

ESTUDO DA ADSORÇÃO DA PROTEÍNA BSA EM HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES NANOESTRUTURADO

S. O. Santos¹, P. A. S. Tavares¹, K. A. B. Nogueira¹, J. E. Aguiar¹ e I. J. Silva Jr.¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: ivanildo@gpsa.ufc.br

RESUMO – Este trabalho teve por objetivo sintetizar nanoestruturas de HDL e avaliar a adsorção da proteína BSA. O HDL foi sintetizado através do método de co-precipitação a pH variável. Logo depois o material foi analisado e caracterizado. Foram feitos estudos em batelada, utilizando tanques agitados para avaliar o efeito do pH, da cinética e as isotermas de adsorção. De acordo com os resultados, a adsorção de BSA ocorreu preferencialmente no pH 4,8 em HDL Mg/Al e em pH 6,7 em HDL Zn/Al. Os modelos de Langmuir e Langmuir – Freundlich se ajustaram bem aos dados experimentais, obtendo parâmetros de equilíbrio. As quantidades máximas adsorvidas foram em torno de 180 mg/mL em HDL Zn/Al e 139 mg/mL em HDL Mg/Al.

1. INTRODUÇÃO

Um campo de pesquisa que vem apresentando um aumento considerável nos últimos anos é o de desenvolvimento de materiais híbridos, devido principalmente ao fato de combinar o conhecimento já tradicional com novas abordagens e tecnologias modernas (Silva, et al., 2015). Os Hidróxidos duplos lamelares (HDL), por conter um grande potencial de aplicação em processos de separação (Zhang *et al.*, 2013), catálise (Wang *et al.*, 2012), ciências biomédicas (Cao *et al.*, 2011), dentre outras aplicações, têm sido foco de muitos estudos nas últimas décadas, por conta da ampla versatilidade de modificação e capacidade de variação de cations, os HDLs podem gerar compostos com novas propriedades térmicas, texturais e estruturais, os tornando ainda mais promissores.

Em razão da grande aplicabilidade desse material, bem como a escassez de publicações sobre o uso do HDL para adsorção de proteínas, esse trabalho tem por objetivo sintetizar e caracterizar nanoestruturas de HDL Zn/Al e Mg/Al, além de realizar estudos do pH, cinética e isoterma de adsorção com a proteína BSA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Albumina do Soro Bovino (BSA) foi obtida da Sigma-Aldrich (EUA). Os demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico e para a preparação de todas as soluções utilizou-se água destilada.

A preparação dos HDLs foi feita através do método de co-precipitação (Aguiar *et al.*, 2013) a pH variável, seguido por tratamento hidrotérmico a 80°C.

Para a síntese de HDL Mg/Al, foram misturadas as soluções de magnésio [0,0996 mol de $(\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$] e de alumínio [0,0332 mol de $(\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O})$] em 100 ml de água destilada mantendo a razão molar dos cátions de 3:1. Em seguida, essa solução foi adicionada gota a gota a uma solução do ânion [0,249 mol de (NaHCO_3)] a ser intercalado e mantida a 60 °C sob agitação vigorosa. Para a síntese de HDL Zn/Al, foram misturadas as soluções de zinco [0,0614 mol de ZnCl_2] e de alumínio [0,0307 mol de $(\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O})$] em 100 ml de água destilada mantendo a razão molar dos cátions de 2:1. Em seguida, essa solução foi adicionada gota a gota a uma solução do ânion [0,153 mol de (NaHCO_3)] a ser intercalado e mantida a 60 °C sob agitação vigorosa.

Para se obter as nanoestruturas de Hidróxido Duplo Lamelar, foi utilizado o método convencional e modificado de co-precipitação segundo (Wang et al., 2013).

Pelo ponto de carga zero do $[\text{ZnAl}_2(\text{OH})_{16}]\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ser no pH 6,0, foi utilizado um pH mais elevado intencionalmente (de 12), a fim de tornar a superfície das nanoestruturas de HDL carregadas negativamente. O pH da solução de precipitação foi mantida constante a 12 pela adição de NaOH solução (3,4 M) gota a gota mantendo as condições básicas para aumento da taxa de formação do HDL e o desenvolvimento de todas as direções das nanoestruturas esférica, devido à força de repulsão entre as partículas carregadas positivamente do HDL primário e os ânions $\text{Al}(\text{OH})_4^-$, CO_3^{2-} , OH^- , fazendo com que o crescimento fosse inibido, o que conduziu à formação de partículas em escala nanométrica. Todos os outros parâmetros de síntese foram mantidos inalterados conforme o método de obtenção do precursor.

2.1. Caracterização Estrutural

Medições de adsorção-dessorção de N_2 (99,999%) a 77 K foram realizadas utilizando um equipamento de volumetria (Autosorb-1MP, Quantachrome Instruments). As amostras foram previamente degaseificadas a uma temperatura de 150 °C durante 12 h e 0,5 Pa. A área de superfície específica (S_{BET}) das amostras foi estimada a partir do método de Brunauer Emmet e Teller-BET (Gregg, 1982), usando os dados de adsorção na gama de pressões relativa de 0,05-0,12, 0,05-0,18 e 0,05-0,23 para as amostras de HDL Zn/Al e Mg/Al, respectivamente. O volume total de poros (V_{TP}) foi obtido pela regra de Gurvich a uma pressão relativa de 0,985. O método α -plot (Gregg, 1982) foi usado para calcular volumes de microporos ($V_{\mu\text{P}}$). O volume de mesoporos (V_{MP}) foi obtido a partir da diferença entre V_{TP} e a soma de $V_{\mu\text{P}}$ e V_{MP} . O método VBS para determinação da distribuição do tamanho de poro foi proposto por (Villarroel-Rocha *et al.*, 2014) para amostras com geometrias de poros cilíndricos e esféricos. Este método, baseado no algoritmo de BJH, considera mecanismos adequados de condensação capilar e evaporação (para poros cilíndricos e esféricos) nos mesoporos, por meio da equação de Kelvin. O método VBS modifica essa equação com a adição de um termo de correção (f_c) para se obter o raio do poro.

2.2. Estudos de Adsorção

2.4.1. Efeito do pH e cinética de adsorção: Os ensaios de adsorção foram realizados em sistema de batelada em um sistema de agitação orbital (TECNAL, modelo TE-165) a 16 rpm e temperatura de 22°C, todos realizados em duplicata. Para verificar a influência do pH, 20

mg de adsorvente foi posto em contato com 3 mL de solução de BSA (1,0 mg/mL) nos seguintes tampões: pH de 4,0 – 4,8 tampão acetato, 6,0 – 6,7 tampão MÊS, 7,8 – 10,0 tampão TRIS e 10,7 tampão bicarbonato de sódio, todos na concentração de 50mM. O sistema ficou em agitação constante durante um período de 2 horas. Para os ensaios de cinética de adsorção, utilizou-se a concentração de 1,0 mg/mL de BSA em pH já fixo, e foi variado o tempo de contato de 1 a 360 minutos. Após este período, todas as amostras foram recolhidas e centrifugadas em microcentrífuga (CT-15000R CIENTEC) durante 10 min com rotação de 10000 rpm, e as absorbâncias das amostras foram medidas a 280 nm (Espectrofotômetro de UV-Vis Biomate 3, Thermo Scientific, EUA).

A quantidade de proteína adsorvida (mg/g) foi calculada através de um balanço de massa, descrito pela equação a seguir:

$$q = \frac{V_{\text{SOL}} (C_0 - C_{\text{EQ}})}{m_{\text{ads}}} \quad (1)$$

onde C_{EQ} é a concentração de proteína na fase líquida (mg/mL) em equilíbrio, C_0 é a concentração inicial de proteína na fase líquida (mg/mL), m_{ads} é a massa de HDL (g) e V_{SOL} é o volume da solução (mL) para o contato com o HDL.

2.4.2. Isotermas de adsorção: A faixa de concentrações da proteína variou de 0,5 a 6,0 mg/mL. Foram utilizados os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, descritos pelas equações abaixo (2) e (3), respectivamente. Para modelagem dos dados experimentais, foi utilizado o software Origin, Microcal, EUA.

$$q = \frac{q_m C_{\text{eq}}}{K_D + C_{\text{eq}}} \quad (2)$$

$$q = \frac{q_m (K_{\text{LF}} C_{\text{eq}})^n}{1 + (K_{\text{LF}} C_{\text{eq}})^n} \quad (3)$$

Em que q_m (mg/mL) é a capacidade de adsorção máxima, K (mL/mg) é definida como a constante de Langmuir, C_{eq} representa a concentração de proteína na solução em equilíbrio, K_{LF} e n são as constantes de adsorção de Langmuir-Freundlich, onde são indicadores de intensidade e da capacidade de adsorção de ligação, respectivamente.

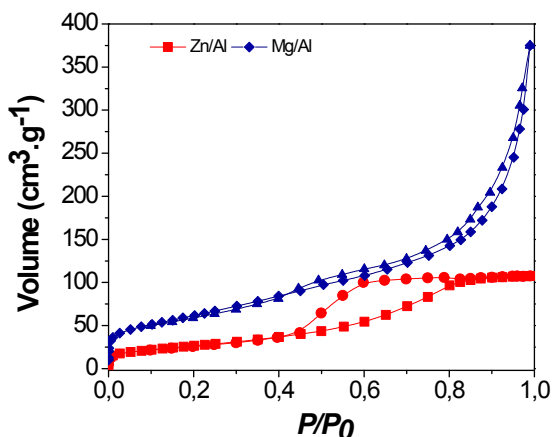
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Caracterização Estrutural

A Figura 1 ilustra as isotermas experimentais de adsorção-dessorção de N_2 a 77 K para os materiais em estudo. Os dois tipos de materiais, HDL Mg/Al e Zn/Al apresentam isotermas Tipo IV de acordo com a classificação da IUPAC (Rouquerol et al., 1999), que são típicos de materiais mesoporos. As isotermas dos materiais mostram um ponto de inflexão híbrido de histerese dos tipos H1 e H3 (Rouquerol et al., 1999). No entanto, a histerese da amostra do

HDL Zn/Al evidencia com maior clareza tipo histerese H3 característica de isotermas reversíveis a pressões de até de 0,45 P/P₀.

Figura 1 – Isotermas experimentais de adsorção.



A Tabela 1 resume as características texturais dos materiais a base de Mg e Zn, respectivamente.

Tabela 1 - Caracterizações texturais dos materiais.

Amostra	S _{BET} /m²/g	V _{MP} /cm³/g	V _{TP} /cm³/g	V _{MP} /cm³/g	D _p (nm)
HDL Zn/Al	100	0	0,17	0,17	6,8
HDL Mg/Al	230	0	0,56	0,56	9,7

As amostras mostraram uma predominância de mesoporosos obtidos pelo método VBS para todas as amostras em estudo com incidência de mesoporos cilíndricos e esféricos, característicos de materiais na base de sílica (Villarroel-Rocha et al., 2014).

3.2. Estudos de Adsorção

As curvas cinética e as isotermas de adsorção de BSA nos HDL Mg/Al e Zn/Al nanoestruturado estão representadas na Figura 2(a) e 2(b), respectivamente.

Os perfis cinéticos dos materiais (Figura 2(a)) mostram que ambos possuem um declínio rápido, porém, o Mg/Al atingiu o tempo de equilíbrio mais rapidamente, por volta de 180 min. Já para o Zn/Al, o tempo de equilíbrio foi atingido por volta dos 300 min, e adsorvendo uma maior quantidade de BSA.

Observa-se que as quantidades adsorvidas aumentam à medida que se aumenta a concentração da proteína, atingindo o equilíbrio rapidamente, próximo à concentração de 2,0 mg/mL, em ambos os materiais. Percebe-se que a quantidade máxima adsorvida por Zn/Al foi em torno de 180 mg/mL e em Mg/Al foi cerca de 139 mg/mL. Isso pode ser explicado pelo fato da síntese do HDL Mg/Al, onde a proporção dos cátions é de 3:1, diferente do Zn/Al que é de 2:1. Por conter razão molar de 3:1, o HDL Mg/Al libera íons hidróxidos no meio, deixando a solução mais básica, e dificultando a adsorção. Portanto, as nanoestruturas de

HDL Zn/Al foram mais efetivas que as de Mg/Al. Os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich se ajustaram bem aos dados de isoterma, proporcionando os parâmetros mostrados na Tabela 2.

Figura 2. Cinética (a) e isotermas (b) de adsorção de BSA em HDL Zn/Al e Mg/Al. Modelos de Langmuir (—) e Langmuir-Freundlich (—) para ajuste de dados.

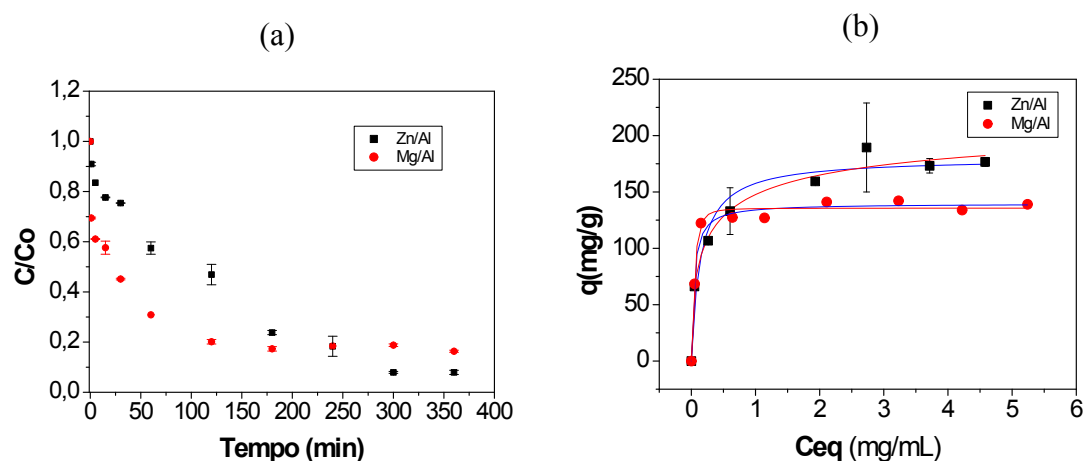


Tabela 2. Parâmetros de ajuste do modelo de Langmuir e Langmuir-Freundlich.

Parâmetros	HDL (Mg/Al)		HDL (Zn/Al)	
	L	L.F	L	L.F
q_{max} (mg/g)	139.63	135.65	180.08	227.32
K (mol/L)	23.92	0.0036	7.00	0.54
χ^2	51.23	35.22	178.65	80.20
R^2	0.98	0.99	0.96	0.99
b	-	1.87	-	0.51

Deve-se considerar ainda, que os mecanismos de adsorção de superfície devem-se às interações eletrostáticas entre elétrons deslocados em planos superficiais do HDL e elétrons livres das moléculas das proteínas. No caso das proteínas, deve-se levar em consideração o ponto isoelétrico (pI), onde há um balanceamento igual das cargas da proteína, promovendo uma maior adsorção. Para tanto, a investigação da adsorção das nanoestruturas de HDL em diferentes condições de pH foi feita em diferentes soluções tampão, variando os valores de pH. Os resultados obtidos variaram de um material para o outro. Para nanoestruturas de HDL Mg/Al, o melhor valor de pH obtido foi 4,8, justo no pI da proteína. Já para nanoestruturas de HDL Zn/Al, o melhor valor de pH obtido foi 6,7, acima do pI da BSA. A força eletrostática aumenta a quantidade de proteína na superfície de HDL, provavelmente devido a uma interação mais forte entre a carga negativa da BSA e a carga positiva de HDL. Portanto, Zn é mais eletropositivo que o Mg e, dessa forma, mais reativo.

4. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, percebeu-se que as quantidades adsorvidas da proteína do soro bovino BSA se mostrou mais elevada em nanoestruturas de HDL Zn/Al. Os modelos de Langmuir e Langmuir-Frendlich se ajustaram bem aos dados proporcionando quantidade máxima adsorvida em torno de 180 mg/mL para nanoestruturas de HDL Zn/Al e 139 mg/mL para Mg/Al. Isso pode ser explicado através da síntese dos dois materiais, que ocorre em razões molares diferentes. Portanto, as nanoestruturas de HDL Zn/Al se mostraram mais efetivas na adsorção de BSA. Mais estudos devem ser feitos, a fim de comprovar a eficácia do material.

5. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. E.; BEZERRA, B. T. C.; BRAGA, B. M.; LIMA, P. D. S.; NOGUEIRA, R. E. F. Q.; LUCENA, S. M. P.; SILVA JR., I. J. *Adsorption of Anionic and Cationic Dyes from Aqueous Solution on Non-Calcined Mg-Al Layered Double Hydroxide: Experimental and Theoretical Study*, **Separ Sci. Technol.** v. 48, p. 2307-2316, 2013.
- CAO, F. et al. *Zn-Al-NO₃-layered double hydroxides with intercalated diclofenac for ocular delivery*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 250-256, 2011.
- GREGG, S. J. A. S., K.S.W. *Adsorption, surface area and porosity*. second ed. New York: Academic Press, 1982. 303.
- ROUQUEROL, J.; ROUQUEROL, F.; SING, K. S. W. *Adsorption by powders & porous solids*. San Diego: 1999. 467.
- S.R.P. SILVA, M.J. BELIATIS, K.D.G.I. JAYAWARDENA, C.A. MILLS, R. RHODES, L.J. ROZANSKI. *Hybrid and nanocomposite materials for flexible organic electronics applications*. **Handbook of Flexible Organic Electronics, 2015, Pages 57-84**
- VILLARROEL-ROCHA, J.; BARRERA, D.; SAPAG, K. *Introducing a self-consistent test and the corresponding modification in the Barrett, Joyner and Halenda method for pore-size determination*. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 200, n. 0, p. 68-78, 2014.
- WANG, Q.; OHARE, D. *Recent advances in the synthesis and application of layered double hydroxide (LDH) nanosheets*. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 7, p. 4124-4155, 2012.
- WANG, K.-Y. et al. *Layered indium chalcogenidoantimonates [Me₂NH₂]₂In₂Sb₂S_{7-x}Sex (x = 0, 2.20, 4.20, 7) with tunable band gaps and photocatalytic properties*. **CrystEngComm**, v. 14, n. 1, p. 90-94, 2012.
- ZHANG, T. et al. *Biomimetic fabrication of hierarchically structured LDHs/ZnO composites for the separation of bovine serum albumin*. **Chemical Engineering Journal**, v. 219, n. 0, p. 278-285, 2013.