlich não apresenta uma saturação da superfície do adsorvente, a quantidade adsorvida aumenta indefinidamente com a concentração em solução.

A isoterma de Langmuir-Freundlich é uma simples generalização de ambos os modelos apresentados acima, sendo utilizado a equação (6) para descrever este modelo de isoterma (PRAUS & TURICOVA, 2007):

$$a = a_m (Kc_e)^r / [1 + (Kc_e)^r] \quad (6)$$

onde a (mmol L^{-1}) é a concentração do adsorbato sobre uma superfície de adsorvente ao atingir o equilíbrio, c_e (mmol L^{-1}) é a concentração do adsorbato em solução no equilíbrio, K é a constante de afinidade que inclui a contribuição de estados distintos de adsorbato, neste caso poderia ser considerado a proteína na forma de monômero, dímero-monômero, ou outras forma de associação. O coeficiente r representa a cooperatividade presente na interação da superfície do adsorvente e adsorbato ($r = 1$ representa nenhuma cooperatividade, $r > 1$ a cooperatividade positiva e $0 < r < 1$ a cooperatividade negativa) e a_m representa o número máximo de sítios de ligação ou a quantidade de proteína adsorvida se cada local de adsorção disponível for ocupado por uma molécula de proteína (SHARMA & AGARWAL, 2001).

É importante ressaltar que a adsorção de proteínas ocorre normalmente de forma irreversível, mesmo à temperatura ambiente. Assim, o uso da equação de Langmuir para interpretar os dados de adsorção muitas vezes é incorreto. Por outro lado, no caso do processo de adsorção abranger a interação de proteínas pouco flexíveis em uma superfície hidrofílica com carga oposta, tem-se apenas o efeito de atração eletrostática garantindo o processo de adsorção, sendo assim possível considerar o emprego da equação de Langmuir.

A irreversibilidade da adsorção pode surgir de várias causas, embora os detalhes ainda não sejam conhecidos. No caso de superfícies hidrofóbicas, considera-se que, ao aumentar o período de adsorção, a proteína sofre uma deformação estrutural, onde a sua parte hidrofóbica se contrai para interagir com uma região hidrofóbica da superfície, resultando em um processo de ancoragem com mais pontos de interação (NAKANISHI *et al*, 2001).

2.3 ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS EM HIDROXIAPATITA

O estudo de adsorção de proteínas pela hidroxiapatita é de grande relevância na busca de um biomaterial, que, além de apresentar características de biocompatibilidade e osteocondução, permita a regeneração do tecido ósseo na região do implante. Esse é o foco

dos estudos de biomateriais de terceira geração, que tem como base o conceito de promover a regeneração a partir da Engenharia de Tecidos.

A revisão de WANG *et al* (2012) sobre esse assunto lista as principais biocerâmicas utilizadas em preenchimento ósseos e recobrimentos de superfícies metálicas de implantes ósseos. Destacam-se os fosfatos de cálcio, principalmente a Hidroxiapatita, a zircônia (ZrO_2), a titânia (TiO_2) e os biovidros. As principais características desejadas para um bom desempenho na adsorção de proteínas são resumidas por WANG *et al*, 2012, como sendo:

Topografia - efeito da relação entre a continuidade da superfície, a dimensão da proteína e a forma de ancoragem por interação química e/ou aprisionamento. De modo geral, quanto maior a nanorugosidade, a microporosidade (< 2 nm), e área específica, maior a capacidade de adsorção de proteína pelo material;

Composição – efeito da natureza química de interação entre a superfície do material e a proteína, uma vez que a cadeia polipeptídica apresenta grupos funcionais polares de caráter ácido ou básico, além de grupos funcionais apolares, que serão mais ou menos reativos de acordo com a natureza química do material;

Heterogeneidade – a presença de vacâncias ou defeitos produzidos por substituições iônicas na rede do material afetam a capacidade de adsorção devido à alteração de distribuição de sítios ativos ou densidade de carga na superfície do material.

De fato, estas características estão relacionadas entre si, permitindo a proteína reconhecer mais ou menos sítios de ancoragem e realizar ligações fracas ou fortes. A FIG. 2.8 (a-b) ilustra a distribuição do potencial eletrostático de cristais de hidroxiapatita nas superfícies {001} e {010}, e conseqüentemente a distribuição de cargas, e possíveis sítios de ligação presentes na superfície do material. Na mesma FIG. 2.8 (c e d), observa-se uma alteração dessa distribuição gerada pela substituição de grupos fosfato por carbonato (CORDEIRO & GRANJEIRO, 2010).

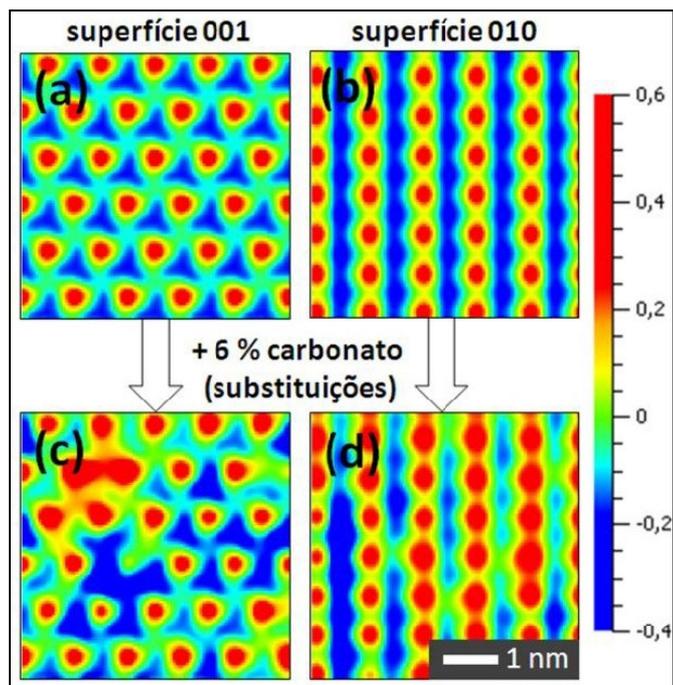


FIG. 2.8 - Perfis de potencial eletrostáticos das superfícies (a) (001) e (b) (010) de hidroxiapatita pura, em comparação com superfícies (c) (001) e (d) (010) de hidroxiapatita carbonatada, adotando-se como base de cálculo uma carga de prova positiva e unitária a 2\AA de distância. A escala em cores do potencial eletrostático é dada em unidades de $e^2/(4\pi\epsilon_0)$, em que e representa a carga elementar e ϵ_0 a permissividade elétrica do vácuo (CORDEIRO & GRANJEIRO, 2010).

Por outro lado, as propriedades das proteínas também podem favorecer o processo de adsorção, sendo as principais:

Dimensão – as proteínas com maiores dimensões apresentam um número maior de sítios para se ancorarem na superfície do material, facilitando o processo de adsorção.

Carga – as proteínas apresentam em sua cadeia polipeptídica aminoácidos distintos com caráter ácido, neutros ou básicos. Dessa forma, o processo de adsorção poderá ocorrer mesmo em valores de pH onde a carga total da proteína possui o mesmo sinal que a superfície do material.

Estabilidade estrutural – as proteínas que apresentam maior percentual de estrutura secundária em α -hélice tornam-se mais flexíveis, o que facilita o processo de adsorção a uma superfície hidrofílica como a existente na hidroxiapatita.

Estas propriedades estão relacionadas entre si e permitem que a proteína estabeleça transições estruturais que favoreçam a exposição de grupos químicos funcionais de seus aminoácidos constituintes para realizar a ancoragem na superfície do material. Na melhor condição, a superfície do material apresentará vários sítios capazes de realizar a adsorção e a proteína possuirá flexibilidade e estabilidade suficientes para obter a melhor conformação favorável, expondo seus sítios ativos para realizar este processo (WANG *et al*, 2012).

O trabalho de Almora-Barrios *et al*, (2009) estuda a interação da HA com os principais aminoácidos encontrados no colágeno. O trabalho emprega técnicas de eletrônica estrutural baseada na teoria de densidade funcional (DFT- *Density Functional Theory*), onde se determinam quais os arranjos geométricos que levam a valores mínimos de energia total, considerando uma “supercélula” unitária. Os resultados indicaram que os aminoácidos podem formar múltiplas ligações com a superfície da HA principalmente entre dois átomos cálcio. Dentre os aminoácidos estudados (glicina, prolina e hidroxiprolina), a hidroxiprolina se liga mais fortemente à superfície de cristais da HA no plano (0001) perpendicular ao eixo c (610 KJ.mol^{-1}), enquanto que a glicina é o aminoácido que apresenta ligação mais fraca (290 KJ.mol^{-1}) na superfície (01 $\bar{1}$ 0). O caráter neutro e a menor dimensão da glicina poderia explicar tal comportamento. Todos os aminoácidos apresentaram maior preferência em realizar ligações com a superfície 01 $\bar{1}$ 0. Um trabalho posterior com os mesmos autores, (Almora-Barrios & Leeuw, 2012), indicou que a nucleação dos cristais de apatita ocorre a partir de fibrilas de colágeno, onde adquirem o seu formato, sendo seguido de um rápido crescimento de cristais ao longo da direção [0001].

2.4 ADSORÇÃO DE ALBUMINA EM HIDROXIAPATITA

A proteína mais empregada em estudos de adsorção em superfícies de materiais é a albumina de soro bovino (BSA) devido ao grande conhecimento de sua estrutura, sua função e seu baixo custo. A BSA possui peso molecular de 66,4 KDa, dimensões 4 x 14 nm, e ponto isoelétrico (PI) de 4,9, que lhe confere caráter ácido. A estrutura secundária da BSA é majoritariamente α -hélice, possuindo 17 pontes de sulfeto e alta flexibilidade (KADI *et al*,

2006). A molécula de BSA possui três sub-domínios (I, II e III), que segundo PETERS (1985) apresentam em pH neutro uma carga eletrostática de -10, -8 e 0, respectivamente, FIG. 2.9.

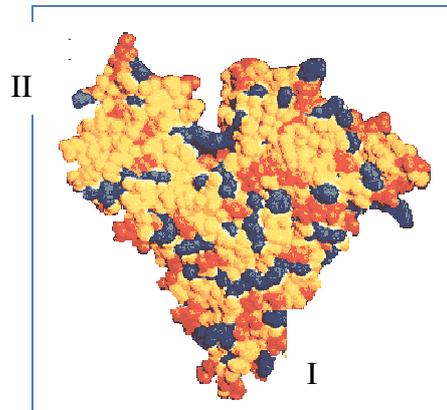


FIG. 2.9 - Modelo da molécula de albumina sérica identificando regiões dos domínios I, II e III, e resíduos de aminoácidos básicos (azul), ácidos (vermelho), e neutros (amarelo) em pH neutro (CARTER & HO, 1994).

Estudos iniciais de adsorção de BSA em hidroxiapatita indicaram um processo de formação de uma monocamada de proteína na superfície do material. A partir da determinação da quantidade de proteína retida no material, através de experimentos utilizando uma temperatura constante e concentrações crescentes de BSA, foi verificado que os valores obtidos seguiam um resultado similar ao de uma isoterma de adsorção de *Langmuir*. Desta forma, foi possível inferir que o processo de adsorção ocorria de forma simples com a formação de monocamada de proteína em sítios ativos distribuídos uniformemente na superfície da HA (WASSEL *et al*, 1995).

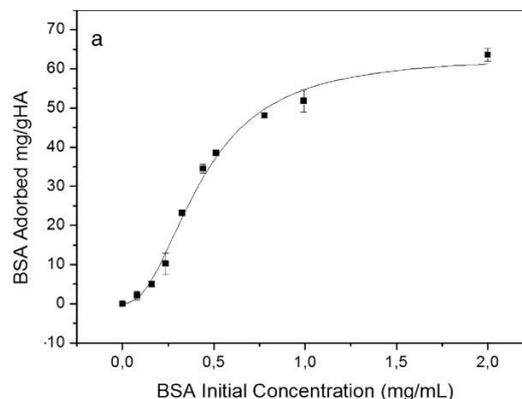


FIG. 2.10 – Simulação de isoterma de adsorção seguindo equação de Langmuir-Freundlich para valores de albumina bovina adsorvida em HA em tampão fosfato 0.01M (MAVROPOULOS *et al*, 2011).

Por outro lado, recentes trabalhos obtiveram resultados diferentes para a adsorção da BSA na HA, indicando tratar-se de um processo bem mais complexo. Os valores de proteína encontrados indicaram um resultado não coincidente ao de uma isoterma de adsorção de *Langmuir* como mostrado na FIG. 2.10. De acordo com a solução tamponante utilizada, os resultados obtidos foram correspondentes a um processo de adsorção obedecendo a uma isoterma de *Langmuir-Freundlich*, ou a um mecanismo de adsorção em duas etapas, seguindo uma isoterma *Langmuir-Freundlich* para concentrações baixas e uma isoterma de *Freundlich* para concentrações altas de proteína. A existência de interações proteína-proteína e proteína-composto tamponante podem explicar tais resultados, mas é fundamental observar a formação de multicamadas de proteína em ambos os casos, o que difere dos trabalhos iniciais nessa área (MAVROPOULOS *et al*, 2011).

2.5 ADSORÇÃO DE MIOGLOBINA EM HIDROXIAPATITA

A mioglobina é uma hemoproteína citoplasmática que possui a função de armazenar o oxigênio molecular no tecido muscular. Sua cadeia polipeptídica é constituída por 153 resíduos de aminoácidos, que se organizam em oito sequências de α -hélices, denominadas de A até a letra H, e arranjadas de modo a formar uma proteína globular com dimensões de, aproximadamente, 3,5 x 4,5 nm. A proteína possui peso molecular de 17,8 kDa, e PI de 7,0, que lhe confere caráter neutro (REYMOND *et al*, 1997).

O grupo prostético heme localiza-se numa cavidade hidrofóbica, onde suas cadeias laterais e polares estão na superfície da proteína, e se encontram ionizadas em pH fisiológico. O átomo de Fe (II) pertencente ao grupo heme, quando exposto ao oxigênio, é oxidado de maneira irreversível a Fe (III), uma forma inativa, chamada de metamioglobina. Conforme o estado de oxidação do átomo de Fe, a proteína tem sua coloração alterada de marrom (Fe^{3+}) para vermelho (Fe^{2+}). Desta forma, a nomenclatura usual da mioglobina (Mb) envolve o reconhecimento do estado redox do íon Ferro e do tipo do ligante, tendo-se a MbO₂, quando associada ao Oxigênio (Fe^{2+}), e a MetMb, quando associada a H₂O (Fe^{3+}) (RIBEIRO JUNIOR, 2004; FIGUEIREDO, 2008). A estrutura da mioglobina é apresentada na FIG. 2.11.

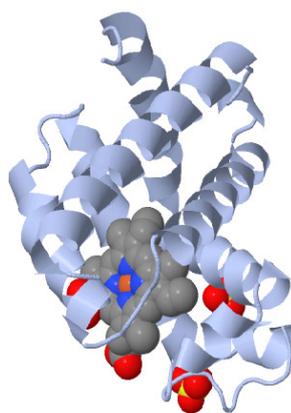


FIG. 2.11 – Estrutura da mioglobina formada por oito α -hélices ligadas ao íon ferro presente no centro do grupo Heme (cinza) através de ligação com aminoácido Histidina da cadeia peptídica (COSTA *et al*, 2012).

KANDORI *et al* (2008, 1995, 1995) realizaram diversos trabalhos sobre adsorção de proteínas em Hidroxiapatita. Os autores sugerem que a facilidade de adsorção do material, tanto para proteínas ácidas quanto básicas, deve-se à uma peculiaridade existente nas faces dos cristais de HA. Considerando a estrutura hexagonal da HA e sua simetria P_63m , tem-se que os planos dos seus cristais ao longo do eixo c possuem maior incidência de sítios positivos do que negativos, devido a maior presença de íons Ca^{2+} . Por outro lado, os planos perpendiculares ao eixo c, (001), apresentam maior presença de sítios negativos devido aos grupos fosfatos distribuídos hexagonalmente nessa face. A substituição de sítios positivos de Ca^{2+} por outros íons, como, por exemplo, Sr^{2+} na estrutura da HA interferiu na capacidade de adsorção de proteína pelo material. Esse resultado provavelmente ocorreu devido a alterações da distribuição de sítios carregados na superfície do material.

Em trabalho recente, Kandori *et al* (2011) estudaram o efeito da dimensão dos cristais de HA na adsorção de três proteínas: Albumina de soro bovino, BSA (PI 4,7 dimensões 4 x 14 nm) que possui caráter ácido, Mioglobina, Mb (PI 7,0 dimensões 3,5 x 4,5 nm), que possui caráter neutro, e Lisozima, LZ (PI 11,1 dimensões 3 x 3,5 nm), que possui caráter básico. Os resultados demonstraram que, a 15°C em solução de 0,1mM KCl, todas as proteínas adsorvem seguindo um modelo de isoterma previsto por Langmuir. Além disso, foi observado que uma redução no tamanho dos cristais da HA de 12 x 75 nm (ab x ac, bc) para 2 x 15 nm (ab x ac, bc) provocou uma queda acentuada na adsorção da BSA e da LZ, enquanto que esse efeito não foi observado para a Mioglobina, FIG. 2.12. Os autores concluíram que o processo de

adsorção nessas condições envolve interações de caráter eletrostático para a BSA e a LZ, enquanto que no caso da Mioglobina as interações de Van der Waals prevalecem.

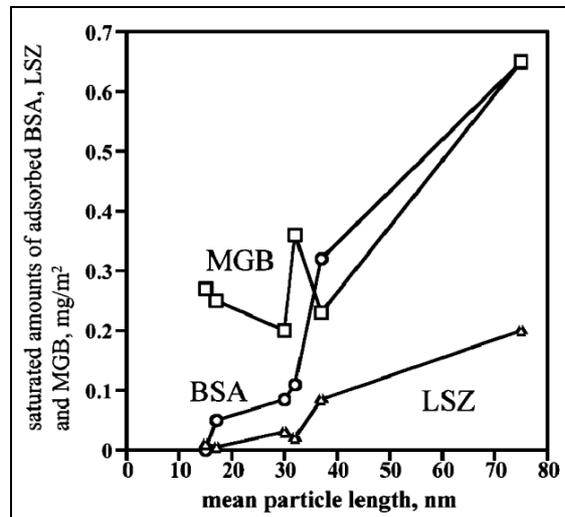


FIG. 2.12 - Capacidade de adsorção de BSA, Mb e LZ pela HA em função do seu tamanho de partícula, (Kandori et al, 2011).

2.6 ADSORÇÃO DE INSULINA EM HIDROXIAPATITA

A insulina humana, como muitos hormônios proteicos, é sintetizada como uma proteína precursora com uma cadeia proteica maior, que após uma clivagem proteolítica, irá gerar o hormônio ativo responsável pelo controle do metabolismo da glicose.

Ela é produzida no pâncreas sob a forma de uma longa cadeia polipeptídica de 110 aminoácidos. Após a perda dos vinte e quatro primeiros aminoácidos, a proteína consegue migrar, na forma de pró-insulina, para o interior do retículo endoplasmático das células do pâncreas. Nessa condição a proteína adquire sua conformação final com a formação de duas pontes de dissulfeto. Em seguida, ela é transportada para o aparelho de Golgi, onde é estocada em forma de grânulos, que posteriormente serão secretados para o meio extracelular (SILVA *et al*, 2003).

A forma ativa da insulina é o monômero, que contém duas cadeias peptídicas covalentemente ligadas por duas pontes de dissulfeto, sendo uma cadeia hidrofílica

denominada cadeia A construída por 30 resíduos de aminoácidos, e outra cadeia hidrofóbica chamada B com 21 resíduos de aminoácidos. Seu PI é 5,3 e seu peso molecular 5,80 kDa. A estrutura secundária da cadeia A é formada por duas α -hélices antiparalelas (contendo uma terceira ponte de dissulfeto), e a cadeia B é formada majoritariamente por α -hélice e folha- β (LIU *et al*, 2012), como mostrado na FIG. 2.13.

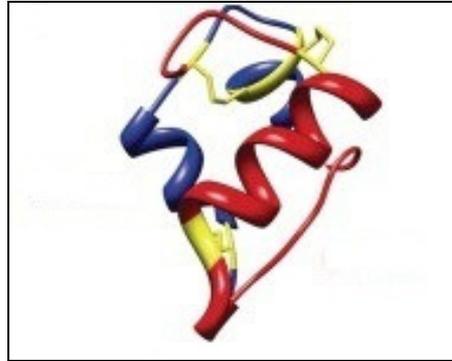


FIG. 2.13 - Estrutura da insulina indicando as cadeias A (azul) e B (vermelho), (CHOI *et al*, 2009).

Na circulação humana, o tempo de meia-vida da insulina é de aproximadamente 3-5 minutos. A molécula de insulina existe como um monômero apenas em baixas concentrações, aproximadamente 0,6 mg/mL. Em condições fisiológicas, a insulina é normalmente mantida a concentração inferior a 10^{-3} mM, para assegurar sua circulação, e exerce sua atividade biológica como molécula monomérica. Para concentrações superiores a 0,1 mM, a insulina dimeriza. Em soluções neutras ou ligeiramente ácidas (pH 4-8), na presença de íons zinco e para concentrações superiores a 10 mM, ocorre a associação de 3 dímeros para formar um hexâmero de forma esférica ligeiramente achatada e com diâmetro hidrodinâmico aproximado de 5,6 nm, em comparação com o diâmetro da ordem de 2,6 nm do monômero. Para concentrações superiores a 2 mM, o hexâmero forma-se em pH neutro mesmo na ausência de íons de zinco (SILVA *et al*, 2003).

Devido a sua grande aplicação para o controle da *diabetes mellitus*, onde é administrada na forma parenteral, em especial por via subcutânea, diversos trabalhos estudam a imobilização de insulina em matrizes de polímeros, cerâmicas e compósitos, buscando alternativas visando obter a sua aplicação em processos de liberação controlada e/ou por vial (ZHANG *et al*, 2008; SHI *et al*, 2005; ZHANG *et al*, 2010).

O trabalho de SEFTON & ANTONACCI (1984) estudou a adsorção de insulina de origem bovina e de porco em materiais hidrofóbicos (Teflon e Silastic) e hidrofílicos (Vidro e Poliacrilamida). Os resultados indicaram que os materiais hidrofóbicos apresentam uma capacidade de adsorção maior do que os hidrofílicos, em especial para o Teflon, indicando provavelmente a formação de multicamadas (FIG. 2.14). Uma pequena redução nos valores de adsorção foi obtida pelo aumento da temperatura, conforme esperado, uma vez que o processo de adsorção é tipicamente exotérmico. No entanto, estudos adicionais considerando a possível formação de moléculas de insulina associadas, formando dímeros, hexâmeros ou fibrilação também devem ser considerados nesse resultado.

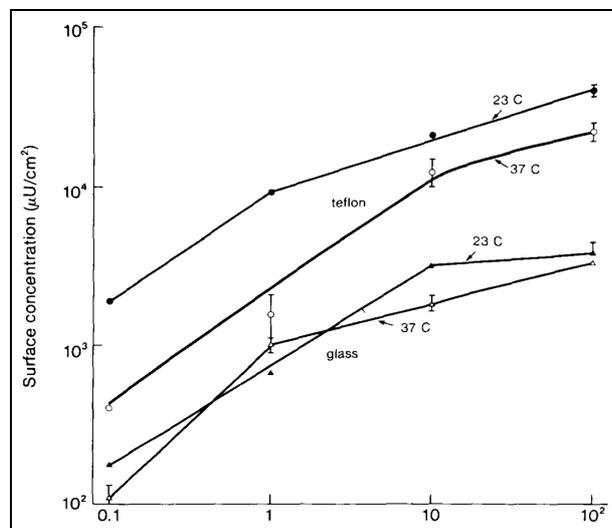


FIG. 2.14 - Efeito da temperatura de incubação na adsorção de insulina em tampão fosfato a pH 7,4 após 30 minutos (SEFTON e ANTONACCI, 1984).

O trabalho de ZHU *et al* (2010) estudou a adsorção de insulina (PI 5,3, dimensões $< 5\text{ nm}$), fibrinogênio (PI 5,8, dimensões $10 \times 50\text{ nm}$) e colágeno tipo I (PI 4,5, dimensões $300 \times 1,5\text{ nm}$) em pós cerâmicos de hidroxiapatita (HA) e fosfato de cálcio bifásico (BCP) com dimensões de até 125 microns, apresentando valores de área específica em torno de $2,5\text{ m}^2/\text{g}$ e microporos (2 a 200 nm). Os resultados de adsorção após 1h, a 37°C , em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4, sugerem um modelo de isoterma previsto por Langmuir, onde a capacidade de adsorção de proteínas pelo BCP foi superior à HA como mostrado na TAB. 2.1. Além disso, a presença de microporosidade e/ou poros com dimensões maiores que 20 nm favoreceram a capacidade de adsorção do fibrinogênio e da insulina nos materiais. No caso do colágeno, esse comportamento não foi observado, provavelmente devido a maior dimensão da molécula.

TAB. 2.1 Parâmetros das Isotermas de Langmuir obtidos pela adsorção de proteínas em amostras de HA e BCP.

Parameter	CaP powders			
	HA I	HA II	BCP I	BCP II
Γ_{\max} (mg m ⁻²)				
Fibrinogen	2.973	1.733	4.275	3.912
Insulin	2.244	1.824	4.237	3.579
Col-I	1.125	1.024	1.346	1.413
K				
Fibrinogen	5.461	13.39	3.235	4.281
Insulin	4.731	5.401	2.854	3.891
Col-I	9.69	10.349	8.229	6.105
R^2				
Fibrinogen	0.979	0.975	0.991	0.996
Insulin	0.950	0.993	0.978	0.964
Col-I	0.958	0.957	0.995	0.932

Fonte: ZHU *et al* (2010).

Vale ressaltar que estudos na área de medicina indicam que variações na estrutura secundária das proteínas, assim como a ocorrência de agregação podem estar relacionados ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas no ser humano, como Alzheimer e Mal de Parkinson. Trabalhos recentes indicaram que a presença de proteínas com erros de conformação leva as células a bloquearem a produção proteica, levando a morte das células cerebrais (NIELSEN *et al*, 2001; MORENO *et al*, 2013).

Existem duas formas de agregação de proteínas: i) fibrilas amiloides, que possuem estruturas altamente organizadas; e ii) agregados, que possuem estruturas irregulares ou amorfas. As fibrilas apresentam características específicas como, por exemplo, uma estrutura rica na estrutura folha β , birrefringência à luz polarizada, menor solubilidade e maior resistência à degradação por enzimas (protease). Dentre várias proteínas, a insulina tem sido a proteína modelo adotada em vários trabalhos de investigação do mecanismo de formação de fibrilas, devido ao grande conhecimento da sua estrutura e à ocorrência desse fenômeno tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro* (JANSEN *et al*, 2005).

O trabalho de DZWOLAK *et al* (2004) estudou o processo de agregação de soluções de insulina bovina em água deuterada (D₂O) por FTIR e DSC. Os resultados indicaram a ocorrência de um processo de agregação da proteína por efeito de aquecimento e presença de cloreto de sódio (NaCl). Na FIG. 2.15 são apresentados os espectros de FTIR de uma solução

de insulina bovina em D₂O. É possível observar o gradual aumento da estrutura folha- β e a redução da estrutura α -hélice durante a formação de agregados, após o gradual aquecimento da solução na faixa de 25° a 70°C, através da variação da intensidade no perfil das bandas de amida, grupo funcional químico presente na cadeia polipeptídica.

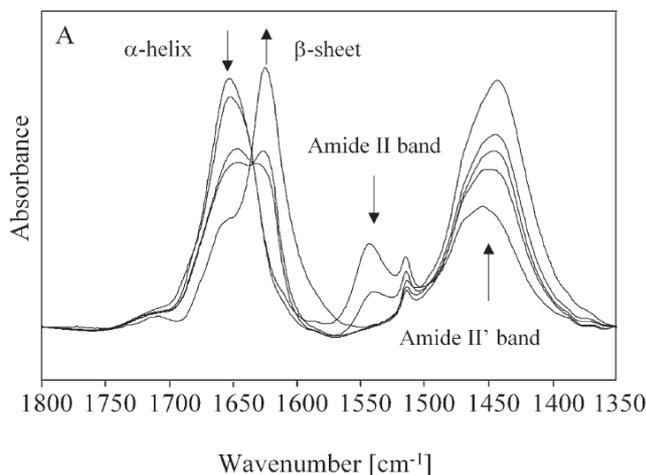


FIG. 2.15- Espectros de FTIR de solução de 5% em massa de insulina em D₂O, de forma gradual a 25, 45, 55, 65 e 70°C (DZWOLAK *et al*, 2004).

Desta forma, percebe-se que o estudo de adsorção de proteínas em biomateriais deve ser muito mais abrangente, levando em consideração: i) o estudo do mecanismo de adsorção envolvido; ii) a eficiência do processo; iii) as possíveis alterações que a proteína pode sofrer na superfície do material, iv) as interações proteína-proteína na formação de agregados e/ou de multicamadas; v) efeitos adversos e/ou toxicidade, e caso seja de interesse a liberação controlada da proteína ao meio, torna-se necessário investigar a sua forma nativa ou biologicamente ativa após a sua dessorção. Todos esses itens devem ser avaliados de forma a viabilizar a sua aplicação na área de ciências da saúde.

3. OBJETIVO

Este trabalho teve como principais objetivos, verificar as possíveis alterações na estrutura cristalina e na carga de superfície da Hidroxiapatita nanoestruturada após substituição parcial do cálcio por zinco, além de estudar a adsorção de proteínas nesses materiais, verificando possíveis mudanças conformacionais na estrutura das proteínas adsorvidas e o efeito da presença do zinco na capacidade de adsorção de proteína pela Hidroxiapatita.

Os objetivos específicos foram: 1) preparar de hidroxiapatita (HA) e zinco-hidroxiapatita (ZnHA) nanoestruturadas e caracterizar as amostras obtidas por Difração de raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e área específica BET; 2) estudar as alterações de carga de superfície dos materiais após a adsorção de proteínas por medidas de Potencial Zeta; 3) estudar as alteração conformacionais das proteínas BSA, Mb e Ins na superfície da HA por diferentes técnicas de espectroscopia, e 4) simular curvas de isotermas de adsorção da BSA, Ins e Mb na HA e ZnHA nanoestruturadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de hidroxiapatita (HA) e de hidroxiapatita contendo zinco (ZnHA) foram sintetizadas no laboratório de Biocerâmicas do CBPF. As proteínas estudadas nesta tese foram compradas da Sigma-Aldrich, sendo escolhidas: a mioglobina de cavalo (Mb), albumina de soro bovino (BSA) e a insulina humana (Ins).

4.1 SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA

Foram preparadas soluções de nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ Merck 0,2M e fosfato dibásico de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,12M Merck em água milli-Q para a síntese da HA. Através de uma bomba peristáltica a solução de fosfato dibásico de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ foi adicionada sobre a solução de cálcio com fluxo de 4,5 mL/min, mantendo-se o pH na faixa de 10-12 com adição de hidróxido de potássio (KOH), a temperatura de 37 °C e agitação utilizando-se um agitador mecânico. Após gotejamento a mistura permaneceu em digestão por 2 horas nas mesmas condições descritas acima, sendo em seguida filtrada em funil de Buckner e lavada por ressuspensão com água Milli-Q a 90 °C até obter um pH= 7,0 na água de lavagem. O sólido obtido foi seco por liofilização, e posteriormente peneirado em abertura de 37 microns (MAVROPOULOS *et al*, 2013).

4.2 SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA CONTENDO ZINCO

Foram preparadas duas soluções para a síntese da ZnHA. A primeira solução foi preparada a partir de dois sais: nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ Merck e nitrato de zinco $[\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ Merck em água milli-Q, obtendo-se uma concentração total de cátions de 0,2M (concentrações parciais de 0,19M de Ca^{2+} e 0,01M de Zn^{2+}). A segunda solução foi preparada a partir do fosfato dibásico de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,12M em água milli-Q.

Através de uma bomba peristáltica, com fluxo de 4,5 mL/min, a solução de fosfato dibásico de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, foi gotejada no balão contendo as soluções de cálcio e zinco, mantendo-se o pH em torno de 10 com adição de hidróxido de amônio (NH_4OH), a temperatura de 37 °C e agitação utilizando-se um agitador mecânico. Em seguida a mistura permaneceu em digestão por 2 horas nas mesmas condições descritas acima, sendo em seguida filtrada em funil de Buckner e lavada por ressuspensão com água Milli-Q a 90 °C até obter um pH= 7,0 na água de lavagem. O sólido obtido foi seco por liofilização, e posteriormente peneirado em abertura de 37 microns (MAVROPOULOS *et al*, 2013).

4.3 ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS

Para estimar a capacidade de proteína adsorvida em amostras de HA e ZnHA foram feitos experimentos de adsorção, onde a determinação da concentração de proteínas na solução remanescente foi obtida por espectroscopia no UV-Vis.

Curvas de calibração para dosagem de proteína foram construídas abrangendo a faixa de concentração de proteína escolhidas para este estudo, tendo-se o primeiro padrão como ponto zero, utilizando-se a solução de tampão fosfato 0,01M como meio no preparo das soluções de proteína. O zero de leitura do espectrofotômetro foi ajustado utilizando-se as soluções de tampão fosfato em ambas as cubetas.

Os experimentos de isotermas de adsorção foram realizados em tubos Corning de 15 ml, utilizando-se a proporção de 50 mg de amostra para 4 ml de solução de proteína com diferentes concentrações de (0,2 - 2mg/ml). As soluções de Mb e BSA foram preparadas em meio de tampão fosfato 0,01M pH 6,0 e as soluções de Ins em meio de tampão fosfato 0,01M pH 7,4. O sistema foi mantido a uma temperatura constante de 37 °C, por 24 horas, sob agitação em agitador do tipo Kline.

Após esse período, as amostras de HA e ZnHA adsorvidas com BSA e Mb foram centrifugadas a 6000 rpm, 10°C, por 30 minutos, e as amostras de HA e ZnHA adsorvidas com Ins foram centrifugadas a 6000 rpm a 10°C, por 10 minutos, seguido de centrifugação a

14000 rpm por 10 minutos. Alíquotas das soluções sobrenadantes foram retiradas para dosagem de proteína ainda presente na solução através de análise por espectroscopia de UV-Vis a 280 nm. A quantidade de proteína adsorvida pelos materiais foi determinada pela diferença entre os valores das soluções de proteína inicial e das soluções de proteínas obtidas ao final de cada experimento.

5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

As amostras de HA e ZnHA foram caracterizadas por Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia por Transformada de Fourier no Infravermelho (FTIR) e Espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-Vis) pertencentes ao Laboratório de Materiais Biocerâmicos do CBPF, por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) no Labnano do CBPF, por Espectrometria de Fluorescência de Raios X do Laboratório de Geociências da UFRJ, e por medidas de Potencial Zeta no laboratório de Análise de Superfície do CETEM.

As amostras de HA e ZnHA após os experimentos de adsorção foram caracterizadas por Espectroscopia por Transformada de Fourier no Infravermelho (FTIR), Potencial Zeta e Dicroísmo Circular. A análise de Potencial Zeta foi realizada utilizando o laboratório de Análise de Superfície do CETEM, e a análise de Dicroísmo Circular no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria- LEC (LNBio/ LNLS) em Campinas.

5.1 POTENCIAL ZETA (Z)

Quando um material apresenta íons em sua estrutura, a sua superfície apresenta carga. Este mesmo material apresentará a formação de uma dupla camada elétrica na sua superfície quando estiver em uma solução aquosa contendo eletrólitos. A primeira camada é constituída por íons adsorvidos diretamente na superfície devido às interações químicas específicas com a superfície, por exemplo, forças eletrostáticas, ligação de hidrogênio e interações de van der Waals. A segunda camada é formada através de interações de forças eletrostáticas fracas entre íons livres que se movem no fluido e a superfície, sob a influência da atração elétrica e do movimento térmico. Esta segunda camada é, portanto, chamada de camada difusa, como mostrado na FIG. 5.1.

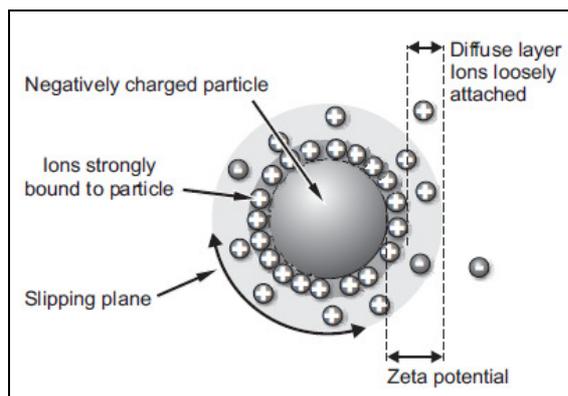


FIG. 5.1- Esquema da dupla camada elétrica formada na superfície de uma partícula carregada Manual Malvern Zeta Sizer.

A queda de potencial através da parte móvel da dupla camada é a responsável pelo fenômeno eletrocinético chamado de potencial zeta (ζ). Sendo uma medida de interface, o potencial ζ de uma superfície sólida é em grande parte dependente da natureza química da solução de medida. Assim, em meio aquoso, o pH e a força iônica da solução são os fatores mais importantes que afetam o potencial ζ , e devem ser sempre explicitamente indicados.

Considerando-se os estudos de suspensões coloidais, a determinação de potencial ζ é comumente usado para avaliar a estabilidade de uma suspensão. Um potencial de 30 mV (positivo ou negativo) pode ser adotado como o valor arbitrário característico de superfícies altamente carregadas e, portanto, garante a obtenção de suspensões coloidais estáveis devido à repulsão eletrostática. A condição na qual a densidade de carga elétrica de uma superfície torna-se zero é chamada de ponto de carga zero (PZC). Este ponto é geralmente determinado experimentalmente por titulações ácido-base, medindo-se a mobilidade eletroforética das partículas e o pH da suspensão. O ponto iso-elétrico (IEP) e o PZC, ou seja, o pH em que a mobilidade eletroforética é nula, são geralmente considerados equivalentes (RABE *et al*, 2011). Como exemplo, a FIG. 5.2 mostra valores de potencial zeta obtidos para três materiais cerâmicos em função do pH.

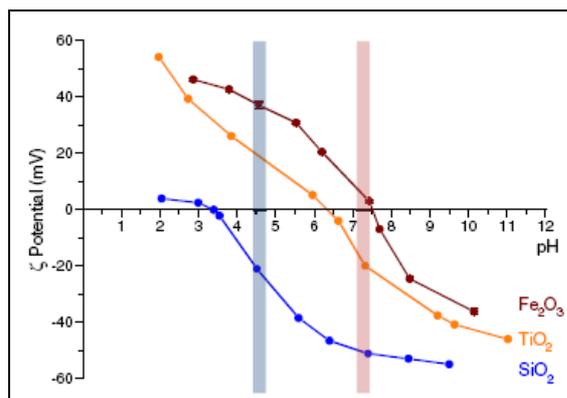


FIG. 5.2 - Variação do potencial zeta em função do pH para TiO₂, SiO₂ e FeO₂ (RABE *et al*, 2011).

Dispersões de amostras de HA e ZnHA antes e após experimentos de adsorção com proteínas (BSA, Mb e Ins) na concentração de 2 mg/ml foram obtidas pesando-se 10 mg de cada material seco e 12 ml de solução de KCl 1 mM. Neste trabalho foi utilizado o equipamento da Malvern Nano ZS do laboratório de Análises de Superfície do CETEM, obtendo-se medidas de Potencial Zeta e de Tamanho de Partícula nas faixas de pH de 10 a 4, utilizando-se soluções de 0,05M de hidróxido de sódio (NaOH) e de 0,05M ácido clorídrico (HCl).

5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

A absorção da radiação na região do ultravioleta-visível pela matéria irá resultar na excitação de elétrons de valência em átomos e moléculas, isto é, elétrons de orbitais moleculares, orbitais atômicos d e f, e de transferência de carga.

A transição eletrônica relacionada a orbitais moleculares, isto é, orbitais contendo elétrons envolvidos em ligações, e não em orbitais atômicos relativos a elementos químicos, envolve dois tipos de orbitais σ (sigma) que constitui ligações simples, e π (pi) que constitui ligações duplas e triplas.

Outro tipo de transição molecular ocorre pela absorção de energia utilizada para a transferência de carga entre um componente atuando como doador de elétrons (menor

energia) a outro componente atuando como receptor (maior energia). Por último, é possível ocorrer transições envolvendo elétrons de orbitais atômicos d de elementos de transição, como por exemplo, Ferro e Cobalto (SKOOG *et al*, 2001).

As proteínas em geral apresentam atividade na região do Ultravioleta devido à presença de aminoácidos Phe, Tyr e Trp, que contem anéis aromáticos, e, por conseguinte, dupla ligação. Quanto maior a incidência destes grupos, maior a absorbância relativa da proteína, uma banda característica da transição $\pi\sigma$ ocorre próximo a 280 nm.

Proteínas contendo o grupo Heme, como a Mioglobina e Hemoglobina, apresentam atividade na região do visível devido à presença do anel porfirínico contendo várias duplas ligações acoplado ao elemento de transição Ferro, que possui orbital d. Desta forma transições eletrônicas envolvendo transferência de carga e transições d-d podem ser observadas (IAFISCO *et al*, 2008).

Neste trabalho, utilizou-se a espectroscopia de Ultravioleta-Visível no modo de refletância difusa para obter espectros de amostras sólidas de proteínas e após os experimentos de adsorção. Nesse modo de análise, é obtido o espectro através do sinal de absorção, onde a luz dispersa pela amostra sólida é coletada de volta para o detector através de um arranjo óptico de espelhos.

Amostras de 100 mg HA e ZnHA foram analisadas antes e após adsorção por 24 horas com 8 ml de soluções de 2mg/ml de proteínas, sendo que as soluções de BSA e Mb foram preparadas em meio de tampão fosfato 0,01 M em pH 6 e a solução de Ins preparada em meio de tampão fosfato 0,01M em pH 7,4, seguindo o procedimento descrito nos experimentos de adsorção. Os espectros foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis Shimatzu, na faixa de 200-600 nm com resolução de 2 cm^{-1} . O preparo de amostras em pastilhas de BaSO₄ foi realizado numa proporção de 200 mg BaSO₄/50 mg amostra com leve compactação no porta amostra. Foi utilizando como referencia uma pastilha contendo 200 mg BaSO₄/50 mg HA. Espectros de amostras de proteínas puras foram obtidos mantendo-se a mesma proporção para a confecção de pastilhas.

Além de espectros de absorção, utilizou-se um método de quantificação de proteínas por Espectrometria na região do Ultravioleta, utilizando-se a lei de Beer, que relaciona a

intensidade do sinal de absorvância à concentração do analito. Desta forma, obteve-se a concentração de proteína em solução, medindo-se o sinal de absorvância em 280 nm das soluções iniciais de proteína e das soluções remanescentes dos experimentos de adsorção, i.e., concentração final de proteína. A conversão do sinal de absorvância em concentração foi realizada através de uma curva de calibração utilizando padrões com concentração de proteína conhecida. A subtração das medidas de concentração inicial e final a partir de 4ml de solução de proteína forneceu a quantidade de proteína adsorvida em 50mg de amostra.

5.3 DICROÍSMO CIRCULAR (DC)

Os átomos que compõem a ligação peptídica podem interagir com os átomos de outras ligações peptídicas da mesma cadeia polipeptídica, contribuindo para a formação de uma estrutura peculiar, não aleatória. Essa forma de estruturação da cadeia polipeptídica origina a chamada "estrutura secundária" da proteína.

Essas formas regulares de arranjos atômicos interagem de modo particular com a radiação polarizada, de modo que uma luz com polarização circular no sentido horário seja absorvida diferentemente do que uma luz com polarização no sentido anti-horário. O fenômeno do DC envolve a absorção de luz na região de Ultravioleta e pode ser considerado como um tipo especial de espectroscopia de absorção. O sinal do espectro obtido representa a diferença na absorção de esquerda e direita quando uma luz circularmente polarizada incide sobre uma molécula quiral. A FIG. 5.3 mostra a comparação dos espectros de UV-Vis e DC da poli-L-lisina com conformações diferenciadas e suas respectivas bandas de absorção não coincidentes. O sinal de absorvância obtido por absorvância UV-Vis é semelhante para todas as conformações de estrutura secundária da cadeia polipeptídica, enquanto que o espectro de DC obtido por variação de absorção por angulação da luz polarizada apresenta grande variação de perfil para cada estrutura secundária da poli-L-lisina (CANTOR & SHIMMEL, 1980; GREENFIELD & FASMAN, 1969).

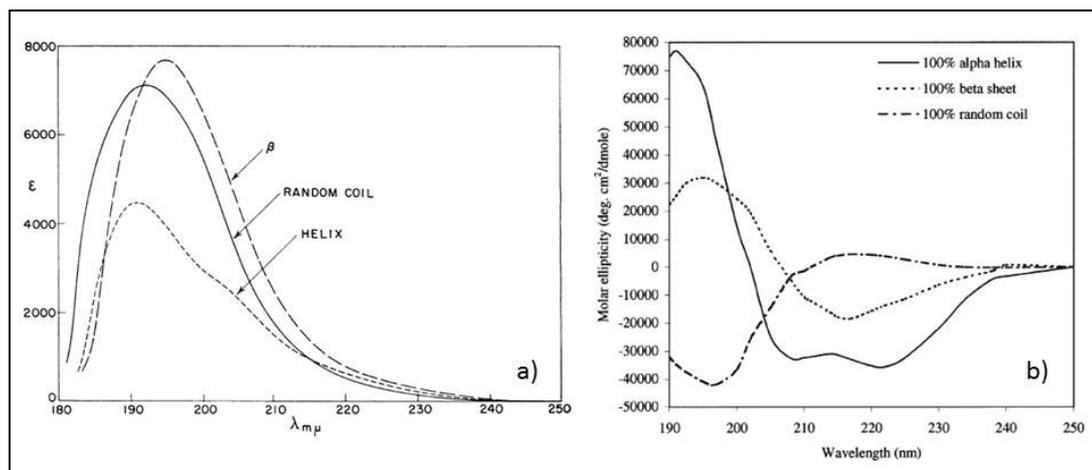


FIG. 5.3 - Espectros de uma cadeia polipeptídica de poli-L-lisina: a) UV-Vis e b) DC. Nota-se a maior variação de perfil de acordo com as estruturas secundárias em α -hélice, folha- β e randômica no espectro de DC (CANTOR & SHIMMEL, 1980; GREENFIELD & FASMAN, 1969).

Os espectros de DC das proteínas são geralmente divididos em três faixas de comprimento de onda na região de Ultravioleta, com base na energia das transições eletrônicas que ocorrem nas ligações químicas existentes na cadeia polipeptídica. Estas são: (1) abaixo de 250 nm, devido a contribuições de peptídeos e estrutura secundária, (2) entre 250-300 nm, devido aos anéis aromáticos de cadeias laterais dos aminoácidos e, (3) entre 300-700 nm, devido à presença de cromóforos extrínsecos. A primeira faixa é geralmente a mais empregada nos estudos de alterações conformacionais das proteínas (CURTIS, 1988).

Foram preparadas dispersões de amostras de HA e ZnHA antes e após experimentos de adsorção com proteínas (Mb, BSA e Ins) na concentração de 2mg/ml, sendo as soluções de Mb e BSA em meio de tampão fosfato 0,01M pH 6,0 e a solução de Ins em meio de tampão fosfato 0,01M pH 7,4.

Inicialmente 10 mg de HA e ZnHA foram adicionadas a 800 microlitros de solução de proteína em microtubos, deixando-se sob agitação por 24hs, à temperatura ambiente. Após esse período, centrifugou-se as amostras por 10 min a 14.000 rpm a 08 °C, retirando-se o líquido sobrenadante. Uma lavagem foi realizada adicionando-se 1.000 microlitros de água milli-Q, e centrifugando-se sob as mesmas condições. O sólido obtido foi disperso em 100 microlitros de água Milli-Q. Uma alíquota de 60 microlitros da suspensão foi transferida para uma cubeta de quartzo, sendo adicionado 300 microlitros de água Milli-Q para dispersão,

seguindo leitura na região de 260-195 nm, com 10 acumulações, passo de 1 nm, e velocidade de varredura de 50 nm/min. Neste trabalho foi utilizado o equipamento Jasco modelo J-810 do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LEC- LNBio/LNLS), em Campinas.

5.4 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO (FTIR)

Quando um movimento vibracional ou rotacional ocorre em uma molécula que possui uma distribuição de elétrons não simétrica, isto é, possui átomos de elementos químicos distintos, tem-se uma variação do momento dipolo. Essa pequena variação de energia do momento dipolo coincide com a faixa de infravermelho na região espectral.

Vibrações, rotações ou uma combinação de modos vibracionais da molécula absorvem na região do infravermelho provocando alterações de amplitude em alguns modos vibracionais, FIG. 5.4 (WILLIANS, 1995).

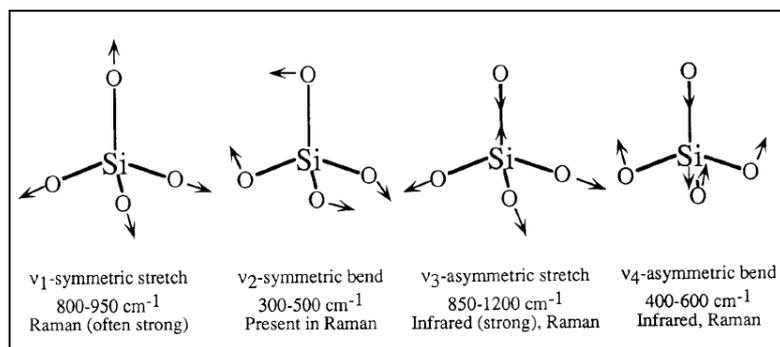


FIG. 5.4 – Modos vibracionais do grupo funcional, SiO₄²⁻, ativos na região do Infravermelho e seus respectivos valores de número de onda, (WILLIANS, 1995).

No caso das proteínas, a grande quantidade de ligações peptídicas que formam a cadeia polipeptídica produz nove regiões de bandas de infravermelho ativas. A TAB. 5.1 lista a região no espectro de infravermelho das bandas do grupo funcional amida da cadeia polipeptídica da proteína.

TAB. 5.1 Bandas de FTIR características da ligação peptídica.

Banda	Número de Onda (cm⁻¹)	Descrição
Amida A	3300	Estiramento NH
Amida B	3100	Estiramento NH
Amida I	1600-1690	Estiramento C=O
Amida II	1480-1575	Estiramento CN e deformação angular NH
Amida III	1229-1303	Estiramento CN e deformação angular NH
Amida IV	625-767	Deformação angular OCN
Amida V	640-800	Deformação angular fora do plano NH
Amida VI	537-606	Deformação angular fora do plano C=O

Adaptado de KONG *et al* (2007).

Estudos comprovam que a região da banda de Amida I da proteína é sensível ao seu modo de enovelamento, isto é, sua estrutura secundária, devido a componentes vibracionais que se sobrepõem por apresentarem interações inter-, e intramoleculares. A TAB. 5.2 indica a posição no espectro de FTIR de bandas deconvoluídas relacionadas a diversos tipos de estrutura secundária de proteínas após a análise de espectros de soluções de proteína em água, e em água deuterada, D₂O. É importante salientar a ocorrência de sinal interferente no espectro de FTIR devido à presença de água com vibrações em torno de 3400 cm⁻¹ (estiramento O-H), 2125 cm⁻¹ (associação de H₂O) e 1645 cm⁻¹ (H-O-H deformação angular). A água deuterada não possui absorção na mesma região que as bandas de amida I e II das proteínas (KONG & SHAONING, 2007).

TAB. 5.2 Bandas de FTIR relativas à estrutura secundária das proteínas.

Número de Onda (cm ⁻¹)	Descrição
1624-1642	Folha-β
1648 ± 2	Randomica
1656 ± 2	α-helice
1663 ± 3	3 ₁₀ - helice
1667-1985	alça-β
1991-1996	Folha-β

Adaptado de KONG *et al* (2007).

Amostras de HA e ZnHA foram analisadas antes e após adsorção por 24 horas com soluções de 2mg/ml de proteínas, sendo BSA e Mb em meio de tampão fosfato 0,01 M pH 6 e Ins em meio de tampão fosfato 0,01M pH 7,4, seguindo o procedimento descrito nos experimentos de adsorção para as análises de Dicroísmo Circular. Os espectros foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu IR-Prestige-21/AIM-880, na faixa de 4000-400 cm⁻¹ com resolução de 2 cm⁻¹, 258 scans. O preparo de amostras em pastilhas de KBr foi realizado numa proporção maior de amostra (0,100g Kbr : 0,0010g amostra), de modo a aumentar o sinal de proteína adsorvida. Os espectros obtidos em escala de absorção foram tratados com correção de ar atmosférico e linha base pelo programa *IR Solution* do próprio equipamento. Utilizando-se o Programa Origin7.0 realizou-se a subtração de espectros das amostras de HA e ZnHA antes a após adsorção de proteínas. Limitando-se a região de trabalho entre 1700-1450 cm⁻¹, foi feito a simulação diversas bandas primárias em curvas Gaussianas na região da banda de amida I. Para a obtenção do percentual de cada estrutura secundária utilizaram-se as áreas relativas obtidas nos resultados de simulação em relação à área total da banda de Amida I.

5.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Quando a distância entre duas ou mais fendas é da mesma ordem de grandeza que o comprimento de onda irradiado, tem-se a ocorrência do fenômeno de difração. A interferência produzida pela presença das fendas conduz à dispersão do feixe em direções específicas de acordo com cada frente de planos cristalográficos atravessados. Esse fenômeno é usado para análise cristalográfica de materiais, tendo como radiação incidente uma fonte de raios-X que possui comprimento de onda da ordem 1 angstrom (Å) coincidindo com as distâncias interplanares existentes nas redes cristalinas.

Quanto maior o número de planos alinhados em uma mesma direção maior a cristalinidade do material, causando um feixe difratado mais intenso e estreito em termos de comprimento de onda. A FIG. 5.5 ilustra o fenômeno de difração a partir da incidência de um feixe de raios X em um monocristal com alta cristalinidade e a projeção dos feixes difratados em um anteparo. Desta forma, pode-se correlacionar os ângulos dos feixes difratados às distâncias interplanares existentes na célula unitária do cristal (CULLITY, 1978).

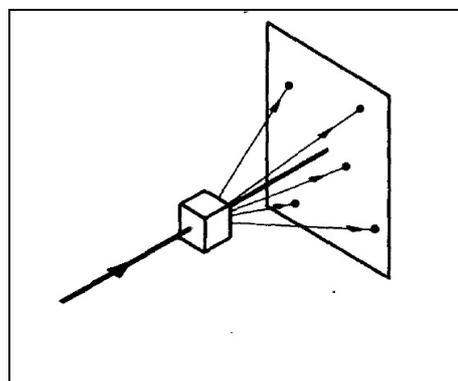


FIG. 5.5 - Esquema de análise de difração de raios-X em um monocristal, (CULLITY, 1978).

Em materiais com alta cristalinidade se obtém resultados dimensionais com alta precisão. No caso de materiais nanoestruturados, onde o grau de repetição de planos atômicos alinhados é menor, é necessário o uso de um feixe incidente com uma radiação de maior intensidade. Medidas utilizando a radiação de Luz Sincrotron é a melhor opção para este caso.

O método de RIETVELD (1969) é utilizado para o refinamento de estruturas cristalinas a partir de dados de difração de raios X ou de nêutrons, sendo capaz de fornecer informações detalhadas sobre parâmetros de célula unitária, posições atômicas, tamanho médio de cristais, ocupações dos sítios dos átomos, orientação preferencial e análise quantitativa de fases. Neste método, a partir de um padrão de difração, de informações instrumentais acerca da forma e largura dos picos e de um modelo inicial sobre a estrutura do material, busca-se o melhor ajuste entre o padrão de difração medido e o calculado.

A análise de DRX de amostras em pó de HA e ZnHA com radiação sincrotron operando a 9000 eV, comprimento de onda (λ) de 1,377 Å, foram realizadas utilizando as instalações do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron em Campinas. O refinamento dos padrões de DRX foram realizados pelo grupo da profa Mirta Mir, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade de Alfenas, Minas Gerais. O pacote de software utilizado para realizar os refinamentos foi o FullProf Suite, usando a ficha catalográfica da HA ICSD: 2604 como referência. O hexaboreto de lantânio (LaB6) foi o material padrão usado para obter a resolução do instrumento. A extração do tamanho do cristalito foi realizada com o método padrão de LeBail (THOMPSON *et al*, 1987).

5.6 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (FRX)

A técnica de Espectrometria de Fluorescência de Raios X (FRX, ou em inglês, *X-ray fluorescence, XRF*) está relacionada à física quântica, onde os elétrons estão dispostos no átomo segundo níveis de energia quantizados. Os fenômenos de salto e posterior decaimento de elétrons podem ser descritos como transições de níveis ou de subníveis de energia quantizadas, e podem ocorrer a partir da incidência de energia na região dos raios X. A variação de energia envolvida (ΔE) nesses fenômenos pode ser calculada segundo a equação de Bohr (7):

$$\Delta E = E_1 - E_2 = me^4/2n^2\hbar [(1/n_1^2) - (1/n_2^2)] \quad (7)$$

Onde m é a massa do elétron ($9,109 \times 10^{-31}$ kg), e é a carga do elétron ($-1,602 \times 10^{-19}$ C), h é a constante de Planck reduzida ($1,055 \times 10^{-34}$ J s) e n é o nível de energia referente ao estado eletrônico. Considerando os níveis e sub-níveis de energia, a camada K refere-se ao menor nível, 1, que compreende elétrons da primeira camada eletrônica e possui apenas um sub-nível relativos a orbitais s, a camada L compreende elétrons da segunda camada eletrônica e apresenta dois sub-níveis com orbitais s e p, a camada M refere-se ao nível 3 e apresenta três sub-níveis (AHUJA & JESPERSEN, 2006). A FIG. 5.6 ilustra a transição eletrônica a partir da ejeção de um elétron da camada interna K, e imediato decaimento de elétrons dos níveis 2 e 3 para o nível 1, resultando na emissão fótons ou transferência de energia para outros elétrons com valores de $K_{\alpha 1}$ e $K_{\alpha 2}$ e $L_{\alpha 1}$ e $L_{\alpha 2}$. Quando a emissão de energia ocorre pela liberação de um fóton tem-se o fenômeno de fluorescência.

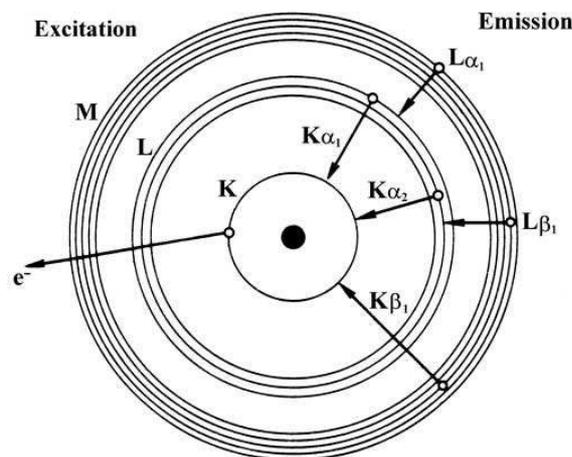


FIG. 5.6 Esquema de distribuição dos níveis eletrônicos com a ejeção de um elétron da camada K e possíveis de preenchimento da vacância com elétrons dos níveis mais externos, com a consequente emissão de raios X e a notação correspondente.

Geralmente utilizam-se amostras em pó para a análise química por FRX. As amostras são fundidas com fundentes e o posteriormente resfriadas produzindo-se vidros, sendo possível detectar a quantificar a presença da maioria dos elementos químicos presentes na tabela periódica, com exceção de elementos leves (peso atômico menor que 12).

No método de espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WD-XRF), um cristal é utilizado para selecionar valores de comprimento de onda. Neste caso, o feixe de raios X emitidos pela amostra atravessa o cristal, e alguns dos seus comprimentos de onda sofrem difração. A rotação do cristal permite a

seleção dos comprimentos de onda a serem difratados, seguindo a lei de Bragg. De um modo geral, vários cristais são usados, de forma que todos os comprimentos de onda sejam analisáveis de medição.

Outro método analítico de espectrometria de fluorescência de raios X utilizado é o de dispersão de energia (ED-XRF), onde os raios X emitidos pela amostra são selecionados através dos pulsos eletrônicos produzidos em um detector apropriado, sendo estes pulsos diretamente proporcionais às energias dos raios X. Os detectores mais utilizados são os cintiladores sólidos de NaI(Tl) e os semicondutores de Si(Li), Ge(Li) e Ge hiperpuro. A FIG. 5.7 mostra o esquema de um equipamento de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF).

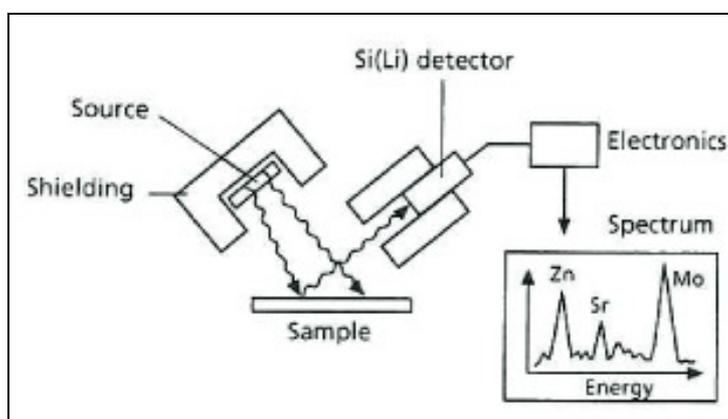


FIG. 5.7- Esquema de um aparelho de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia.

Neste trabalho utilizou-se o equipamento PW2400 XRF Spectrometer operando a 40 kV e em 50 mA utilizando-se um cristal de germânio, Ge(111), para a análise química das amostras sintetizadas, visando detectar e quantificar os elementos químicos presentes.

5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão permite a análise morfológica e cristalográfica de um material em um sistema de alto vácuo. Nesta técnica, um feixe de elétrons é acelerado pela aplicação de uma diferença de potencial (ddp), sendo alinhado e focado por um arranjo

de lentes eletromagnéticas e aberturas. O feixe obtido irá interagir com a amostra finamente dispersa em uma grade condutora que permite a obtenção de imagem com contraste de fase e número atômico, padrões de difração, análise química elementar, etc, dependendo da presença de detectores específicos e ajustes por fendas intermediárias (SAD), como mostrado na FIG. 5.8 (WILLIAMS & CARTER, 2009).

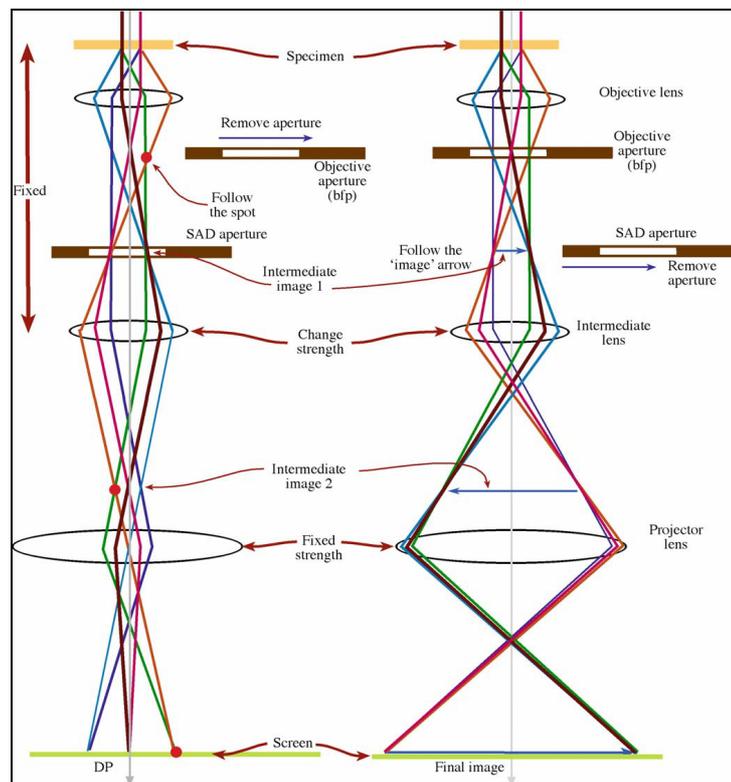


FIG. 5.8 - Esquema de componentes de um microscópio eletrônico de transmissão para obtenção de: padrão de difração de elétrons (DP), imagem (Final Image), (WILLIAMS & CARTER, 2009).

Amostras de HA e ZnHA foram dispersas através de fricção entre duas lamínulas de vidro, e em seguida as partículas mais dispersas foram transferidas para uma grade de cobre.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 CARACTERIZAÇÕES DA HIDROXIAPATITA E ZINCO- HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADAS

As análises químicas elementares por Fluorescência de raios X (FRX) das amostras de HA e ZnHA indicaram uma razão molar de Ca/P de 1,67 ($\pm 0,03$) e 1,63 ($\pm 0,03$) respectivamente. A razão molar Ca/Zn percentual encontrada na amostra de ZnHA foi de 2,3%. Este valor foi inferior ao valor teórico de 5% de substituição molar Ca: Zn adotado na síntese da ZnHA. Este resultado sugere uma dificuldade do íon Zn^{+2} em substituir os íons Ca^{+2} na rede da HA, trabalhos da literatura encontraram resultados semelhantes, confirmando esse comportamento no material (Hu *et al*, 2012; VENKATASUBBU *et al*, 2011). Além disso, o valor da razão molar Ca+Zn/P encontrado para a ZnHA foi ligeiramente maior do que o valor teórico esperado de razão Ca/P =1,61. Este pequeno desvio pode ser devido a um erro experimental na determinação da razão molar Ca/P de ($\pm 0,03$), e/ou à presença de concentrações pequenas de carbonato, que podem substituir grupos PO_4^{3-} na estrutura da HA, e, conseqüentemente, aumentar o valor de razão molar de (Ca+ Zn)/P, como encontrado na trabalho de VENKATASUBBU *et al* (2011).

6.1.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os difratogramas das amostras de HA e ZnHA são apresentados na FIG.31 e foram refinados pelo Método de Rietveld. As linhas horizontais marcam as posições dos picos de Bragg calculadas e o traço inferior corresponde à diferença entre os padrões observados e calculados. Observa-se que ambas as amostras apresentam picos de difração largos, provavelmente devido à dimensão manométrica de suas partículas.

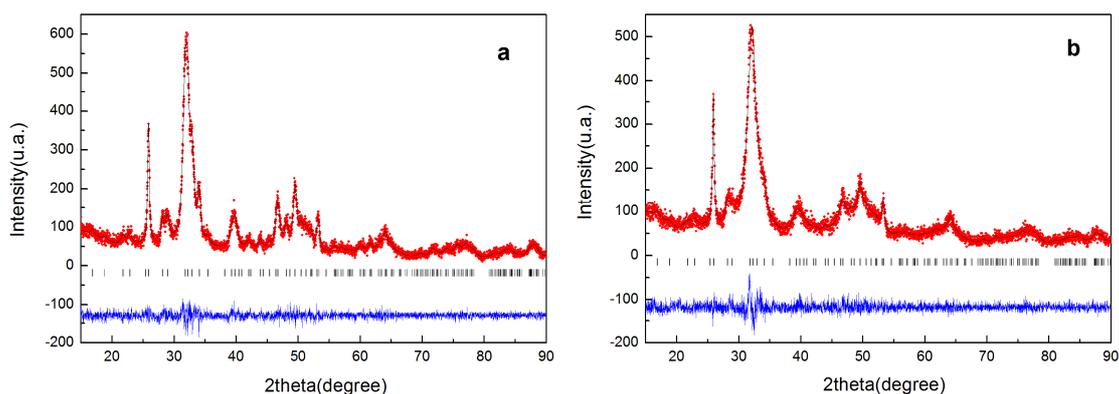


FIG. 6.1: Resultado gráfico do Refinamento de Rietveld dos difratogramas de Raios X das amostra de HA (a) e ZnHA (b), (MAVROPOULOS *et al*, 2013).

Os parâmetros estruturais e microestruturais extraídos do refinamento pelo Método de Rietveld das amostras de HA e ZnHA são mostrados nas TAB. 6.1 e TAB. 6.2. Observa-se uma diminuição dos valores de parâmetro de rede da amostra ZnHA em comparação a amostra HA, provavelmente devido à substituição do íon Ca^{2+} pelo Zn^{2+} na rede cristalina da HA. Um resultado similar foi encontrado no trabalho de REN *et al* (2009), segundo os autores, a redução nos parâmetros de rede foi observada em amostras contendo a substituição de cálcio pelo zinco numa razão de até 10% em mol de Zn. Este resultado poderia ser explicado devido ao menor raio iônico do Zn^{2+} em comparação ao Ca^{2+} , (MAVROPOULOS *et al*, 2013). Considerando os dados indexados pelo JPCDS para os parâmetros de rede da hidroxiapatita ($a = b = 9,4302 \text{ \AA}$, $c = 6,8911 \text{ \AA}$), percebe-se que o material obtido possui uma rede cristalina com dimensões inferiores que o material padrão, o que pode ser resultado das condições de temperatura de síntese inferiores às normalmente empregadas no preparo de um material padrão.

TAB. 6.1 Parâmetros de rede das amostras de HA and ZnHA obtidos no refinamento do Rietveld.

Amostras	a (Å)	c (Å)	Vol.(Å ³)
HA	9.42905	6.88047	529.767
ZnHA	9.42473	6.87064	528.524

Além disso, a TAB. 6.2 mostra que a razão entre as dimensões dos cristalitos nas direções paralela e perpendicular à direção da c foi reduzida com a introdução de Zn. Este resultado indica que os cristalitos de ZnHA possuem dimensões inferiores as de HA.

TAB. 6.2 Dimensões de Tamanho de cristalito das amostras de HA e ZnHA obtidos por refinamentos de Rietveld.

Amostras	Dimensão (Å) (002)	Dimensão (Å) (020)	Dimensão (Å) (220)
HA	286.93	81.17	87.62
ZnHA	232.4	31.09	33.97

6.1.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO - MET

As imagens de microscopia dos cristais da HA e ZnHA são mostradas nas FIG. 6.2 (a e b), respectivamente. Os cristais de HA apresentam morfologia alongada, e formam aglomerados com dimensões micrométricas apresentando porosidade intergranular, FIG. 6.2 a. No caso da imagem da ZnHA, observa-se um alto grau de aglomeração de partículas com morfologia de placas com dimensões em torno de 100 nm, onde a sobreposição de cristais revela uma face extremamente estreita, FIG. 6.2b. Medidas de área superficial BET indicaram valores de $104 \pm 5 \text{ m}^2$ e $164 \pm 5 \text{ m}^2$ para as amostras de HA e ZnHA, respectivamente, com alta incidência de mesoporosidade (2-50 nm) em ambas as amostras. A maior área encontrada na amostra de ZnHA sugere uma dimensão inferior de cristais comparado a amostra de HA.

O trabalho de SWAIN *et al* 2012 mostra a influência do pH e da temperatura na morfologia dos cristais HA. A partir de um digrama de fases contendo as concentrações de Ca, P, pH e temperatura foi possível estabelecer regiões de morfologia esférica, bastão e fibrosa. Em valores de pH intermediários, entre 9-7 ocorre a formação de cristais em forma de

bastão, de forma semelhante a encontrada na amostra de HA. A morfologia encontrada para a ZnHA pode ser descrita como um estado intermediário entre a forma bastão e fibrosa.

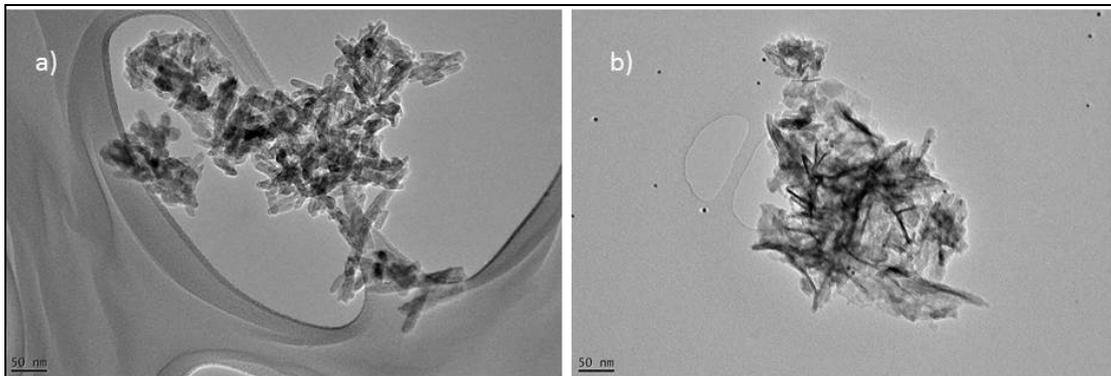


FIG. 6.2- Eletromicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão das amostras de HA (a) e ZnHA (b). (Barra = 50nm).

O trabalho de BISTROV *et al* (2011) menciona a formação de agregados distintos de acordo com a presença de H^+ no meio. Em condições ácidas, os íons H^+ presentes na superfície da HA poderiam alterar o momento dipolo das nanopartículas. Desta forma o alinhamento e a formação de agregados com partículas unidas ao longo do eixo z (arranjo colunar) seriam dificultados, facilitando um arranjo hexagonal, similar a um arranjo esférico. Por outro lado, em condições de pH alto, o efeito dos íons H^+ é minimizado favorecendo a agregação colunar, onde as faces de maior dimensão se alinham. Desta forma a condição de pH alto utilizado no preparo das amostras de HA e ZnHA neste trabalho poderia de forma análoga favorecer a formação de agregados com estruturas colunares.

Uma forma de diminuir a formação de agregados durante a síntese do material e obter suspensões estáveis é citada no trabalho de HAN *et al* (2009). Os autores utilizaram o ultrassom e adicionaram glicosaminoglicanas (GAG) durante a síntese do material, de forma a romper os agregados e obtiveram partículas isoladas contendo GAG em sua superfície. As imagens de MET da amostra de HA obtidas pelos autores apresentaram partículas isoladas sem a ocorrência de sobreposição.

6.1.3 POTENCIAL ZETA, COMPORTAMENTO AO LONGO DO pH

Partindo-se da medida de potencial zeta em pH 10, FIG. 6.3, percebe-se que a amostra de HA, apresenta inicialmente um potencial zeta da ordem de -18mV, e que a adição de HCl 0,05M ao meio provoca uma diminuição gradual do potencial Zeta (em módulo), atingindo o PI em 6,6. Este resultado indica que a amostra de HA sintetizada apresenta características de carga de superfície semelhantes a uma hidroxiapatita estequiométrica.

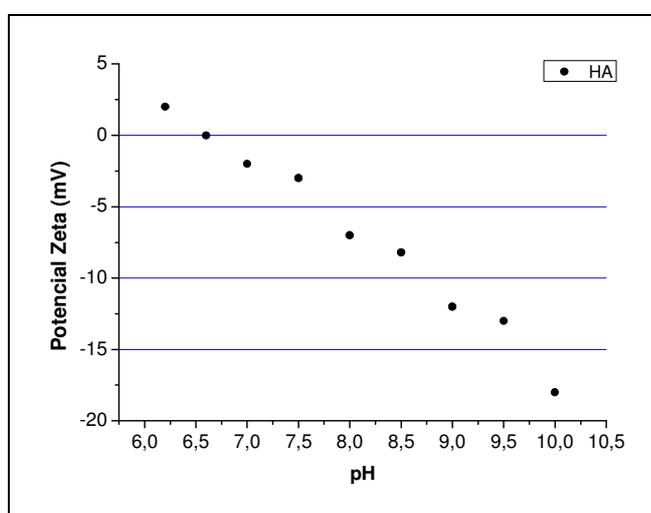


FIG. 6.3 – Leituras de Potencial zeta da amostra de HA ao longo do pH.

Vários trabalhos indicam que o ponto isoelétrico (PI) da HA em água ocorre numa faixa levemente ácida de pH entre 5 e 7, devido a presença de grupos aniônicos OH^- e PO_4^{3-} na superfície do material, que desta forma são neutralizados apenas em condições de meio ácido (BELL *et al*, 1972; SOMASUNDARAN & MARKOVIC, 1998; ELLIOT, 1994). Segundo a literatura, a variação do potencial zeta em amostras de HA pode ocorrer devido a efeitos de tratamento térmico e/ou presença de grupos iônicos substituintes na superfície do material, como por exemplo, carbonatos (KIM *et al*, 2005; LANDI *et al*, 2003).

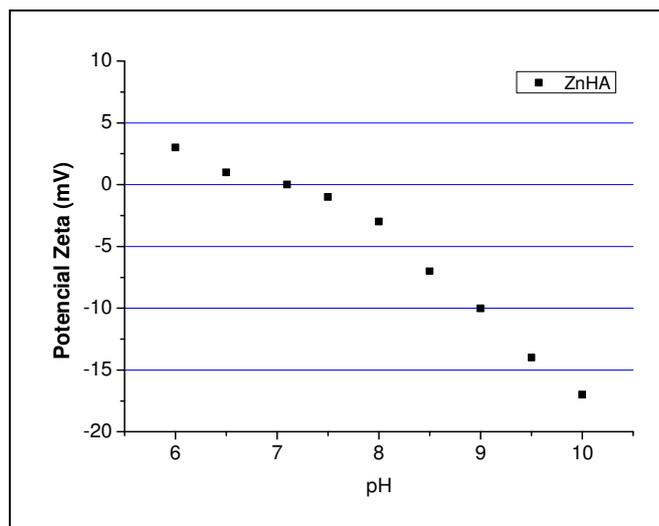


FIG. 6.4 - Leituras de Potencial Zeta da amostra de ZnHA ao longo do pH.

Medidas de potencial zeta para amostra de ZnHA, FIG. 6.4, apresentaram um comportamento similar ao observado para a HA. O PI encontrado para ZnHA ocorreu em pH 7,1. Este pequeno aumento no valor de PI na amostra de ZnHA deve estar relacionado a alterações de grupos carregados na superfície de partículas do material. O trabalho de COSTA *et al* (2004) comenta uma diminuição na intensidade de bandas de FTIR relativas a grupos hidroxila (OH^-) em amostras de ZnHA, sugerindo que a substituição do cátion Zn^{2+} na rede da HA provoca defeitos nos sítios de OH^- . De forma similar, a superfície da ZnHA poderia apresentar também defeitos em alguns sítios de OH^- explicando a variação de PI encontrada no presente trabalho.

6.2 ADSORÇÃO DE ALBUMINA EM HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA

6.2.1 POTENCIAL ZETA, COMPORTAMENTO AO LONGO DO pH

Sendo o potencial zeta uma medida fortemente relacionada à carga existente na superfície de um material, pode-se concluir que o recobrimento da superfície do material por uma camada proteica levaria a variações na medida. A FIG. 6.5 ilustra o comportamento do potencial zeta ao longo do pH para a amostra de HA após a adsorção de BSA. Verificou-se que, em pH 10, o potencial zeta da HA após adsorção de BSA (HA+BSA) situa-se em torno

de -35mV, um valor maior em módulo que o encontrado para a amostra de HA (-20mV) FIG. 6.3.

O PI da HA+ BSA ocorre em pH 5,1, um valor bem menor que o encontrado para a amostra de HA. Este valor é bem próximo ao da BSA pura que apresenta um PI de 4,7-4,9. O trabalho de REZVAN *et al* (2005) obteve um resultado semelhante estudando o potencial zeta de partículas de óxidos biocompatíveis como alumina, titânia, sílica, zircônia em dispersões coloidais após adsorção de albumina (PI: 4,7-4,9) e lizosima (PI: 11). Os valores de PI de todas as amostras após adsorção de proteína se igualaram a valores próximos ao PI das respectivas proteínas devido à formação de uma monocamada proteica. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que ocorreu um processo semelhante.

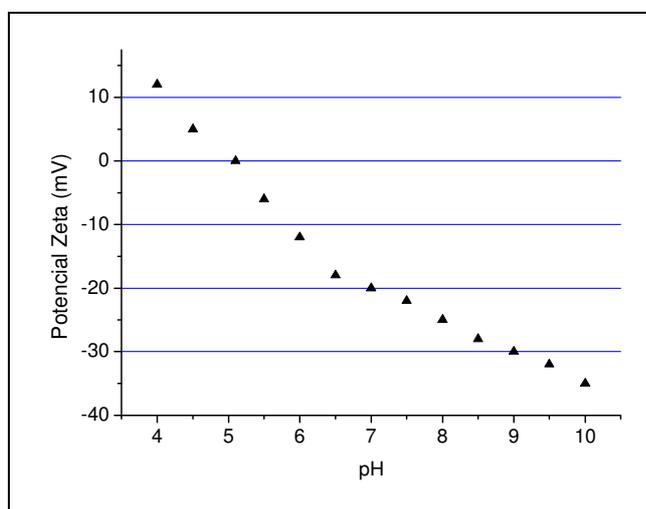


FIG. 6.5- Leituras de Potencial Zeta da amostra de HA após adsorção de BSA ao longo do pH.

Os resultados das medidas de potencial zeta para a amostra de ZnHA após adsorção com BSA (ZnHA+BSA) são similares aos da amostra de HA contendo proteína, FIG. 6.4 e FIG. 6.6. O PI obtido para a amostra de ZnHA+BSA foi 5,3. O valor de potencial zeta lido para a ZnHA+BSA em pH 10 foi de -30mV, sendo um pouco inferior ao encontrado para a amostra HA+BSA (- 35mV), FIG. 6.5. A variação entre os valores de potencial zeta para as amostras de HA+BSA e ZnHA+BSA em pH 10 pode estar relacionada a erros experimentais, ou a menor presença da proteína na superfície do material e seus respectivos contra-íons formadores da dupla camada diminuindo a carga total na superfície da ZnHA.

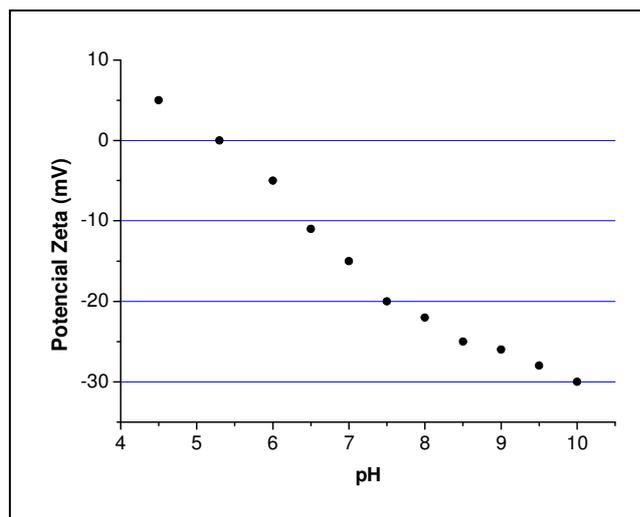


FIG. 6.6- Leituras de Potencial Zeta da amostra de ZnHA após adsorção de BSA ao longo do pH.

6.2.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR)

A análise por infravermelho da amostra em pó liofilizado da BSA (SIGMA-Aldrich) indicou a presença das principais bandas referentes aos grupos amida da cadeia polipeptídica da proteína nos valores de: 3430 cm^{-1} (Amida A), 1655 cm^{-1} (Amida I), 1541 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} (Amida II), 1171 cm^{-1} e 1115 cm^{-1} (Amida III), FIG. 6.7. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura quanto à posição de bandas de amida de proteínas obtidas por análise de FTIR, (ADOCHITEI & DROCHIOIU, 2011, VAN DER WEERT *et al*, 2001).

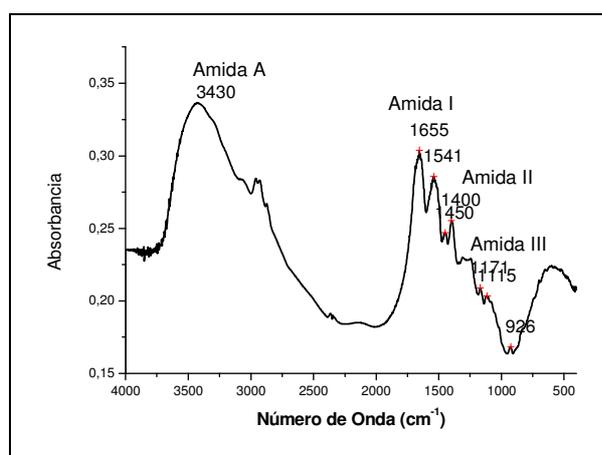


FIG. 6.7 - Espectro de FTIR da BSA (SIGMA-Aldrich).

A FIG. 6.8 apresenta os espectros de FTIR das amostras em pó de HA antes e após a adsorção de BSA. Utilizaram-se condições de saturação que causaram um forte sinal nas bandas de fosfato referentes à HA, obtendo-se desta forma valores de absorbância acima de 1,0. O objetivo dessa saturação foi intensificar o sinal relativo às bandas de amida da proteína que em condições normais de análise poderia ser confundido com ruído.

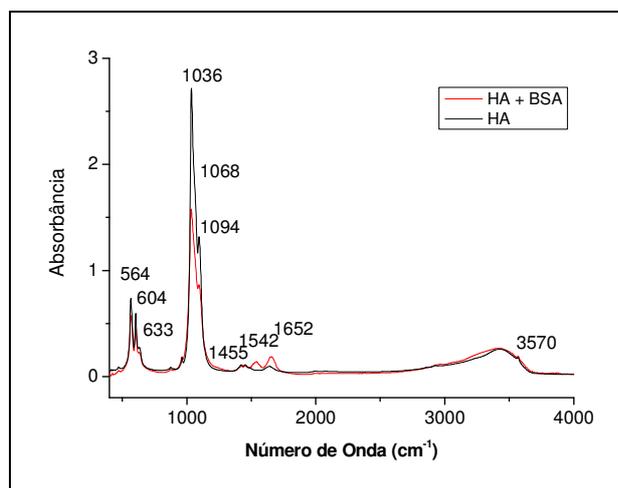


FIG. 6.8 - Espectro de FTIR das amostras de HA antes e após adsorção BSA (2 mg/mL) a temperatura ambiente.

Comparando-se os espectros das amostras de HA antes e após a adsorção de BSA, é possível observar que a presença de bandas coincidentes em 564, 604, 1036, 1068, 1094 cm^{-1} devido à presença de grupos fosfatos, em 630 e 3570 cm^{-1} aos grupos hidroxila e em 1420 e 1455 cm^{-1} devido a grupos carbonato (K OUTSOPOULOS, 2002). Bandas adicionais atribuídas a grupos amida são observadas apenas no espectro da amostra de HA+BSA (2 mg/mL) em 1652 cm^{-1} (Amida I), 1542 cm^{-1} (Amida II), FIG.38.

A FIG. 6.9 apresenta a subtração do espectro de FTIR da amostra de HA+BSA, utilizando-se o espectro da HA como base. Selecionando-se a região de amida I foi possível realizar a sua deconvolução em bandas primárias. Desta forma obtiveram-se bandas de amida relativas a diferentes modos vibracionais das regiões de estruturas α -hélice, folha- β e alça- β (β -turn) presentes ao longo da cadeia polipeptídica da proteína e também da proteína na forma agregada.

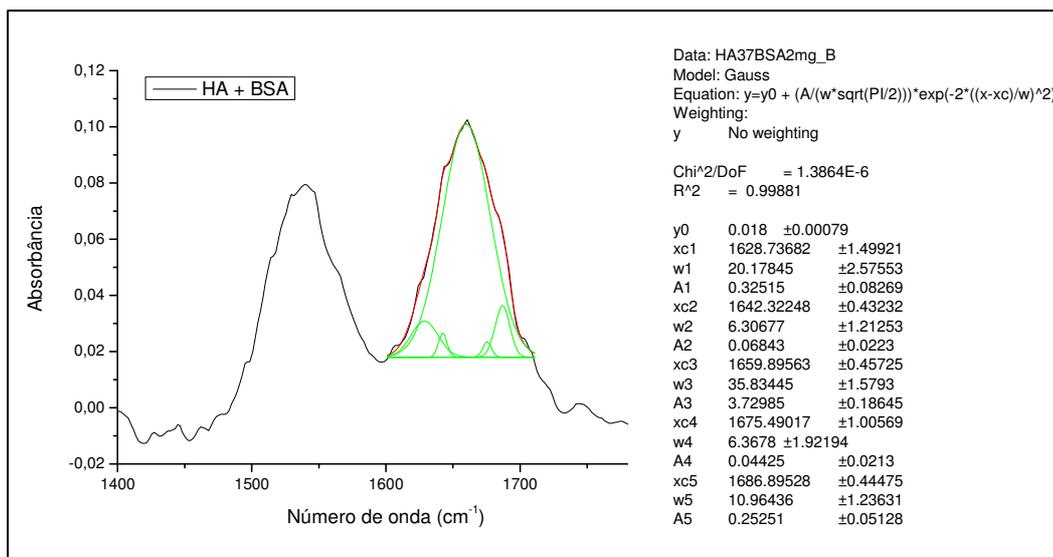


FIG. 6.9 - Subtração de espectros de FTIR das amostras de HA antes e após adsorção de BSA na região de 1400 a 1750 cm^{-1} .

TAB. 6.3 Valores de deconvolução da banda de Amida I a partir do espectro de subtração da amostra HA + BSA, dados correlacionados a KONG *et al* (2007) e VAN DER WEET *et al* (2001).

Banda (cm^{-1})	Área	Estrutura Secundária (cm^{-1})	% Área*
1687	0,2525	Agregado (1685-1695)	5,24
1675	0,4425	Alça- β (1680-1665)	9,18
1659	3,7298	α -hélice (1665-1655)	77,4
1642	0,0684	Folha- β (1625-1642)	1,42
1628	0,3251	Agregado (1620-1630)	6,67

* Valores relativos à área total de 4,8184

A TAB. 6.3 indica os valores percentuais de cada estrutura secundária da BSA obtidos a partir da relação de área das bandas primárias na região da Amida I. Foram utilizadas curvas gaussianas para a simulação das bandas pelo software Origin 7.0, sendo possível obter a área de cada curva a partir dos dados de simulação. Verifica-se a predominância da estrutura α -hélice, sugerindo que o processo de imobilização da BSA na superfície da HA manteve a sua estrutura nativa. Vale ressaltar que os valores obtidos são considerados semi-quantitativos, uma vez que a técnica de FTIR geralmente não é utilizada para apresentação de dados quantitativos, e, além disso, a banda de vibrações O-H da água ocorre na mesma região e mesmo após a secagem das amostras encontra-se presente em pequena quantidade.

Na FIG. 6.10 são mostrados os resultados de deconvolução do espectro de FTIR na região de Amida I da amostra de ZnHA após adsorção de BSA subtraída pelo espectro da amostra de ZnHA.

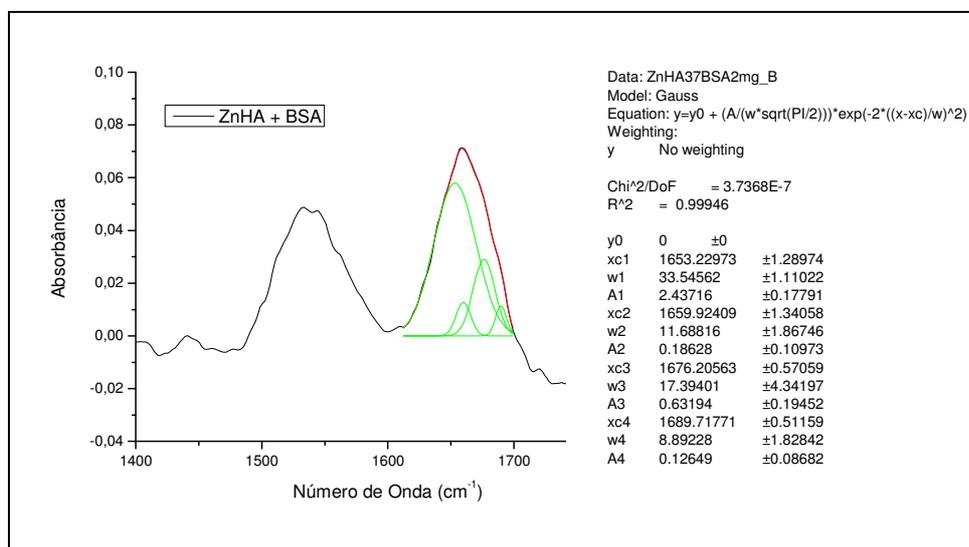


FIG. 6.10 - Subtração de espectros de FTIR das amostras de ZnHA antes e após adsorção de BSA na região de 1400 a 1750 cm^{-1} .

A TAB. 6.4 mostra os percentuais em área das bandas na região de amida I da ZnHA+BSA. Observa-se a presença de estruturas secundárias de proteína, com predominância da forma α -hélice, sendo este um resultado similar ao encontrado na amostra de HA+BSA, e de acordo com a literatura (KAIDEN, 1987).

TAB. 6.4 Valores de deconvolução da banda de Amida I a partir do espectro de subtração da amostra ZnHA + BSA.

Banda (cm^{-1})	Área	Estrutura Secundária	% Área
1689	0,12649	Agregado	3,74%
1676	0,63194	Alça- β	18,69%
1659	0,18628	α -hélice	77,57%
1653	2,43716	α -hélice	

* Valores relativos à área total de 3,3819.

6.2.3 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

A espectroscopia de UV-Vis no modo refletância ainda tem sido pouco utilizada em estudos de imobilização de proteínas em biomateriais. O trabalho de BURT *et al* (2004) estudou a imobilização de BSA em nanopartículas de ouro. Os resultados de espectroscopia Raman indicaram que a banda em 508 cm^{-1} relativa ao estiramento da ligação dissulfeto (S-S) presente na BSA apresentou uma queda brusca na análise do material preparado. Essa ligação é característica de pontes de enxofre laterais ligando regiões distantes da cadeia polipeptídica estabilizando sua estrutura nativa tridimensional. A queda de intensidade da banda estudada estaria vinculada a quebra dessas ligações intermoleculares na proteína (S-S), e seguida interação com a superfície das nanopartículas de ouro. De forma análoga os autores atribuíram à diminuição da intensidade da banda de UV-Vis da proteína em 278 nm à interação da proteína com as nanopartículas de ouro.

A FIG. 6.11 mostra o espectro na região de UV-Vis da BSA (Sigma-Aldrich). Observa-se a presença de duas bandas intensas em 238 e 278 nm com sobreposição, relativas ao sinal da cadeia polipeptídica (180-230nm), aos anéis aromáticos (260-280 nm) e/ou ligação dissulfeto (~260nm), (SREERAMA *et al*, 1999).

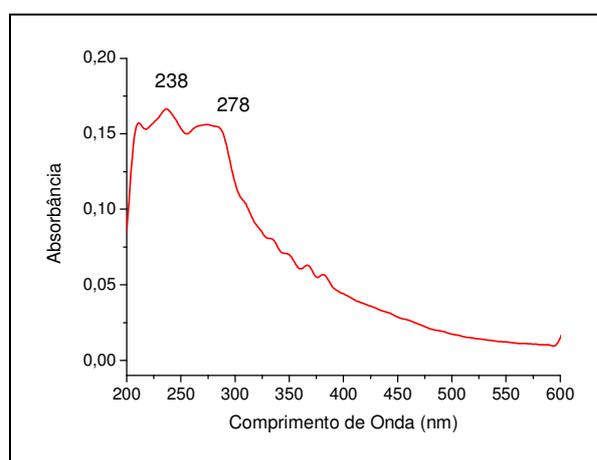


FIG. 6.11 - Espectro de UV-Vis da amostra BSA (Sigma-Aldrich) liofilizada.

A FIG. 6.12 apresenta o espectro de UV-Vis da HA pura, onde se verifica alto valor de absorvância no início da região de ultravioleta 200 nm, seguido de queda acentuada até atingir

a linha base em 250 nm. Devido à atividade ótica da HA na região de interesse (200-300nm) utilizou-se a amostra de HA no porta amostras de referência na análise de UV-Vis.

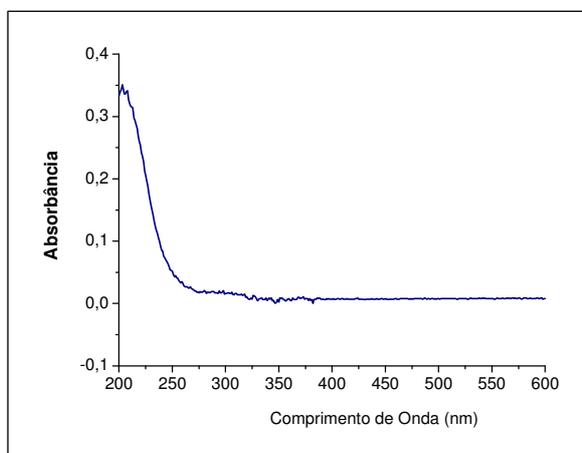


FIG. 6.12 - Espectro de UV-Vis da amostra de pura HA.

A FIG. 6.13 mostra o espectro de UV-Vis da amostra de ZnHA utilizando a amostra de HA como referência, observa-se um sinal inicial negativo devido provavelmente a uma menor atividade ótica do material na região próxima a 200 nm.

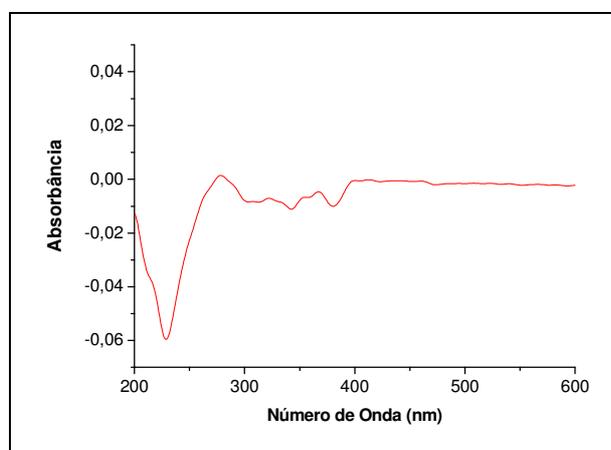


FIG. 6.13 - Espectro de UV-Vis da amostra de ZnHA.

Estes resultados indicaram que com o uso da HA no porta amostra referência, tem-se a diminuição da intensidade de absorbância na região de interesse, facilitando o estudo de bandas de absorção no UV-Vis das proteínas das amostras.

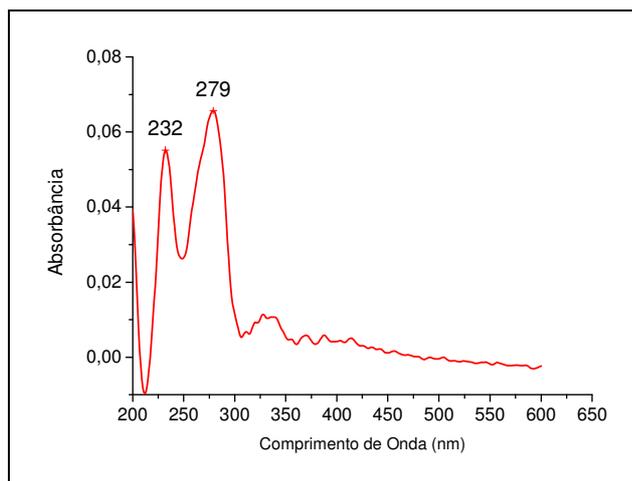


FIG. 6.14 - Espectro de UV-Vis da amostra de HA+BSA a 37°C.

A FIG. 6.14 mostra o espectro obtido da amostra de HA+BSA, verifica-se a permanência das duas bandas relativas à proteína, com pequeno deslocamento da banda de 238 nm para 232 nm. Vale ressaltar que os picos apresentam menor sobreposição, sugerindo que a região ativa devido a pontes de enxofre (ligação dissulfeto S-S) poderia ter sua intensidade reduzida devido à interação da proteína com a superfície da amostra.

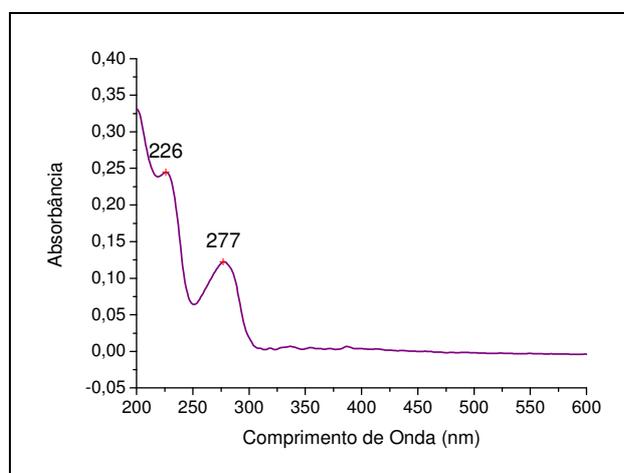


FIG. 6.15 - Espectro de UV-Vis da amostra de ZnHA+BSA a 37°C.

Na FIG. 6.15 é apresentado o espectro de UV-Vis da amostra de ZnHA+BSA. A presença de picos em 226 e 277nm indicam a presença de proteína, e de modo similar à amostra de HA+BSA, a menor sobreposição entre esses picos poderia estar relacionada à quebra de pontes de enxofre seguida de nova interação da proteína à superfície do material.

6.2.4 DICROÍSMO CIRCULAR NO ULTRAVIOLETA (DC)

A análise dos espectros de dicroísmo circular permitiu avaliar alterações na estrutura secundária das proteínas, que podem estar relacionadas à mudança de conformação devido à interação da proteína com a superfície do material. Para estimar essa mudança conformacional, utilizou-se o software Dichroweb, que calcula a percentagem de cada tipo de estrutura secundária presente a partir do sinal do espectro de DC na região de 190-240 nm.

A FIG. 6.16 mostra o espectro de DC da solução de BSA 0,1mg/ml em tampão fosfato 0,01M. Observam-se picos mínimos em 209 e 220nm e um pico máximo em 190 nm, característicos de proteínas com alto teor de estrutura α -hélice. Esse dado foi confirmado pela estimativa da estrutura secundária da BSA contendo 53% de estrutura em alfa-hélice, obtida pelo programa Dichroweb, TAB. 6.5.

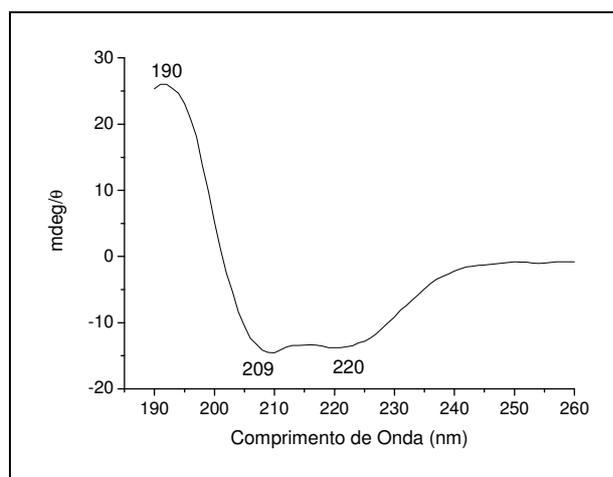


FIG. 6.16 – Espectro de DC da solução de BSA (Sigma-Aldrich) 0,1mg/mL em tampão fosfato pH6,0.

TAB. 6.5 Estimativa de Estrutura Secundária da BSA em solução de 0,1mg/mL em tampão fosfato à partir do espectro de DC e correlação pelo software Dichroweb.

Estrutura 2 ^{aria}	%
α -hélice	53
folha- β	11
Alça- β	14
Randômica	22

A FIG. 6.17 mostra o espectro de DC da dispersão da amostra de HA+BSA em temperatura ambiente. Observa-se uma queda na intensidade de sinal no espectro, aumento de ruído e a presença de dois picos, sendo o primeiro em 190 nm e o segundo próximo a 220 nm. A estimativa da estrutura secundária segundo o software Dichroweb da BSA após a adsorção na HA indicou uma queda na estrutura alça- β (β -turn) e um gradual aumento da estrutura α -hélice, TAB. 6.6.

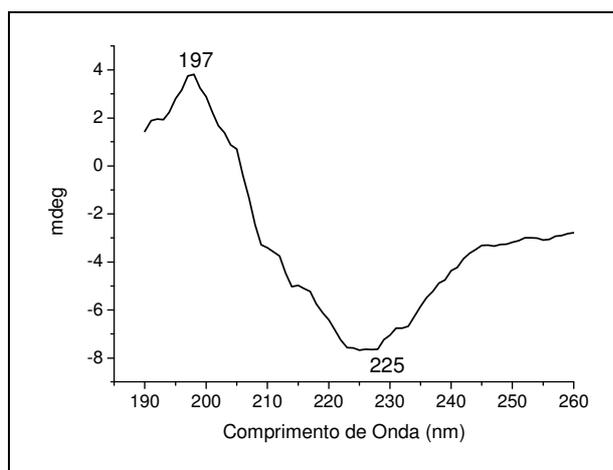


FIG. 6.17 Espectro de DC da dispersão em água da amostra de HA+ BSA.

TAB. 6.6 Estimativa de Estrutura Secundária da BSA adsorvida em HA.

Estrutura 2 ^{aria}	%
α -hélice	62
Folha- β	12
Alça- β	2
Randômica	22

A FIG. 6.18 mostra o espectro de DC da dispersão em água da amostra de ZnHA +BSA, verifica-se um resultado similar ao da HA após a adsorção da proteína, porém a estimativa de estrutura secundária mostra uma redução na estrutura alça- β e aumento da estrutura folha- β , TAB. 6.7.

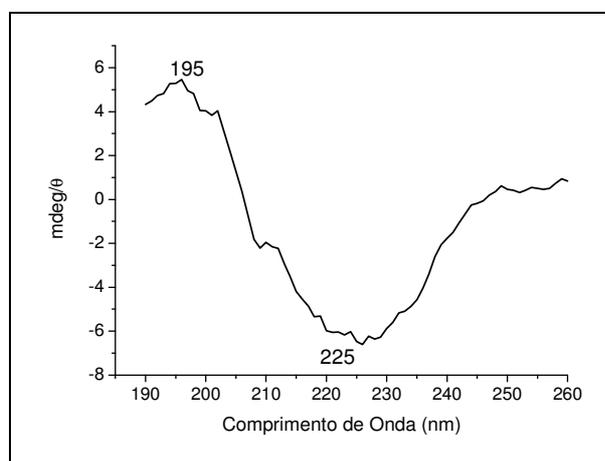


FIG. 6.18 - Espectro de DC da dispersão em água da amostra de ZnHA + BSA.

TAB. 6.7 Estimativa de Estrutura Secundária da BSA adsorvida em ZnHA.

Estrutura 2 ^{aria}	%
Alfa-helix	58
Folha- β	16
Alça- β	09
Randômica	17

Comparando-se os resultados obtidos na análise de DC da HA e ZnHA após adsorção de BSA, TAB. 6.7 e TAB. 6.6, percebe-se que o processo de adsorção favorece a manutenção da estrutura secundária nativa da BSA em ambos os materiais, devido ao alto teor de estrutura α -hélice encontrado.

6.2.5 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

O resultado das análises quantitativas de BSA por espectrometria no UV-Vis a 280 nm possibilitaram a plotagem de isotermas de adsorção, que permitiram a simulação de curvas a partir das equações de Langmuir e Langmuir-Freundlich. A FIG. 6.19 mostra a melhor simulação obtida para a adsorção de BSA na HA em tampão fosfato 0,01M, pH 6,0 a temperatura de 37°C seguindo o modelo de Langmuir-Freundlich. Observa-se uma tendência a valores superiores na capacidade de adsorção de proteína pelo material devido provavelmente a formação de multicamadas.

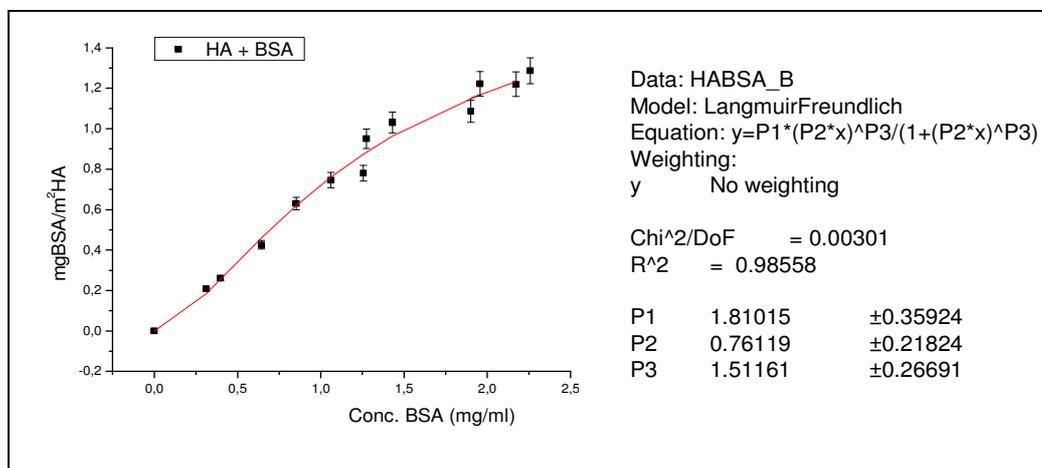


FIG. 6.19 - Simulação de curva seguindo o modelo Langmuir-Freundlich em experimento de adsorção de BSA em HA a 37°C.

A FIG. 6.20 apresenta a curva de isoterma obtida na adsorção de BSA pela amostra de ZnHA, verifica-se um resultado próximo da linearidade, que poderia ocorrer devido a uma capacidade superior dessa amostra em adsorver a BSA, porém pontos extras seriam necessários para confirmar tal resultado.

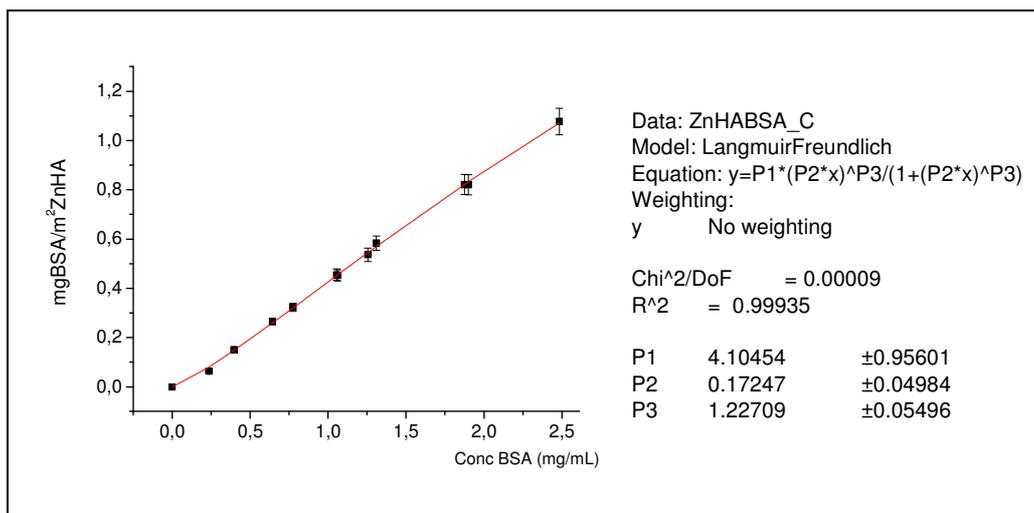


FIG. 6.20 - Simulação de curva seguindo o modelo Langmuir-Freundlich em experimento de adsorção de BSA em HA a 37°C.

Os resultados obtidos nas isotermas de BSA nas amostras de HA e ZnHA, FIG. 6.19 e FIG. 6.20, sugerem uma maior capacidade de adsorção da ZnHA, no entanto pontos adicionais com concentrações superiores de BSA são necessários para afirmar tal comportamento.

6.3 ADSORÇÃO DE MIOGLOBINA EM HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA

6.3.1 POTENCIAL ZETA, COMPORTAMENTO AO LONGO DO pH

Os resultados das medidas de potencial zeta para a amostra de HA após adsorção de mioglobina equina, (HA+Mb) são mostrados na FIG. 6.21. Observa-se um resultado similar ao encontrado na amostra de HA+ BSA, FIG. 6.5 ocorrendo um deslocamento do PI para valores inferiores ao da amostra de HA sem proteína. Verifica-se que o PI da amostra situa-se em pH 5,8. Este valor é relativamente inferior ao do PI da mioglobina (PI= 7,0), sugerindo que o processo de adsorção da proteína na superfície do material poderia envolver interações entre radicais carregados presentes na cadeia polipeptídica e sítios ativos presentes na superfície do material.

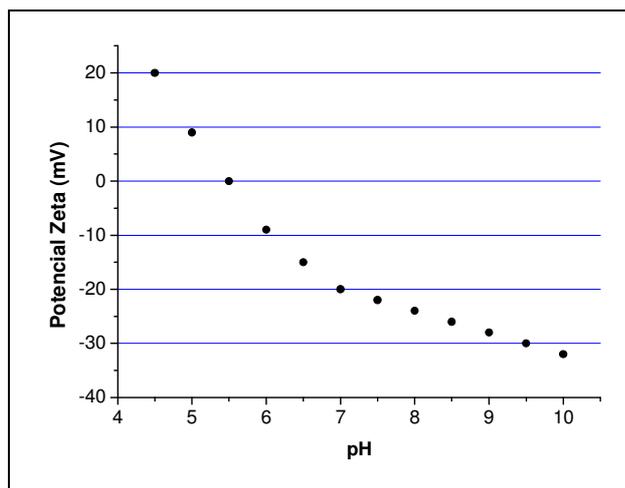


FIG. 6.21 - Leituras de Potencial Zeta da amostra de HA após adsorção de mioglobina ao longo do pH.

A FIG. 6.22 mostra o resultado das medidas de Potencial Zeta para a amostra de ZnHA após adsorção de mioglobina equina, (ZnHA + Mb). O valor de PI encontrado foi de 6,0, resultado similar ao encontrado na amostra de HA contendo a mesma proteína, sugerindo um processo semelhante de recobrimento da mioglobina e a superfície dos materiais estudados.

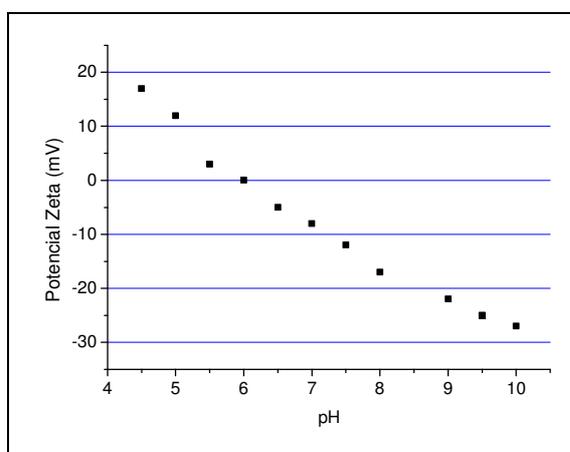


FIG. 6.22 - Leituras de Potencial Zeta da amostra de ZnHA após adsorção de mioglobina ao longo do pH.

6.3.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR)

A FIG. 6.23 apresenta a subtração do espectro de FTIR da amostra de HA + Mb, usando-se o espectro da HA como base. A partir da seleção da banda de amida I foi possível realizar a deconvolução da região selecionada em bandas primárias. A TAB. 6.8 indica a predominância da estrutura volta-beta a partir da relação de áreas encontrada nas curvas gaussianas obtidas para cada banda primária analisada. Vale salientar que dados da literatura indicam a presença de bandas relativas à presença de água em 1640 cm^{-1} devido ao estiramento da ligação (O-H). Por outro lado, sabe-se que em solução aquosa a proteína apresenta uma envoltória de moléculas de água devido à exposição de radicais polares da sequência de aminoácidos presente na cadeia polipeptídica (VEDANTHAM *et al*, 2000). Desta forma a banda em 1642 cm^{-1} também poderia ser atribuída à permanência da molécula de água que poderia favorecer a estabilidade da estrutura secundária, no caso de ocorrer uma fraca interação da proteína com a superfície do material.

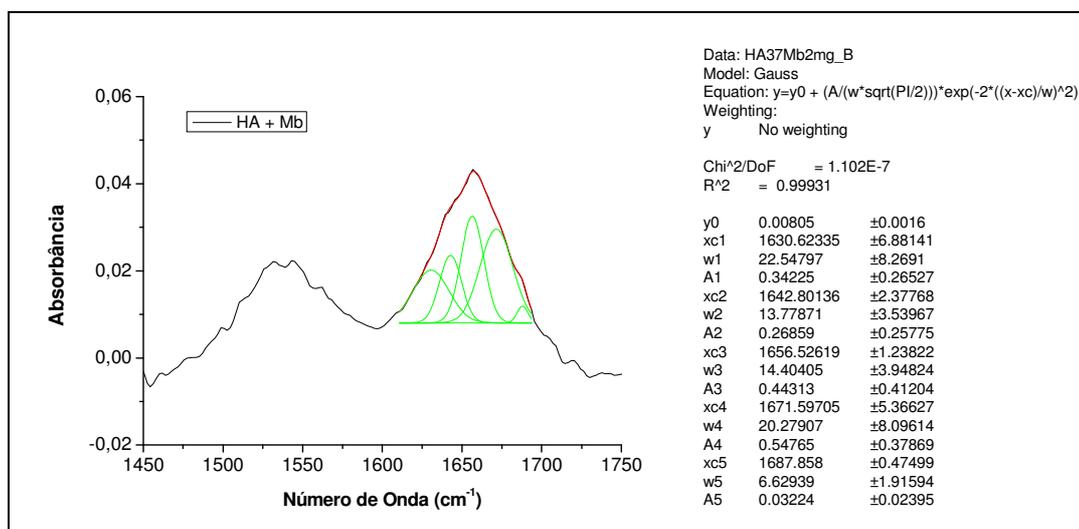


FIG. 6.23 - Subtração de espectros de FTIR das amostras de HA antes e após adsorção de Mioglobina na região de $1400\text{ a }1750\text{ cm}^{-1}$.

TAB. 6.8 Valores de deconvolução da banda de Amida I a partir do espectro de subtração da amostra HA + Mb.

Banda (cm ⁻¹)	Área	Estrutura Secundária	% Área
1687	0,03224	Agregado	1,97
1671	0,54765	Alça-β	33,52
1656	0,44313	α-hélice	27,71
1642	0,26859	Folha-β	16,44
1630	0,34225	Agregado	20,95

* Valores relativos à área total de 1,6339

No caso da análise por FTIR da amostra de ZnHA + Mb verifica-se a predominância da estrutura em α -hélice, (FIG. 6.24 e TAB. 6.9). Este resultado sugere que a adsorção da mioglobina equina em ZnHA não causou alterações na conformação nativa da proteína, uma vez que dados da literatura indicam que esta proteína apresenta alto teor de conformação α-hélice (FRANZEN et al, 1999).

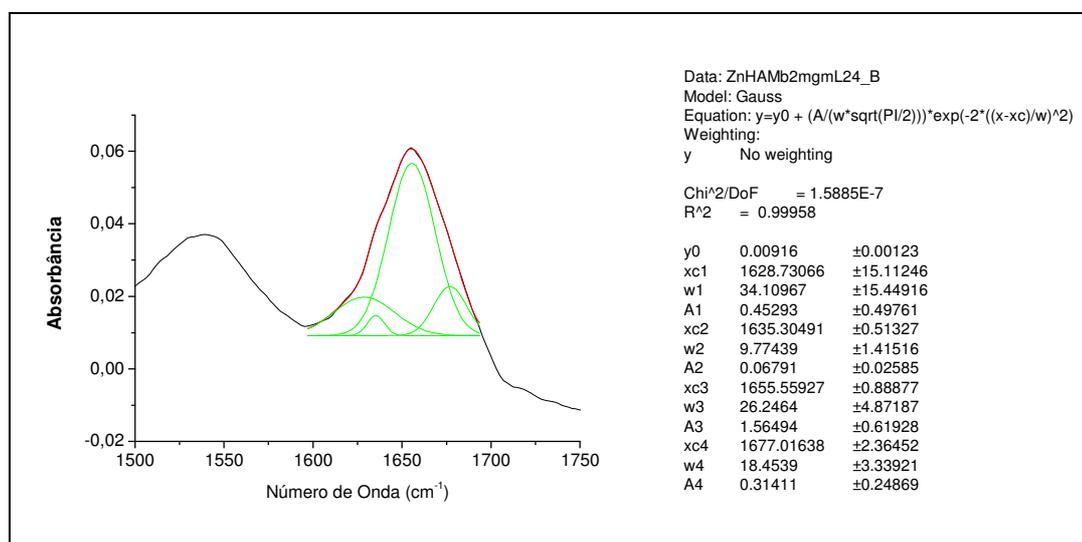


FIG. 6.24 - Subtração de espectros de FTIR das amostras de ZnHA antes e após adsorção de Mioglobina na região de 1400 a 1750 cm⁻¹.

TAB. 6.9 Valores de deconvolução da banda de Amida I a partir do espectro de subtração da amostra ZnHA + Mb.

Banda (cm ⁻¹)	Área	Estrutura Secundária	% Área
1677	0,3141	Alça-β	13,09
1655	1,5649	α-hélice	65,21
1635	0,0679	Folha-β	2,83
1628	0,4529	Agregado	18,87

* Valores relativos à área total de 2,3998

6.3.3 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

O espectro da amostra da mioglobina equina (Sigma-Aldrich) em pó foi obtido por Espectroscopia no UV-Vis no modo de refletância, FIG. 6.25. É possível observar a presença de sinal de absorbância tanto em bandas em 228 e 280 nm pertencentes à região do ultravioleta (200-400nm), e em 414, 540, 562 e 634 nm pertencentes à região do visível (400-700nm). A mioglobina (Mb) apresenta coloração marrom-avermelhada o que confirma a sua capacidade de absorção na região do visível. Dados da literatura indicaram que a Mb apresenta bandas de absorbância principais em torno de 400nm (Soret) e 536 nm (Q), devido à degeneração dos orbitais HOMO e LUMO do grupo prostético HEME que possui um átomo de ferro, além de bandas secundárias na região do visível relativas à transferência de carga ligante-metal, (FRANZEN et al, 1999). O resultado da análise por UV-Vis da Mb obtido está portanto de acordo com dados literatura.

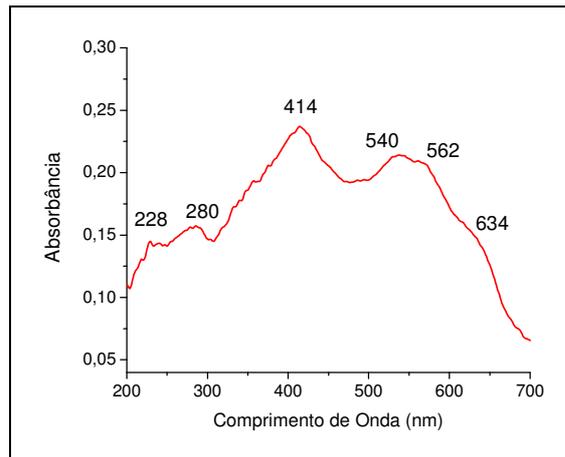


FIG. 6.25 - Espectro de UV-Vis da Mioglobina Equina da Sigma-Aldrich.

A FIG. 6.26 mostra o espectro de UV-Vis da amostra de HA+Mb, verifica-se que as bandas situadas em 540 e 562 nm estão ausentes sugerindo que o processo de adsorção da Mb na superfície da HA apresenta interação com o grupo presente na proteína.

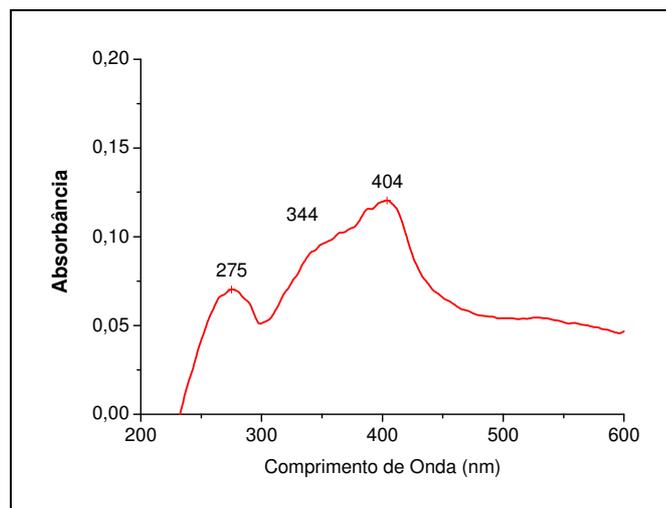


FIG. 6.26 - Espectro de UV-Vis da amostra de HA após adsorção de Mb a 37°C.

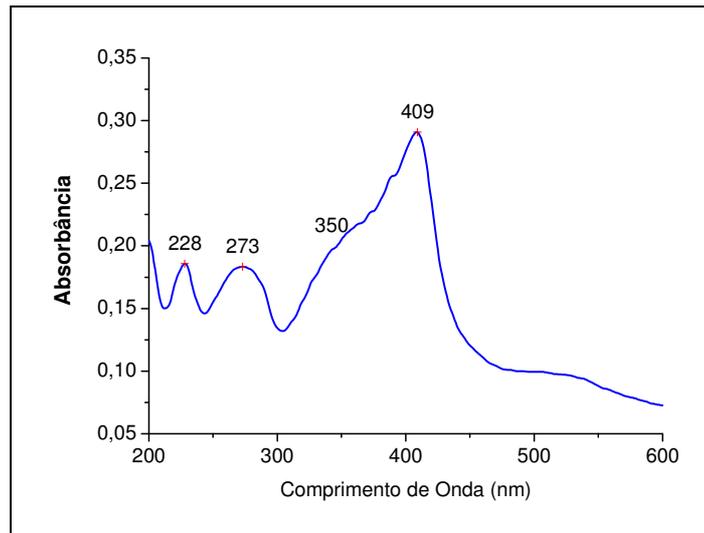


FIG. 6.27 - Espectro de UV-Vis da amostra de ZnHA após adsorção de Mb a 37°C.

A FIG. 6.27 apresenta o espectro da amostra de ZnHA + Mb, verifica-se um perfil similar ao obtido no espectro da HA+Mb, FIG. 6.26, sugerindo a existência de interação entre a superfície do material e o grupo HEME da Mb. Além disso, percebe-se a presença de um pico em 228nm na amostra de ZnHA+Mb, indicando um sinal extra da cadeia polipeptídica da proteína.

6.3.4 DICROÍSMO CIRCULAR NO ULTRAVIOLETA (DC)

A análise dos espectros de dicroísmo circular permitiu avaliar as alterações na estrutura secundária da Mb após a adsorção nas amostras de HA e ZnHA dispersas em meio aquoso. A FIG. 6.28 mostra o espectro de DC da solução de Mb 0,1mg/ml em tampão fosfato 0,01M. Observam-se picos mínimos em 213 e 222 nm e um pico máximo em 193 nm. A estimativa da estrutura secundária da Mb foi obtida pelo programa Dichroweb indica um baixo teor de de estrutura em α -hélice, 14%, sugerindo perda da estrutura nativa na solução preparada, TAB. 6.10. Este resultado pode ser explicado pelo curto tempo de estocagem usual para as soluções de proteína, cerca de uma a duas semanas.

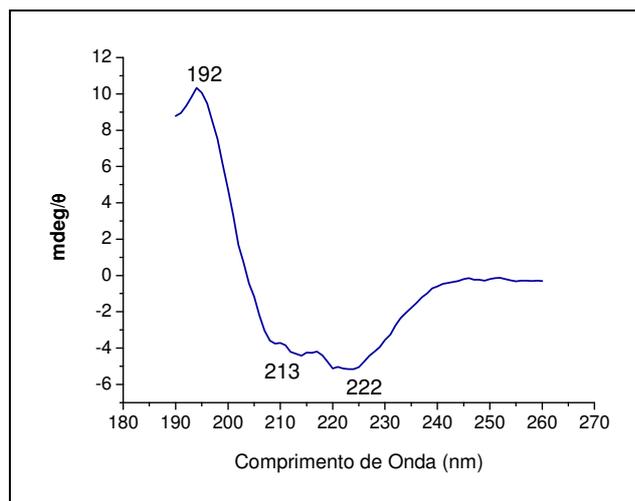


FIG. 6.28 – Espectro de DC da solução de Mb (Sigma-Aldrich) 0,1mg/mL em tampão fosfato pH6,0.

TAB. 6.10 Estimativa de Estrutura Secundária da Mb em solução de 0,1mg/mL em tampão fosfato à partir dos espectro de DC e correlação pelo software Dichroweb.

Estrutura 2 ^{aria}	%
α -hélice	14
Folha- β	31
Alça- β	23
Randômica	32

A FIG. 6.29 mostra o espectro de DC obtido para a amostra HA + Mb dispersa em meio aquoso, verifica-se uma intensidade de sinal superior ao obtido para a solução de Mb inicial. Os dados de estimativa da estrutura secundária obtidos indicam um alto teor de estrutura α -hélice sugerindo a reconstituição da estrutura nativa após o processo de adsorção no material, TAB. 6.11.

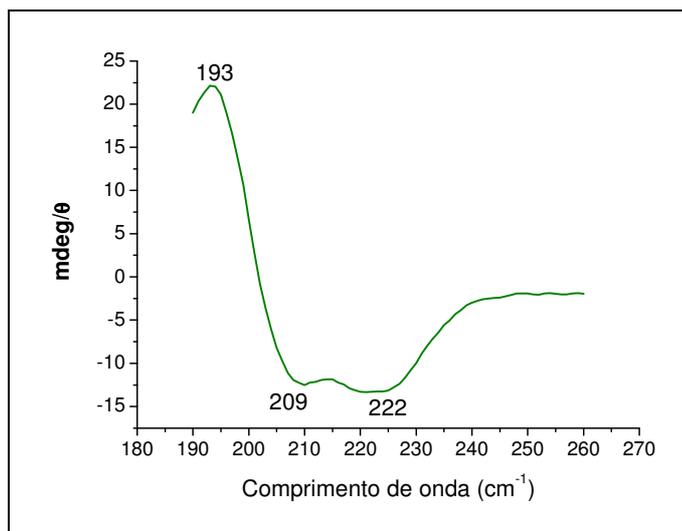


FIG. 6.29 - Espectro de DC da dispersão em água da amostra de HA + Mb.

TAB. 6.11 Estimativa de Estrutura Secundária da Mb adsorvida em HA.

Estrutura 2 ^{aria}	%
α -hélice	52
Folha- β	08
Alça- β	16
Randômica	23

A FIG. 6.30 mostra o espectro da amostra de ZnHA + Mb, novamente observa-se uma intensidade de sinal superior ao encontrado na solução inicial de Mb. A estimativa de estrutura secundária de proteína encontrada indica um teor de 56% de estrutura α -hélice, sugerindo também a reconstituição da estrutura nativa da proteína após o processo de adsorção, TAB. 6.12.

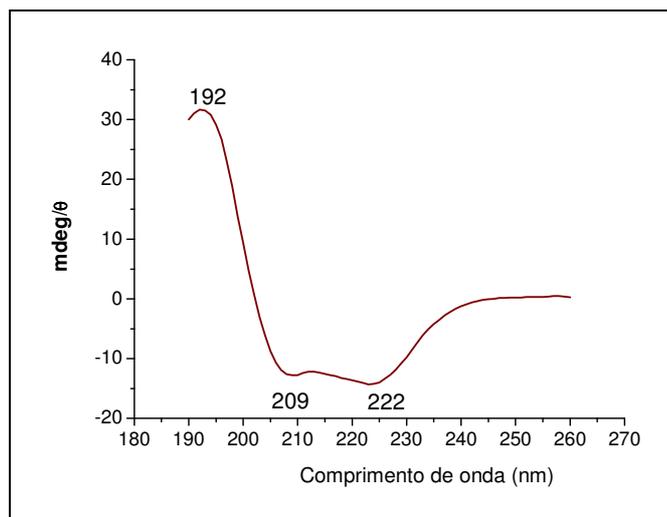


FIG. 6.30 - Espectro de DC da dispersão em água da amostra de ZnHA + Mb.

TAB. 6.12 Estimativa de Estrutura Secundária da Mb adsorvida em ZnHA.

Estrutura 2 ^{aria}	%
α -hélice	56
Folha- β	10
Alça- β	12
Randômica	22

6.3.5 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

O resultado das análises espectrometria no UV-Vis em 280 nm para a quantificação de Mb nas soluções remanescentes dos experimentos de adsorção possibilitaram a plotagem de isotermas de adsorção, que permitiram a simulação de curvas a partir das equações de Langmuir e Langmuir-Freundlich. A FIG. 6.31 mostra a melhor simulação para a adsorção de Mb na HA em tampão fosfato 0,01M, pH 6,0 a temperatura de 37°C, utilizando-se o modelo de Langmuir-Freundlich. Observa-se uma tendência a valores superiores na capacidade de adsorção de proteína pelo material devido provavelmente a formação de multicamadas.

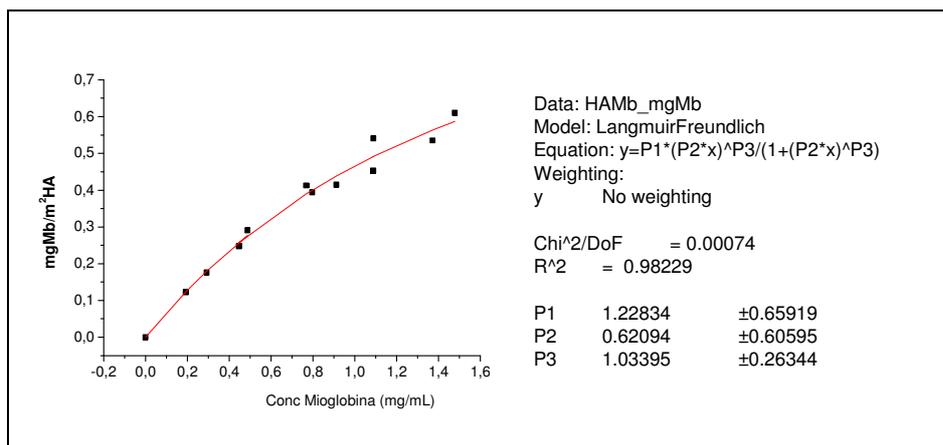


FIG. 6.31 - Simulação de curva seguindo o modelo Langmuir-Freundlich em experimento de adsorção de Mb em HA a 37°C.

A FIG. 6.32 apresenta a curva de isoterma obtida na adsorção de Mb pela amostra de ZnHA, verifica-se um resultado similar ao obtido pela amostra HA + Mb, indicando a formação de multicamadas. Pontos extras seriam importantes para confirmar a ausência do alcance de um patamar de saturação característico do modelo de isoterma proposto por Langmuir.

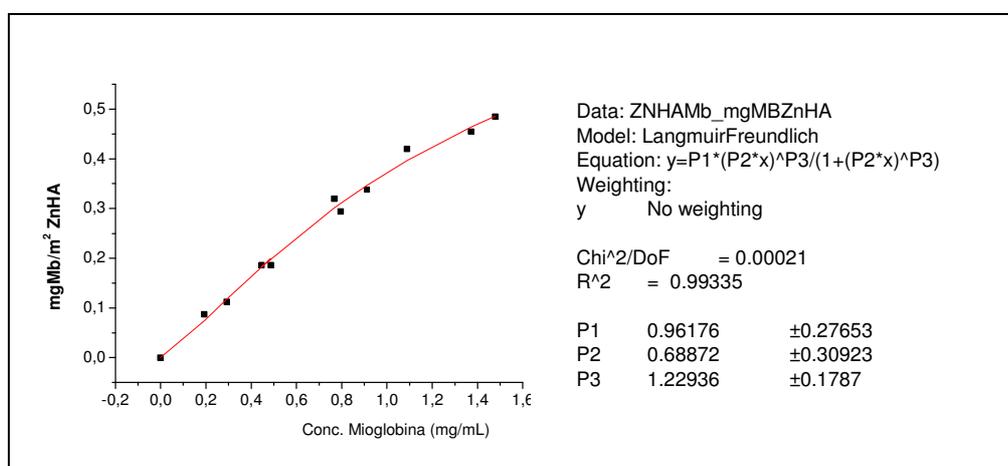


FIG. 6.32 - Simulação de curva seguindo o modelo Langmuir-Freundlich em experimento de adsorção de Mb em ZnHA a 37°C.

Os resultados obtidos nas isotermas de Mb nas amostras de HA e ZnHA, FIG. 6.31 e FIG. 6.32, sugerem uma maior capacidade de adsorção da HA, no entanto pontos adicionais com concentrações superiores de Mb são necessários para afirmar tal comportamento.

6.4 ADSORÇÃO DE INSULINA EM HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA

6.4.1 POTENCIAL ZETA, COMPORTAMENTO AO LONGO DO PH

As medidas de potencial zeta são fortemente relacionadas à carga existente na superfície de um material, e podem indicar alterações provocadas pelo recobrimento da superfície do material pela camada proteica. A FIG. 6.33 ilustra o comportamento do potencial zeta ao longo do pH para a amostra de HA após a adsorção de insulina humana. Verifica-se que, em pH 10, o potencial zeta da HA após adsorção de insulina (HA + Ins) situa-se em torno de -40 mV, um valor maior em módulo que o encontrado para a amostra de HA (-20mV) FIG.33. Além disso, o ponto isoelétrico (PI) da amostra HA+ Ins ocorre em pH 5,2, um valor bem menor que o encontrado para a amostra de HA. Este valor é bem próximo ao da insulina pura que apresenta um PI em torno de 5,3.

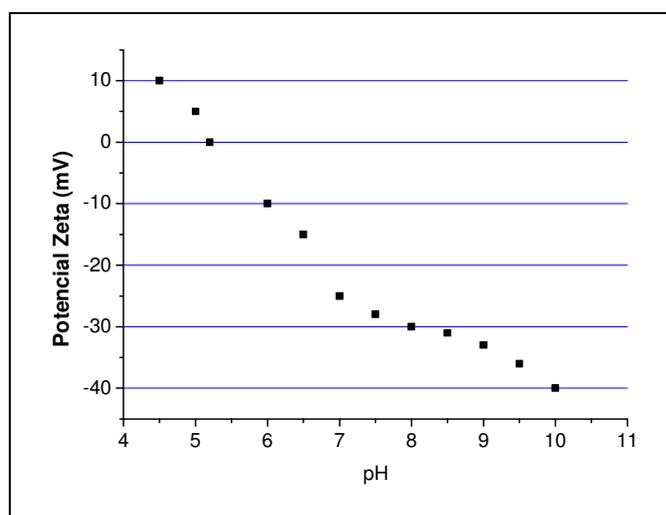


FIG. 6.33 - Leituras de Potencial Zeta da amostra de HA após adsorção de Insulina ao longo do pH.

A FIG. 6.34 mostra o resultado das medidas de Potencial Zeta para a amostra de ZnHA após adsorção de Insulina Human (ZnHA + Ins). O valor de PI encontrado foi de 5,2, valor similar ao encontrado na amostra de HA + Ins, sugerindo um processo semelhante de recobrimento da insulina na superfície dos materiais estudados.

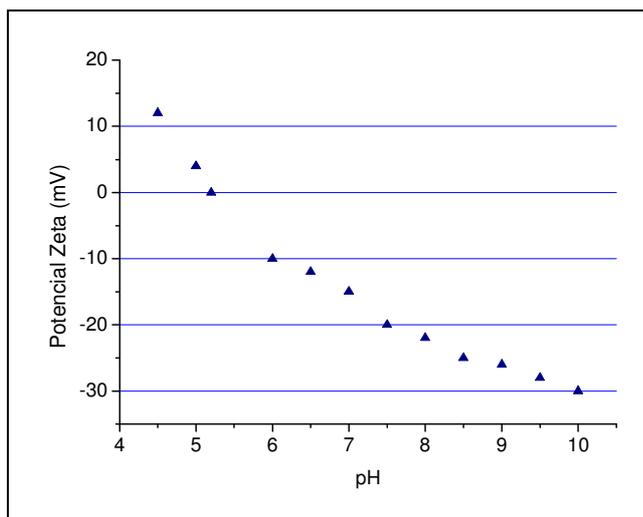


FIG. 6.34 - Leituras de Potencial Zeta da amostra de ZnHA após adsorção de Insulina ao longo do pH.

6.4.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR)

O trabalho de IAFISCO *et al* (2010) estudou a adsorção de proteína em amostras de carbonato apatita por FTIR utilizando pastilhas de KBr, como empregado neste trabalho. Para retirar interferências quanto a adsorção de umidade e ar atmosférico pela pastilha de KBr o autor utilizou condições de baixa pressão para as análises, uma vez que a massa de amostra empregada foi de 2mg. No presente trabalho utilizou-se em todas as análises uma massa de 10mg, de forma a incrementar o sinal das bandas de proteína, diminuindo desta forma, a interferência do ar atmosférico, umidade e ruído.

A FIG. 6.35 apresenta a subtração do espectro de FTIR da amostra de HA+ Ins, utilizando-se o espectro da HA como base. A seleção da região de amida I permitiu realizar a sua deconvolução em bandas primárias.

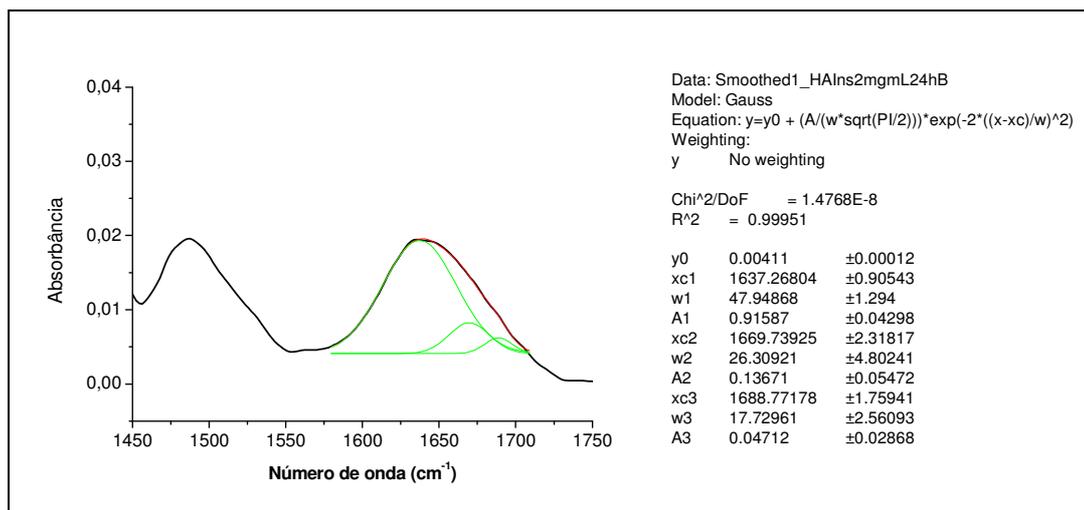


FIG. 6.35 - Subtração de espectros de FTIR das amostras de HA antes e após adsorção de insulina na região de 1400 a 1750 cm^{-1} .

A TAB. 6.13 indica os valores percentuais de cada estrutura secundária da Ins obtidos a partir da relação de área das bandas primárias na região da Amida I. Verifica-se a predominância da estrutura folha- β , sugerindo que o processo de imobilização da Ins na superfície da HA alterou a sua estrutura nativa, e/ou poderia ter ocorrido através de interação da superfície do material com a região de conformação α -hélice.

TAB. 6.13 Valores de deconvolução da banda de Amida I a partir do espectro de subtração da amostra de HA + Ins.

Banda (cm^{-1})	Area	Estrutura 2nd	% Area
1688	0,0471	Agregado	4,28
1670	0,1367	Alça- β	12,43
1637	0,9159	Folha- β	83,29

* Valores relativos à área total de 1,0997

No caso da análise por FTIR amostra de ZnHA + Ins verifica-se um teor mais elevado da estrutura secundária α -hélice, (FIG. 6.36 e TAB. 6.14). Este resultado sugere que a adsorção da insulina na amostra de ZnHA causou menor alteração na conformação nativa da proteína comparado ao resultado da amostra HA + Ins.

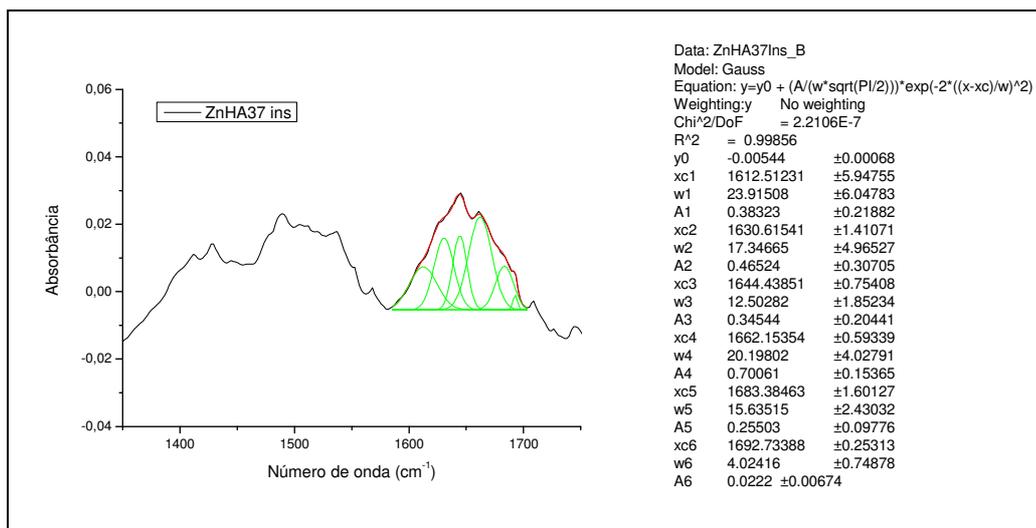


FIG. 6.36 - Subtração de espectros de FTIR das amostras de ZnHA antes e após adsorção de insulina na região de 1400 a 1750 cm^{-1} .

TAB. 6.14 Valores de deconvolução da banda de Amida I a partir do espectro de subtração da amostra ZnHA +Ins.

Banda (cm^{-1})	Area	Estrutura Secundária	% Area
1692	0,0222	Agregado	1,02
1683	0,2550	Alça- β	11,74
1662	0,7006	α -hélice	32,26
1644	0,3454	Randômico	15,90
1630	0,4652	Folha- β	21,42
1612	0,3832	Agregado	17,65

* Valores relativos à área total de 2,1716

6.4.3 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

A FIG. 6.37 mostra o espectro na região de UV-Vis da Insulina Humana (Sigma-Aldrich). Observa-se a presença de duas bandas intensas em 234 e 280 nm com sobreposição, relativas ao sinal da cadeia polipeptídica (180-230nm), aos anéis aromáticos (260-280 nm) e/ou ligação dissulfeto (~260nm).

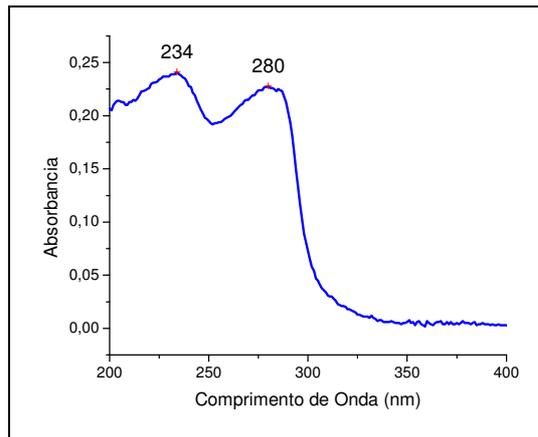


FIG. 6.37 - Espectro de UV-Vis da Insulina Humana da Sigma-Aldrich.

A FIG. 6.38 mostra o espectro obtido da amostra de HA+ Ins, verifica-se a permanência das bandas relativas à proteína em 238 e 279 nm. Observa-se uma forte queda no sinal da banda em 238 nm, o que sugere alterações na estrutura da cadeia polipeptídica.

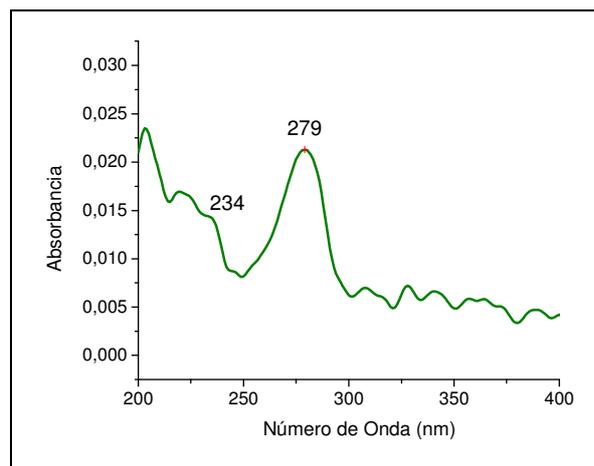


FIG. 6.38 - Espectro de UV-Vis da amostra de HA após adsorção de Ins a 37°C.

A FIG. 6.39 mostra o espectro obtido da amostra de ZnHA+ Ins, verifica-se a permanência das bandas relativas à proteína em 235 e 280 nm. Observa-se uma forte queda no sinal da banda em 238 nm, o que sugere alterações na estrutura da cadeia polipeptídica.

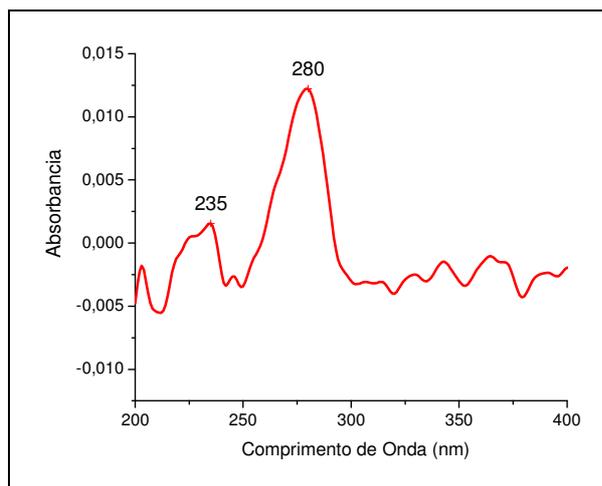


FIG. 6.39 - Espectro de UV-Vis da amostra de ZnHA após adsorção de Ins a 37°C.

Comparando-se os resultados obtidos pela análise de UV-Vis das amostras de HA + Ins e ZnHA + Ins, FIG. 6.38 e FIG. 6.39, observa-se que os mesmos apresentam perfis de espectro similares, que sugerem alterações na cadeia polipeptídica após a adsorção da insulina na superfície dos materiais estudados.

6.4.4 DICROÍSMO CIRCULAR NO ULTRAVIOLETA (DC)

A análise dos espectros de dicróismo avaliou a estrutura secundária da Ins antes e após a sua adsorção na HA e ZnHA. A FIG. 6.40 mostra o espectro de DC da solução de Ins 0,1mg/ml em tampão fosfato 0,01M. Observam-se picos mínimos em 208 e 223 nm e um pico máximo em 195 nm. A estimativa da estrutura secundária da Ins obtida pelo programa Dichroweb indica um alto teor de estrutura em alfa-hélice, 51%, TAB.18. Valores da literatura indicam um teor de 67% (HE et al, 2005) o que indica uma pequena variação provavelmente devido a erros experimentais ou pequena perda de estabilidade da conformação da proteína devido ao tempo de preparo da solução e a análise, TAB. 6.15.

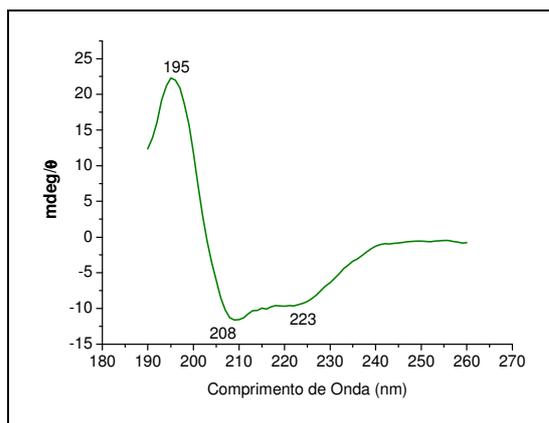


FIG. 6.40 – Espectro de DC da solução de Insulina Humana (Sigma-Aldrich) 0,1mg/mL em tampão fosfato pH7.4.

TAB. 6.15 Estimativa de Estrutura Secundária da Insulina Humana (Sigma-Aldrich) em solução de 0,1mg/mL em tampão fosfato à partir dos resultados e correlação pelo software Dichroweb.

Estrutura 2 ^{aria}	%
α -hélice	51
Folha- β	10
Alça- β	10
Randômica	30

A FIG. 6.41 mostra o espectro de DC da dispersão da amostra de HA+ Ins após experimento de adsorção em temperatura ambiente. Observa-se uma queda na intensidade do espectro, aumento de ruído e a presença de picos em 196, 220 e 230 nm. Essa queda de sinal ocorre provavelmente devido ao maior espalhamento da luz do feixe de UV-Vis devido à presença de partículas de HA e ao estado sólido da proteína, TAB. 6.16.

O trabalho de HU *et al* (2001) [103] estudou o espectro de DC de proteínas na forma de filmes finos recobertos sobre um suporte de vidro. Os resultados mostraram uma diminuição na intensidade de sinal quando o autor comparou os espectros de solução das proteínas e seus respectivos filmes. A estimativa da estrutura secundária segundo o software Dichroweb da amostra HA + Ins indicou uma queda na estrutura α -hélice e um gradual aumento da estrutura folha- β e alça- β .

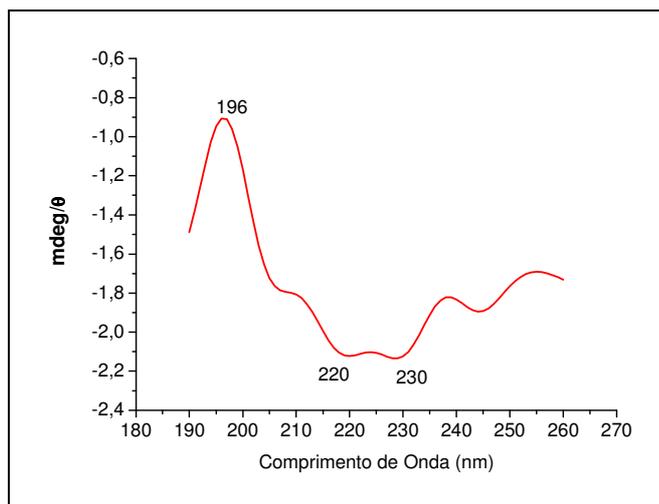


FIG. 6.41 - Espectro de DC da dispersão em água da amostra de HA + Ins.

TAB. 6.16 Estimativa de Estrutura Secundária da Ins adsorvida em HA.

Estrutura 2 ^{aria}	%
α -hélice	30
Folha- β	27
Alça- β	21
Randômica	24

A FIG. 6.42 mostra o espectro de DC da dispersão em água da amostra de ZnHA +Ins, verifica-se um resultado similar ao da HA após a adsorção da proteína. A estimativa de estrutura secundária mostra uma redução na estrutura α -hélice e aumento das estruturas folha- β e alça- β , TAB. 6.17.

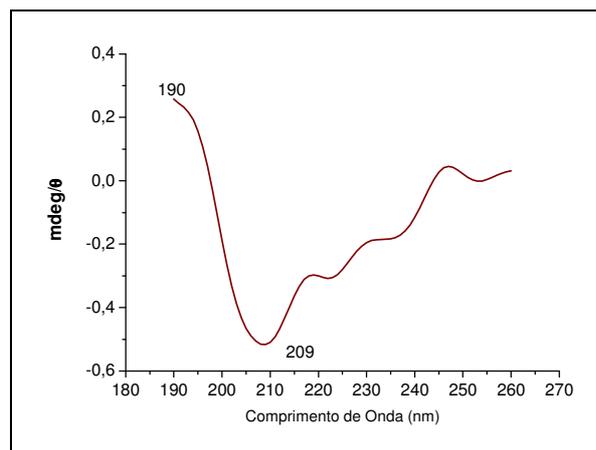


FIG. 6.42 - Espectro de DC da dispersão em água da amostra de ZNHA + Ins.

TAB. 6.17 Estimativa de Estrutura Secundária da Ins adsorvida em ZnHA.

Estrutura 2 ^{aria}	%
α -hélice	08
Folha- β	37
Alça- β	27
Randômica	27

O trabalho de GIACOMELLI e NORDE (2001) estudou o processo de adsorção e dessorção de BSA em partículas de sílica. Análises de DSC e DC indicaram uma maior termoestabilidade da proteína adsorvida, e redução do teor de estrutura alfa-hélice da BSA adsorvida no material. Além disso, os resultados mostraram que após a dessorção da BSA para o meio aquoso a estrutura nativa da proteína foi restabelecida, indicando de forma satisfatória o seu uso para funcionalização biológica do material.

O trabalho de PAUL & SHARMA (2012) estudou a liberação de insulina a partir de esferas de alginato e amostras de nanopartículas de HA e ZnHA, os resultados de DC após dessorção da insulina indicaram um teor de 35% de estrutura secundária em α -hélice em ambas as amostras. Comparado-se ao teor obtido na análise da estrutura da insulina na solução inicial (36%), confirma-se a reconstituição da sua estrutura nativa após a dessorção.

6.4.5 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

O resultado das análises quantitativas de insulina humana (Ins) por espectrometria no UV-Vis a 280 nm possibilitaram a plotagem de isotermas de adsorção, que permitiram a simulação de curvas a partir das equações de Langmuir e Langmuir-Freundlich. A FIG. 6.43 mostra a melhor simulação obtida para a adsorção de insulina na HA em tampão fosfato 0,01M, pH 7,4 a temperatura de 37°C seguindo o modelo de Langmuir-Freundlich. Observa-se uma tendência a valores superiores na capacidade de adsorção de proteína pelo material devido provavelmente a formação de multicamadas.

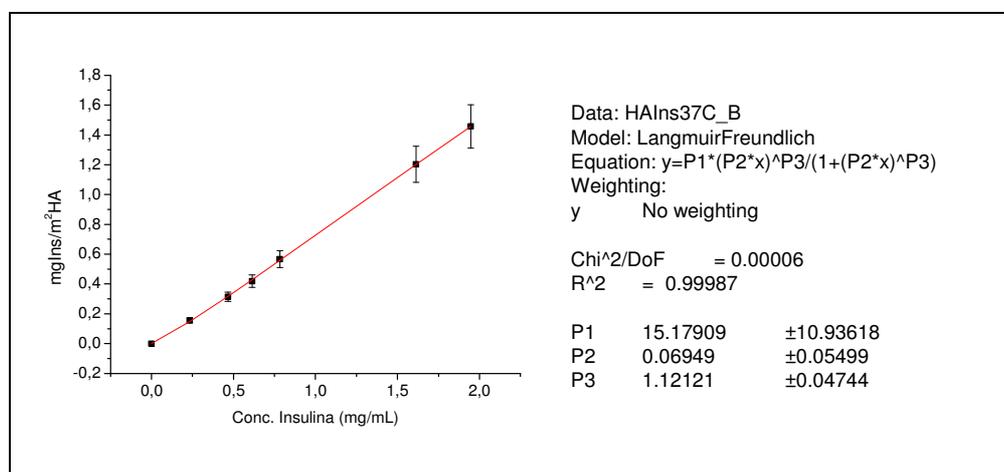


FIG. 6.43 - Simulação de curva seguindo o modelo Langmuir-Freundlich em experimento de adsorção de Insulina Humana em HA a 37°C.

A FIG. 6.44 apresenta a curva de isoterma obtida na adsorção de Ins pela amostra de ZnHA, verifica-se a existência de um patamar de saturação coerente com o modelo de isoterma de Langmuir que propõe a formação de uma monocamada durante o processo de adsorção.

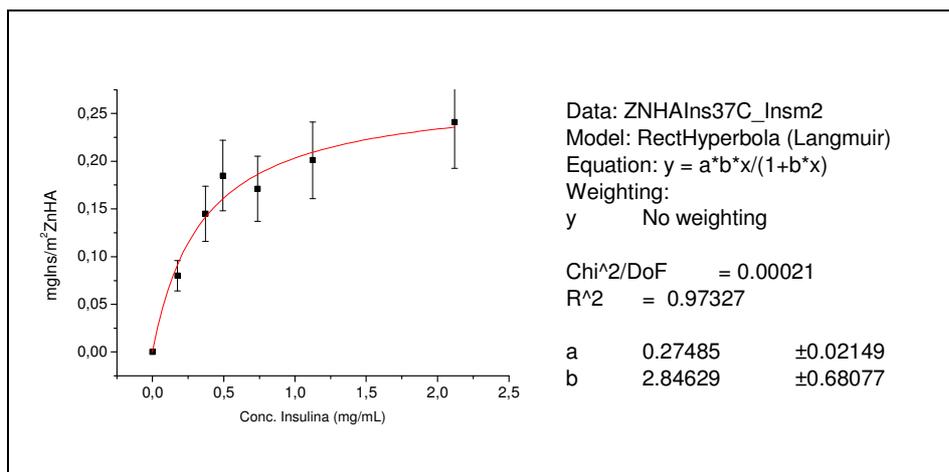


FIG. 6.44 - Simulação de curva seguindo o modelo Langmuir-Freundlich em experimento de adsorção de Insulina Humana em ZnHA a 37°C.

Comparando-se os resultados entre as amostras de HA+ Ins e ZnHA + Ins, FIG. 6.43 e FIG. 6.44, verificam-se valores inferiores na capacidade de adsorção de Ins pela amostra de ZnHA, o que confirmaria a formação de uma monocamada na adsorção de Ins na superfície da ZnHA.

Os resultados encontrados ao longo deste trabalho no estudo de adsorção de BSA, Mb e Ins em amostras de HA e ZnHA são mostrados na TAB 6.18. Todas as proteínas estudadas apresentavam estrutura secundária majoritariamente em α -hélice. Após o processo de adsorção verifica-se que a BSA não apresentou alterações significativas em sua estrutura secundária. Além disso, os resultados obtidos nas isotermas de adsorção sugerem que a ZnHA possui uma capacidade maior de adsorção de BSA do que a HA. A mioglobina e a insulina parecem apresentar alterações na estrutura secundária após o processo de adsorção para os materiais estudados. Os resultados obtidos nas isotermas de adsorção para a Mb e Ins sugerem uma capacidade maior de adsorção pela HA em comparação a ZnHA.

TAB. 6.18 Comparação de resultados de adsorção de BSA, Ins e Mb nas amostras de HA e ZnHA pelas técnicas de FTIR, UV-Vis e DC.

Amostra	Estrutura FTIR	Estrutura UV-Vis	Estrutura DC	Isoterma
BSA	50% α -hélice	Sobreposição Bandas	53% α -hélice	
HA + BSA	77% α -hélice \uparrow	\uparrow afastamento banda	62% α -hélice	a_m : 1,8mg/m ² ; K: 0,7; r: 1,5
ZnHA + BSA	77% α -hélice	\uparrow afastamento banda	58% α -hélice	a_m : 4mg/m ² ; K:0,2; r:1,2
Mb	70% α -hélice	Sobreposição Bandas	31% folha- β 14% α -hélice	
HA + Mb	34% alça- β 28% α -hélice	Ausência banda 220nm	52% α -hélice	a_m : 1,2mg/m ² ; K: 0,6; r: 1,0
ZnHA + Mb	65 % α -hélice	\uparrow banda 220nm	56% α -hélice	a_m : 0,9mg/m ² ; K: 0,7; r: 1,2
Ins	59 % α -hélice	Sobreposição bandas	51% α -hélice	
HA + Ins	83% folha- β	\uparrow afastamento banda	30% α -hélice 27% folha- β	a_m : 15mg/m ² ; K: 0,07; r: 1,1
ZnHA + Ins	32% α -hélice 22% folha- β	\uparrow afastamento banda	37% folha- β 9% α -hélice	a_m : 0,27mg/m ² ; K: 2,8; -

7. CONCLUSÕES

O trabalho apresentado estudou a adsorção de albumina de soro bovino (BSA), mioglobina de músculo equino (Mb) e insulina humana (Ins) em amostras de hidroxiapatita (HA) e zinco-hidroxiapatita (ZnHA) nanoestruturadas preparadas via úmida. A caracterização das amostras de HA e ZnHA confirmaram a obtenção de materiais nanoestruturados, com morfologia de partículas alongadas, na forma de agregados não-homogêneos. Comparando-se os resultados de caracterização das amostras de HA e ZnHA, percebe-se que uma pequena fração (2,3%) de substituição de íons cálcio por zinco na estrutura da HA, provocou a redução da dimensão dos cristais do material, a contração dos seus parâmetros de rede da célula unitária e um caráter neutro na carga de superfície. A amostra de HA apresentou um ponto isoelétrico de 6,6, valor este similar ao encontrado na literatura, enquanto que a ZnHA obteve um ponto isoelétrico de 7,1.

A adsorção de BSA nos materiais alterou os valores de PI das amostras de HA e ZnHA, se aproximando ao valor do PI da proteína, o que indica um recobrimento efetivo da superfície na concentração de 2mg/ml. A estrutura nativa da BSA foi mantida após a adsorção na superfície da HA e ZnHA devido a manutenção do alto teor de estrutura secundária α -hélice. O processo de adsorção da BSA ocorreu com formação de multicamadas na superfície dos materiais estudados.

A adsorção de Mb nos materiais alterou os valores de PI das amostras de HA e ZnHA, para valores inferiores aos respectivos materiais, assim como para valores inferiores ao PI da proteína, o que indica um recobrimento da Mb na superfície dos materiais com grande variação na exposição dos grupos de aminoácidos carregados na concentração de 2mg/ml. A estrutura da Mb foi alterada sendo observado um aumento na conformação α -hélice após a adsorção na superfície da HA e ZnHA. O processo de adsorção de Mb ocorreu com a formação de multicamadas na superfície da HA e ZnHA.

A adsorção de Ins nos materiais alterou os valores de PI das amostras de HA e ZnHA, se aproximando ao valor do PI da proteína, o que indica um recobrimento efetivo da superfície na concentração de 2mg/ml. A estrutura da Ins foi alterada após a adsorção na superfície da

HA e ZnHA, com redução na conformação α -hélice. O processo ocorreu de forma diferenciada para as amostras. Houve a formação de multicamadas de Ins para a amostra HA, e a formação de monocamada de Ins para a amostra ZnHA.

A capacidade de adsorção da BSA, Mb e Ins foi maior para a amostra de HA indicando que apesar da área específica da ZnHA ser superior a obtida pela HA, uma combinação de características de topografia e de heterogeneidade podem explicar esse resultado. Considerando-se a topografia, verifica-se que os poros da HA apresentam dimensões maiores que os presentes na ZnHA, e possuem dimensões compatíveis com as dimensões das moléculas de proteínas, possibilitando a adsorção física das proteínas em seu interior. Considerando-se a heterogeneidade, a presença do substituinte zinco na estrutura da ZnHA causou uma variação na carga de superfície indicando uma alteração na distribuição de íons e consequentemente sítios ativos envolvidos em processos de interação entre as proteínas e a superfície dos materiais por ligação fracas.

8. REFERÊNCIAS

- ADOCHITEI, A., DROCHIOIU, G., **Rapid Characterization of Peptide Secondary Structure by FTIR Spectroscopy**, Rev. Roum. Chim., 56(8), 783-791, 2011.
- ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., **Fundamentos de Biologia Celular**, Trad. Ana Leonor Chies Santiago-Santos, 2ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2006, 864p.
- ALMORA-BARRIOS, N., AUSTEN, K. F., DE LEEUW, N. H., **Density Functional Theory Study of the Binding of Glycine, Proline, and Hydroxyproline to the Hydroxyapatite (0001) and (0110) Surfaces**, Langmuir, 25(9), 5018–5025, 2009.
- ALMORA-BARRIOS, N., DE LEEUW, N. H., **Molecular Dynamics Simulation of the Early Stages of Nucleation of Hydroxyapatite at a Collagen Template**, Cryst. Growth Des., 12, 756–763, 2012.
- ADNADJEVIC, B., JOVANOVIĆ, J., **A comparative kinetics study of isothermal drug release from poly(acrylic acid) and poly(acrylic-co-methacrylic acid) hydrogels**, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 69, 31–42, 2009.
- AHUJA, S., JESPERSEN, N., **Modern Instrumental Analysis**, 1ª ed, 2006.
- ANDREESCU, S., NJAGI, J., ISPAS, C., **The New Frontiers of Organic and Composite Nanotechnology, Nanostructured materials for enzyme immobilization and biosensors – Cap 7**, Elsevier Ltd. Edited by: Victor Erokhin, Manoj Kumar Ram, Ozlem Yavuz, 2007, 504p.
- BELL, L. C., POSNER, A. M., QUIRK, J. P., **Surface charge characteristics of hydroxylapatite and fluorapatite**, Nature, 239, 515–7, 1972.
- BURT, J. L., WING, C. G., YOSHIDA, M. M., YACAMÁN, M. J., **Noble Metal Nanoparticles Directly Conjugated to Globular Proteins**, Langmuir, 20, 11778-11783, 2004.
- BYSTROV, V. S., PARAMONOVA, E., DEKHTYAR, Y., AKARLOV, A., POLYAKA, N., BYSTROVA, A V, PATMALNIEKS, A., L K HOLKIN, A, **Computational and experimental studies of size and shape related physical properties of hydroxyapatite nanoparticles**, J. Phys.: Condens Matter 23, 1-12, 2011.
- BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G., GOLIMOWSKI, J., URBAN, P. L., **Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management**, Waste Management, 29, 2587–2595, 2009.
- CANTOR, C.R., SCHIMMEL, P.R., **Biophysical Chemistry**, 2, 8, 1980.

- CARTER, D. C., HO, J. X. **Structure of Serum Albumin**, Adv. Protein Chem., 45, 153-203, 1994.
- CHOI, H.J., MIN, B.H., SHIN, J.H., BAE, D.H., **Strengthening in nanostructured 2024 aluminum alloy and its composites containing carbon nanotubes**, Composites: Part A, 42, 1438–1444, 2011.
- CHOI, J. H., MAY, B. C. H., WILLE, H., COHEN, F. E., **Molecular Modeling of the Misfolded Insulin Subunit and Amyloid Fibril**, Biophysical Journal, 97(12), 3187–3195, 2009.
- CORDEIRO, R., M., GRANJEIRO, J. M., **Química Computacional como subsídio ao desenvolvimento de material de referência e padrão metrológico de hidroxiapatita, Diretoria de Programas (DIPRO) – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)**, 2010.
- COSTA, A. M., MAVROPOULOS, E., MELLO, A., DOS SANTOS, E. A., DE OLIVEIRA, R. R., PRADO DA SILVA, M. H., ROSSI, A. M., **Spectroscopic Studies of Adsorbed Myoglobin on Hydroxyapatite Surface**, Key Engineering Materials, 493-494, 504-507, 2012.
- COSTA, A. M., SOARES, G. A., CALIXTO, R., ROSSI, A. M., **Preparation and Properties of Zinc Containing Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics**, Key Engineering Materials, 254-256, 119-122p., 2004.
- CULLITY, B. D., **Elements of X-Ray Diffraction**, Addison-Wesley Publishing Company Inc., 2nd Ed., 1978, 40-80.
- CURTIS, W., JOHNSON, Jr., **Secondary Structure of Proteins through Circular Dichroism Spectroscopy**, Ann Rev Biophys Biophys Chem, 17, 145-156, 1988.
- DZWOLAK, W., RAVINDRA, R., WINTER, R., Hydration and structure — **the two sides of the insulin aggregation process**, Phys. Chem. Chem. Phys., 2004, 6, 1938-1943.
- EDWARDS, S. A., **The Nanotech Pioneers.**, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, (2006) 15-17.
- ELLENBECKER, M.; TSAI, S.; **Engineered nanoparticles: safer substitutes for toxic materials, or a new hazard?** Journal of Cleaner Production, 19, 2011, 483-487.
- ELLIOT JC., **Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates**, Amsterdam: Elsevier Sci, 1994.
- EPPLE, M., GANESAN, K., HEUMANN, R., KLESING, J., KOVTUN, A., NEUMANN, S., SOKOLOVA, V., **Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine**, J. Mater Chem., 20, 18–23, 2010, 371p.

FIGURA DISPONÍVEL: <https://disciplinex.wordpress.com/tag/traducao/>

FIGURA DISPONÍVEL: <http://www.infoescola.com/bioquimica/ligacao-peptidica/>

FIGURA DISPONÍVEL: http://en.citizendium.org/wiki/Protein_structure.

FENOGLIO, I., FUBINI, B., GHIBAUDI, E. M., TURCI, F., **Multiple Aspects of the Interaction of Biomacromolecules with Inorganic Surfaces**, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 1186–1209, 2011.

FIGUEIREDO, KATIA CECILIA DE SOUZA, **Desenvolvimento de Membrana com Mioglobina para a Permeação Seletiva de Oxigênio**, Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.

FRANZEN, S., MOORE, L. J., WOODRUFF, W. H., BOXER S. G., **Stark-Effect Spectroscopy of the Heme Charge-Transfer Bands of Deoxymyoglobin**, *J. Phys. Chem. B*, 103, 3070, 1999.

GREER, J. R., JANG, D., GU, X. W., **Exploring Deformation Mechanisms in Nanostructured Materials**, *Journal of the Minerals, Metals and Materials Society*, 64(10), 2012, 1241-1252.

GOMES, I. I. F., **Interação de Proteínas com Superfícies Nanoestruturadas e Nanopartículas de metais nobres**, Tese Doutorado, Universidade de Nova de Lisboa, LISBOA, 2009.

GUIMARÃES, JULIANA AGUILAR, **Estudo de Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett Visando o Desenvolvimento de Biossensor de Colesterol**, Tese de D. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

GREENFIELD, N., FASMAN, G. D., **Biochemistry**, 8, 1969, 4108 – 4116.

GIACOMELLI, C. E., NORDE, W., **The Adsorption–Desorption Cycle, Reversibility of the BSA–Silica System**, *Journal of Colloid and Interface Science* 233, 234–240, 2001.

HEREDIA, A., COLIN-GARCIA, M., PEÑA-RICO, M. A., AGUIRRE BELTRÁN, L. F. L., GRÁCIO, J., CONTRERAS-TORRES, F. F., RODRÍGUEZ-GALVÁN, A., BUCIO, L., BASIUK, V. A., **Thermal, infrared spectroscopy and molecular modeling characterization of bone: An insight in the apatite-collagen type I interaction**, *Advances in Biological Chemistry*, 3, 215-223, 2013.

HAAS, K. L., FRANZ, K. J., **Application of Metal Coordination Chemistry To Explore and Manipulate Cell Biology**, *Chem. Rev.*, 109, 4921–4960, 2009.

HU, W., MA, J., WANG, J., ZHANG, S., **Fine structure study on low concentration zinc substituted hydroxyapatite nanoparticles**, *Materials Science and Engineering C* 32 2404–2410, 2012.

HAN, Y., WANG, X., LI, S., **A simple route to prepare stable hydroxyapatite nanoparticles suspension**, *J Nanopart Res*, 11, 1235–1240, 2009.

- HE, W., LI, Y., XUE, C., HU, Z., CHENA, X., SHENG, F., **Effect of Chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 1837–1845, 2005.
- HU, H. Y., LI, Q., CHENG, H. C., DU, H. N., **β -Sheet Structure Formation of Proteins in Solid State as Revealed by Circular Dichroism Spectroscopy**, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 62, 15–21, 2001.
- IAFISCO, M., PALAZZO, B., FALINI, G., DI FOGGIA, M., BONORA, S., NICOLIS, S., CASELLA, L., ROVERI, N., **Adsorption and Conformational Change of Myoglobin on Biomimetic Hydroxyapatite Nanocrystals Functionalized with Alendronate**, *Langmuir*, 24, 4924–4930, 2008.
- IAFISCO, M., SABATINO, P. LESCI, I. G, PRAT, M., RIMONDINI, L., ROVERI, N., **Conformational modifications of serum albumins adsorbed on different kinds of biomimetic hydroxyapatite nanocrystals**, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81, 274–284, 2010.
- INAIL, LIBRO BIANCO. **Esposizione a nanomateriali ingegnerizzati ed effetti sulla salute e sicurezza nei luoghi di lavoro** - Department of Occupational Medicine, formerly ISPESL Edizione 2010.
- JANSEN, R., DZWOLAK, W., WINTER, R., **Amyloidogenic Self-Assembly of Insulin Aggregates Probed by High Resolution Atomic Force Microscopy**, *Biophysical Journal*, 88(2), 1344–1353, 2005.
- JERKER PORATH, BIRGIT OLIN, **Immobilized metal affinity adsorption and immobilized metal affinity chromatography of biomaterial- Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions**, *Biochemistry*, 22 (7), 1621–1630, 1983.
- KEDE, L. F.M, MAVROPOULOS, E., DA ROCHA, N.C.C., COSTA, A. M., PRADO DA SILVA, M.H., MOREIRA, J. C., ROSSI, A. M., **Polymeric sponges coated with hydroxyapatite for metal immobilization**, *Surface and Coatings Technology*, 206 (11–12), 2810–2816, 2012.
- KARAJANAGI, S. S., VERTEGEL, A. A., KANE, R. S., DORDICK, J. S., **Structure and Function of Enzymes Adsorbed onto Single-Walled Carbon Nanotubes**, *Langmuir*, 20 (26), 11594–11599, 2004.
- KAIDEN, K., MATSUI, T., TANAKA, S., **A Study of the Amide III Band by FT-IR Spectrometry of the Secondary Structure of Albumin, Myoglobin, and γ -Globulin**, *Applied Spectroscopy*, 41(2), 180–184, 1987.
- KHANG, D., CARPENTER, J., CHUN, Y. W., PARETA, R., WEBSTER, T. J., **Nanotechnology for regenerative medicine**, *Biomed Microdevices*, 12, 575–587, 2010.
- KHALFAOUI, M., KNANI, S., HACHICHA, M.A., LAMINE, A. B., **New theoretical expressions for the five adsorption type isotherms classified by BET based on**

- statistical physics treatment**, Journal of Colloid and Interface Science, 263, 350–356, 2003.
- KADI, E.N., TAULIER, N., LE HUÉROU, J. Y., GINDRE, M., URBACH, W., Nwigwe, I., KAHN, P. C., WAKS, M., **Unfolding and Refolding of Bovine Serum Albumin at Acid pH: Ultrasound and Structural Studies**, Biophysical Journal, 91, 3397–3404, 2006.
- KHANG, D., CARPENTER, J., CHUN, Y. W., PARETA, R., WEBSTER, T. J., **Nanotechnology for regenerative medicine**, Biomed Microdevices, 12, 575–587, 2010.
- KANDORI, K., ODA, S., TSUYAMA, S., **Effects of Pyrophosphate Ions on Protein Adsorption onto Calcium Hydroxyapatite**, J. Phys. Chem. B, 112, 2542–2547, 2008.
- KANDORI, K., SAITO, M., SAITO, H., YASUKAWA, A., ISHIKAWA, T., **Adsorption of Protein on Nonstoichiometric Calcium Strontium Hydroxyapatite**, Colloids Surf A, 94, 225–228, 1995.
- KANDORI, K., SAITO, M., TAKEBE, T., YASUKAWA, A., ISHIKAWA, T., **Adsorption of Bovine Serum-Albumin on Synthetic Carbonate Calcium Hydroxyapatite**, J. Colloid Interface Sci., 174, 124–129, 1995.
- KANDORI, K., KURODA, T., TOGASHI, S., KATAYAMA, E., **Preparation of Calcium Hydroxyapatite Nanoparticles Using Microreactor and Their Characteristics of Protein Adsorption**, J. Phys. Chem. B, 115, 653–659, 2011.
- KIM, H.-M., HIMENO, T., KOKUBO, T., NAKAMURA, T., **Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid**, Biomaterials 26, 4366–4373, 2005.
- KOUTSOPOULOS, S., **Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods**, J Biomed Mater Res, 62, 600–612, 2002.
- KONG, J., YU, S., **Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures**, Acta Biochimica et Biophysica Sinica 39(8), 549–559, 2007.
- LOUA, Z., ZENGA, Q., CHUA, X., YANGA, F., HEA, D., YANGA, M., XIANGB, M., ZHANG, FAN, X.H., **First-principles study of the adsorption of lysine on hydroxyapatite (1 0 0) surface**, Applied Surface Science, 258, 4911–4916, 2012.
- LIU, W., JOHNSON, S., MICIC, M., ORBULESCU, J., WHYTE, J., GARCIA, A. R., LEBLANC, R. M., **Study of the Aggregation of Human Insulin Langmuir Monolayer**, Langmuir, 28, 3369–3377, 2012.
- LANDI, E., CELOTTI, G., LOGROSCINO, G., TAMPIERI, A., **Carbonated hydroxyapatite as bone substitute**, Journal of the European Ceramic Society, 23, 2931–2937, 2003.

- MAYO, M.J., SEIDENSTICKER, J.R., HAGUE, D.C., CARIM, A.H., **Surface Chemistry Effects on the Processing and Superplastic Properties of Nanocrystalline Oxide Ceramics**, NanoStructured Materials, 11(2), 271–282, 1999.
- NARAYAN, R. J., KUMTA, P. N., SFEIR, C., LEE, D.-H., OLTON, D., CHOI, D., **Nanostructured Ceramics in Medical Devices: Applications and Prospects**, JOM, 56 (10), 2004, 38-43.
- MASICA, D. L., ASH, J. T., NDAO, M., DROBNY, G. P., GRAY, J. J., **Toward a Structure Determination Method for Biomineral-Associated Protein Using Combined Solid- State NMR and Computational Structure Prediction**, Structure, 18, 2010, 1678–1687.
- MARET, W., LI, Y., **Coordination Dynamics of Zinc in Proteins**, Chem. Rev., 109, 4682 – 4707, 2009.
- NORDE, W., BUIJS, J., LYKLEMA, H., **Fundamentals of Interface and Colloid Science**, Adsorption of Globular Proteins, V, J. Lyklema (Editor), Elsevier Ltd., 2005.
- NAKANISHI, K., SAKIYAMA, IMAMURA, T. K., **On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon**, Journal of Bioscience and Bioengineering, 91,3, 233-244, 2001.
- MAVROPOULOS, E., COSTA, A. M, COSTA, L. T., ACHETE, C. A., MELLO, A., GRANJEIRO, J. M. ROSSI, A. M., **Adsorption and bioactivity studies of albumin onto hydroxyapatite surface**, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 83, 2011, 1–9.
- MARTINE T. REYMOND, GENE MERUTKA, H. JANE DYSON, PETER E. WRIGHT, **Folding propensities of peptide fragments of myoglobin**, Protein Science, Cambridge University Press, 1997, 6:706-716.
- NIELSEN, L., KHURANA, R., COATS, A., FROKJAER, S., BRANGE, J., VYAS, S., UVERSKY, V. N., FINK, A. L., **Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism**, Biochemistry, 40, 6036-6046, 2001.
- MORENO, J. A., HALLIDAY, M., MOLLOY, C., RADFORD, H., VERITY, N., AXTEN, J. M., ORTORI, C. A., WILLIS, A. E., FISCHER, P. M., BARRETT, D. A., MALLUCCI, G. R., **Oral Treatment Targeting the Unfolded Protein Response Prevents Neurodegeneration and Clinical Disease in Prion-Infected Mice**, Sci Transl Med, 5:(206), 2013.
- MAVROPOULOS, E., HAUSEN M., COSTA A. M., ALVES, G., MELLO, A., OSPINA, C. A., MIR, M, GRANJEIRO, J. M., ROSSI, A. M., **The impact of the RGD peptide on osteoblast adhesion and spreading on zinc-substituted hydroxyapatite surface**, J Mater Sci Mater Med., 24(5), 1271-83, 2013.
- NITZKE, J. A., Departamento de Tecnologia Tecnologia de Alimentos, disponível: <http://www8.ufrgs.br/alimentus/ita02014/hm/nanotecnologia.html>.

- PEREPEZKO J. H., HEBERT, R. J., **Amorphous Aluminum Alloys—Synthesis and Stability**, *Journal of the Minerals, Metals and Materials Society*, 54, 3, 34-39, 2002.
- PAUL, W., SHARMA, C. P., **Synthesis and characterization of alginate coated zinc calcium phosphate nanoparticles for intestinal delivery of insulin**, *Process Biochemistry*, 47, 882–886, 2012.
- PETERS, T. JR., **Serum Albumin**, *Adv. Protein Chem.*, 37, 1985, 161-245.
- QUINTAS, A., FREIRE, A. P., HALPERN, M. J., **Bioquímica, Organização Molecular da Vida**, Lidel - Edições Técnicas, Lisboa, Portugal, 2008.
- RIBEIRO JÚNIOR, E. A., **Estudo do Envolvimento das Hélices N- E C-Terminais na Estabilidade e na via de Enovelamento da Mioglobina**, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2004.
- ROACH, P., FARRAR, D., PERRY, C. C., **Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes**, *J. AM. CHEM. SOC.*, 127, 8168-8173, 2005.
- RABE, M., VERDES, D., SEEGER, S., **Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces**, *Advances in Colloid and Interface Science*, 162, 87–106, 2011.
- SOKOLOVA, V., RADTKE, I., HEUMANN, R., EPPLE, M., **Effective transfection of cells with multi shell calcium phosphate-DNA nanoparticles**, *Biomaterials*, 27, 3147–3153, 2006.
- PRAUS, P., TURICOVÁ, M., **A Physico-Chemical Study of the Cationic Surfactants Adsorption on Montmorillonite**, *J. Braz. Chem. Soc.*, 18(2), 378-383, 2007.
- SHARMA, S., AGARWAL, G. P., **Interactions of Proteins with Immobilized Metal Ions: A Comparative Analysis Using Various Isotherm Models**, *Analytical Biochemistry* 288, 126–140, 2001.
- SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D., VEIGA, F., **Administração oral de peptídios e proteínas: III. Aplicação à insulina**, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 39, 1, 21-40, 2003.
- SEFTON, M. V., ANTONACCI, G. M., **Adsorption Isotherm of Insulin onto Various Materials**, *Diabetes*, 33, 674-680, 1984.
- RABE, M., VERDES, D., SEEGER, S., **Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces**, *Advances in Colloid and Interface Science*, 162, 87–106, 2011.
- SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A., **Principios de Analisis Instrumental**, 5ª ed, Mc Graw Hill, 2001, 322-381.
- RIETVELD, H. M., **A profile refinement method for nuclear and magnetic structures**, *J. Appl. Cryst.*, 2, 65-71, 1969.

- SWAIN, S.K., DOROZHUKIN, S.V., SARK, D., **Synthesis and dispersion of hydroxyapatite nanopowders**, *Materials Science and Engineering: C*, 32 (5), 1237–1240, 2012.
- REN, F, XIN, R., GE, X., LENG, Y., **Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites**, *Acta Biomater*, 5(8), 3141–9, 2009.
- SOMASUNDARAN, P., MARKOVIC, B., **Interfacial properties of calcium phosphate**. In: Amjad Z, *Calcium phosphate in biological and industrial system*. Switzerland: Tran Tech Pub, p. 85–101, 1998.
- REZWAN, A. STUART, R., VOROS, J., GAUCKLER, L. J., **Change of ξ Potential of Biocompatible Colloidal Oxide Particles upon Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme.**, *J. Phys. Chem. B*, 109, 14469-14474, 2005.
- SREERAMA, N., MANNING, M. C., POWERS, M. E., ZHANG, J.-X., GOLDENBERG, D. P., WOODY, R. W., **Tyrosine, Phenylalanine, and Disulfide Contributions to the Circular Dichroism of Proteins: Circular Dichroism Spectra of Wild-Type and Mutant Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor**, *Biochemistry*, 38, 10814-10822, 1999.
- SHI, H.T., GONG, T., LIU, S. W., ZHANG, S.C., **Adsorption and Desorption of Insulin on Porous Hydroxyapatite Microspheres**, *Journal of Ceramic Society of Japan*, 113, 9, 579-583, 2005.
- SKANDAN, G., KEAR, B. H., **Synthesis and Processing of nanstructured oxide ceramics: applications for superplasticity**, *Materials Science Forum*, 243-245, 217-226, 1997.
- TAWFI, S., DE VOLDER, M., D. COPIC, PARK, S. J., OLIVER, C. R., POLSEN, E. S., ROBERTS, M. J., HART, A. J., **Engineering of Micro- and Nanostructured Surfaces with Anisotropic Geometries and Properties**, *Adv. Mater.*, 24, , 1628–1674, 2012.
- TIWARI, J.N., TIWARI R.N., KIM K.S., **Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices**, *Progress in Materials Science*, 57, 724-803, 2012.
- TABAKOVIĆ, A., KESTER, M., ADAIR, J. H., **Calcium phosphate-based composite nanoparticles in bioimaging and therapeutic delivery applications**, *Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 4 (1), 96–112, 2012.
- THOMPSON, P., COX, D., HASTINGS, J. B., **Rietveld Refinement of Debye-Scherrer Synchrotron X-ray data from Al_2O_3** , *J Appl Crystallogr.*, 20, 79–83, 1987.
- VENKATASUBBU, G. D., RAMASAMY, S., RAMAKRISHNAN, V., AVADHANI, G.S., THANGAVEL, R., KUMAR, J., **Investigations on Zinc Doped Nanocrystalline Hydroxyapatite**, *International Journal of NanoScience and Nanotechnology*, 2(1), 1-23, 2011.
- VAN DE WEERT, M., HARIS, P. I., HENNINK, W. E., CROMMELIN, D. J. A., **Fourier Transform Infrared Spectrometric Analysis of Protein Conformation: Effect of Sampling Method and Stress Factors**, *Analytical Biochemistry* 297, 160–169, 2001.

- VEDANTHAM, G., SPARKS, H. G., SANE, S. U., TZANNIS, S., PRZYBYCIEN, T. M., A **Holistic Approach for Protein Secondary Structure Estimation from Infrared Spectra in H₂O Solutions**, *Analytical Biochemistry*, 285, 33-49, 2000.
- WANG, K., ZHOU, C., HONG, Y., ZHANG, X., **A review of protein adsorption on Bioceramics**, *Interface Focus*, 1-19, 2012.
- WASSELL, D.T.H., HALL, R.C., EMBERY, G., **Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite**, *Biomaterials* 16, 697–702, 1995.
- WILLIAMS, Q., **Infrared, Raman and Optical Spectroscopy of Earth Materials**, *Mineral Physics and Crystallography*, ed. American Geophysical Union, 29-302, 1995.
- WILLIAMS, D. B., CARTER, C. B., **Transmission Electron Microscopy- A Textbook for Materials Science**, 2nd Ed, Springer, 2009, 779p.
- ZHANG, X. G., TENG, D. Y., WU, Z. M., WANG, X., WANG, Z., YU, D. M., LI, C. X., **PEG-grafted chitosan nanoparticles as an injectable carrier for sustained protein release**, *J Mater Sci: Mater Med* 19, 3525–3533, 2008.
- ZHANG, N., LI, J., JIANG, W., REN, C., LI, J., XIN, J., LI, K, **Effective protection and controlled release of insulin by cationic- cyclodextrin polymers from alginate/chitosan nanoparticles**, *International Journal of Pharmaceutics*, 393, 212–218, 2010.
- ZHU, X.D., ZHANG, H.J., FAN, H.S., LI, W., ZHANG, X.D., **Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption**, *Acta Biomaterialia*, 6, 1536–1541, 2010.
- ZETASIZER NANO SERIES, **USER MANUAL**, Malvern Instruments Ltd, 2004.