



EFEITO DA MICROESTRUTURA DO BIOVIDRO 58S NA ADSORÇÃO DE ALBUMINA

Oliveira, J. F. R.^a; Ferreira, D.W.F.S.^b; Sarmiento, V.H.V.^b; Santos, E. A.^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (P²CEM).

49107-230. São Cristóvão, SE, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), 49107-230. São Cristóvão, SE, Brasil.

*e-mail: jfroliveira@academico.ufs.br

RESUMO

Dois vidros bioativos (58S-A e 58S-B) foram sintetizados pelo método sol-gel com diferentes momentos de adição de nitrato de cálcio em relação aos alcóxidos. A caracterização dos vidros incluiu análises de área de superfície, raio e volume de poros via sorção/dessorção de nitrogênio com áreas de superfície de 28,03 m²/g para 58S-A e 49,15 m²/g para 58S-B, com volumes de poros de 0,18 e 0,23 cm³/g, respectivamente. Os testes de adsorção foram realizados pela imersão dos vidros em solução de albumina sérica bovina (BSA) 1000 µg/L e a capacidade de adsorção resultou em 32,2 µg/g para 58S-A e 34,4 µg/g para 58S-B. O vidro com maior área de superfície (58S-B) adsorveu mais proteínas, entretanto, a quantidade adsorvida por área foi menor devido ao tamanho dos poros em relação à albumina. A microestrutura influenciou a adsorção, ressaltando a importância de estudar rotas de síntese que levam a formação de microestruturas distintas.

PALAVRAS-CHAVE: albumina, adsorção, vidro bioativo, microestrutura.

1. INTRODUÇÃO

A adsorção de proteínas em vidros bioativos, ao criar uma camada prévia que interage com as células, é crucial para o aumento da resposta biológica do biomaterial. Essa adsorção pode ser diretamente afetada pela microestrutura e composição da superfície do vidro bioativo [1]. Os vidros bioativos fazem parte da classe das biocerâmicas mais usadas em reparos ósseos. Isso ocorre devido a sua capacidade de indução da formação de hidroxiapatita quando implantados no corpo humano [2]. A formação de hidroxiapatita é um dos fatores mais importantes na definição de biocompatibilidade de um material para reparo ósseo, assim como a sua capacidade de adsorção de proteínas [3].

No corpo humano, a albumina é uma das primeiras proteínas a adsorverem na superfície de biomateriais devido ao seu tamanho reduzido (4 nm) [4]. Essa adsorção prévia tende a definir, muitas vezes, o comportamento biológico posterior a adesão, proliferação e diferenciação celular sobre esses biomateriais [5,6].

Xue *et al.* [7] relacionam o aumento da adsorção de albumina com o aumento da área de superfície dos vidros bioativos. A alteração na topografia da superfície, incluindo a nanoporosidade, provoca mudanças na área de superfície específica, densidade de carga e reatividade, influenciando de maneiras distintas a estrutura das proteínas adsorvidas em vidro bioativo e outros biomateriais.

Thamma *et al.* [1] sintetizaram vidros nanoporosos com composição de 30% em mol de CaO e 70 % em mol SiO₂ que apresentaram quatro microestruturas diferentes de camada hidroxiapatita/hidroxiapatita carbonatada (HA/CHA) com diferentes tamanhos de nanoporos (6, 15, 31 e 34 nm), mas com área de superfície específica semelhante, no entanto, autores não conseguiram correlacionar estatisticamente a porosidade com a quantidade adsorvida.

Maciulis *et al.* [8] indicam que poros de 39 ± 5 nm são capazes de reter 400 vezes mais albumina no seu interior do que no sobrenadante e que, para esse tamanho de poros, o processo de lavar a superfície do material é capaz de lixiviar 75% da proteína. Jansson & Tengvall [9] testaram a adsorção da albumina em titânio liso e poroso (200 a 300 nm) e indicaram que a adsorção na superfície porosa apresentou um aumento de 2 a 11 vezes em relação a superfície lisa.

Kondo *et al.* [10] indicam que existe uma dificuldade em adsorver albumina em pequenos poros (até 30 nm), pois a redução da porosidade do material tende a reduzir

a adsorção de albumina. Poros de até 30 nm tendem a dificultar a adsorção enquanto que poros superiores a este valor tendem a facilitar a adsorção. Poros grandes, acima de 70 nm também tendem a reduzir a adsorção. Assim, poros na faixa de 30 a 70 nm em diâmetro tendem a ter valores de adsorção maior.

A síntese de superfícies capazes de atrair proteínas específicas, com melhor adesão celular ainda é um desafio [11], visto que o controle vai além de manter a composição química do material, sendo fundamental controlar também a formação de poros e do desenvolvimento da topografia da superfície.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estudar como os parâmetros morfológicos de superfície (área superficial e distribuição de tamanho de poros) podem afetar a adsorção de albumina em dois vidros do tipo 58S. A compreensão de como a microestrutura dos vidros bioativos pode afetar a adsorção de albumina permitirá o desenvolvimento de vidros com controle de porosidade e área de superfície, de forma a melhorar a adsorção de proteínas e ter uma regeneração tecidual mais eficiente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS E REAGENTES

Tetraetilortossilicato (TEOS, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, *Sigma*, >98%), ácido nítrico (HNO_3 , Dinâmica, 65%), TEP (triethyl fosfato, $\text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$, *Sigma*, >99,8%), nitrato de cálcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, *Sigma Aldrich*, >99%) e albumina sérica bovina (BSA, *Sigma Aldrich* - 98%).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. SÍNTESE DOS VIDROS 58-S

Os vidros bioativos 58S foram sintetizados de acordo com a metodologia descrita no trabalho de Oliveira *et al.* [3].

2.2.1.1. Síntese 58S-A

48,7 mL de ácido nítrico (0,1 mol/L) foram adicionados a 22,7 mL de TEOS, e agitados (300 rpm) por 60 min em temperatura ambiente até a completa hidrólise e policondensação. Em seguida, 4,5 mL de TEP foram adicionados à solução e agitados por 45 min. Por fim, 13,31 g de nitrato de cálcio tetrahidratado foram adicionados à

solução e agitados por 60 min para completar as reações. O procedimento durou 165 minutos e a solução obtida (sol) foi mantida Placa de Petri fechada a temperatura ambiente (23 °C) por 9 dias para permitir a formação do gel. O gel resultante foi seco a 60 °C e 120 °C por 72 e 48 h, respectivamente. Após a secagem, o material poroso (xerogel) foi moído em almofariz com pistilo de ágata e peneirado para obtenção de partículas $\leq 177 \mu\text{m}$ (80 *mesh*). O material foi calcinado a 700 °C em mufla JUNG J300 e armazenado em dessecador.

2.2.1.2. Síntese 58S-B

Todos os reagentes (TEOS, TEP e nitrato de cálcio tetrahidratado) foram adicionados simultaneamente a 48,7 mL de ácido nítrico 0,1 mol/L com as mesmas proporções descritas no item 2.2.1.1. A solução foi agitada à temperatura ambiente durante 165 min. As etapas posteriores a formação do gel também foram idênticas a metodologia descrita no item 2.2.1.1.

2.2.2. SORÇÃO E DESSORÇÃO DE N₂

O pré-tratamento das amostras foi realizado com aproximadamente 0,5 g de cada pó de vidro em estação de degasagem a 150 °C sob vácuo por 1 h e 30 min. A adsorção/dessorção de nitrogênio foi realizada em equipamento Quantachrome (NOVA-1200e) a 77 K na faixa P/P₀ (0,05 a 0,99 com 30 pontos). As áreas de superfície dos vidros (58S-A e 58S-B) foram determinadas pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET). Já os volumes e raios de poros foram determinados pelo método Barrett-Joyner-Halenda (BJH). As distribuições de área de superfície e volume de poros foram correlacionadas com o raio de poros de acordo com a Teoria do Funcional da Densidade (DFT).

2.2.3. ADSORÇÃO

O teste de adsorção de albumina bovina seguiu a seguinte ordem experimental: (I) preparo de uma solução estoque: solução de Albumina Sérica Bovina (BSA), (II) preparo do complexante, (III) teste de adsorção por 24 h e (IV) tratamento de dados obtidos.

2.2.3.1. PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE: BSA DE 1000 µg/mL

A solução estoque de 1000 µg/mL foi preparada com 0,25 g de BSA dissolvida em 250 mL de solução de NaCl 0,85%, essa metodologia foi baseada no trabalho de Doumas *et al.* [12]. As concentrações de 250, 500, 750 µg/mL foram preparadas através da diluição de alíquotas da solução estoque.

2.2.3.2. PREPARO DO COMPLEXANTE: BIURETO

Em um béquer de 600 mL foram dissolvidos 1,5 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 4,5 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 2,5 g de iodeto de potássio (KI) em 250 mL de água destilada sob agitação a 500 rpm. Após a completa solubilização, foram adicionados 50 mL de uma solução 0,6 mol/L de NaOH. A mistura foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL e avolumada. Logo em seguida, foi transferida para um frasco de polietileno coberto com papel alumínio e armazenado com ausência de luz, conforme metodologia descrita por Doumas *et al.* [12].

2.2.3.3. TESTE DE ADSORÇÃO DE BSA NA SUPERFÍCIE DOS VIDROS BIOATIVOS

O teste de adsorção de albumina e as equações usadas para o tratamento de dados foram feitas de acordo com as etapas já descritas em trabalho anterior realizado pelo grupo de pesquisa [3], no qual 100 mg de cada vidro bioativo (58S-A e 58S-B) foram adicionadas a 10 mL de uma solução de BSA 1.000 µg/mL, individualmente, e mantidos em temperatura ambiente por 24 horas em triplicata. Após este tempo, 5 mL do sobrenadante foram colocados em contato com 5 mL da solução de biureto para complexação. As amostras permaneceram em repouso por 10 min antes de cada medida com espectroscopia UV-Vis a 555 nm, cada ensaio foi realizado em triplicata com um total de 9 medidas para cada vidro sintetizado.

2.2.3.4. CURVA DE CALIBRAÇÃO E TRATAMENTO DE DADOS

A curva de calibração foi construída com base no comprimento de onda de maior absorção para a albumina, com leitura a 555 nm das soluções de BSA com concentrações de 0, 250, 500, 750 e 1000 µg/L determinadas por UV-Vis de acordo com a Equação 1 com $r^2 = 0,99$.

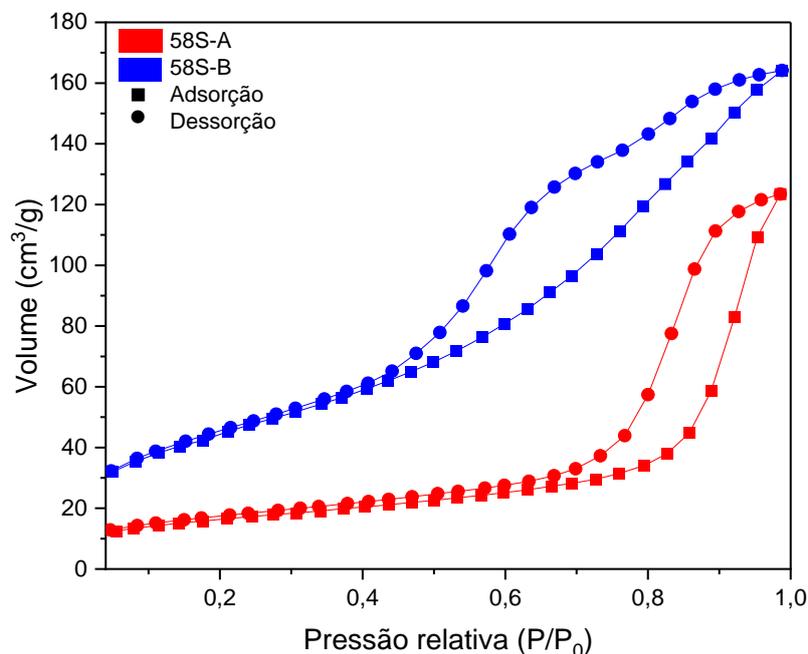
$$C_s = \frac{(Abs-0,17)}{0,0001} \quad (\text{Eq. 1})$$

A concentração de albumina adsorvida nos vidros bioativos foi determinada pela diferença entre a concentração inicial e a concentração no sobrenadante, levando em conta o volume da solução e a massa dos vidros. As quantidades de proteínas adsorvidas (μg) por grama de vidro e por área superficial ($\mu\text{g}/\text{m}^2$) foram calculadas, com os resultados expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$). A significância estatística foi avaliada por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, considerando $p > 0,05$ como não significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A área superficial e porosidade dos vidros 58S foi modificada pela ordem de adição dos precursores na síntese. A Figura 1 mostra que os vidros 58S apresentam curvas de sorção N_2 distintas, com histerese do tipo H1 para o vidro 58S-A e uma mistura entre H1 e H2-b para o vidro 58S-B [13].

Figura 1: Sorção e dessorção de N_2 dos vidros 58S-A e 58S-B.



A histerese do tipo H1 indica a formação de um material com mesoporos ordenados, já o tipo H2-b está associado a presença de poros que estão bloqueados e tem formato de garrafa [13].

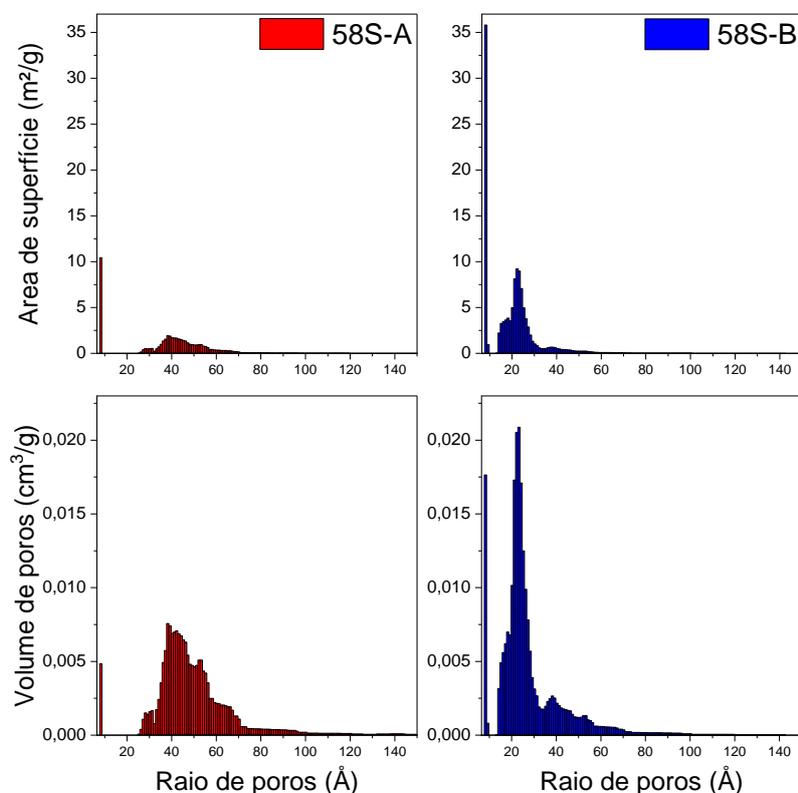
A Tabela 1, indica os valores de área de superfície calculados pelo método BET para ambos os vidros. A área de superfície do vidro 58S-B, aquele em que todos os reagentes foram adicionados simultaneamente, foi de 49,15 m²/g. Esse valor é 57,02% maior que a área do vidro em que os reagentes foram adicionados separadamente na síntese (58S-A).

Tabela 1: Parâmetros de área de superfície (BET), volume e raio de poros (BJH).

<i>Parâmetros</i>	58S-A	58S-B
Área de superfície (BET, m²/g)	28,025	49,147
Volume de poros (cm³/g)	0,180	0,225
Raio de poros (Å)	83,728	24,950

Os valores de área superficial e volume de poros foram correlacionados com a largura do poro a meia altura de acordo com os cálculos da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e são apresentados na Figura 2.

Figura 2: Distribuição de área superficial e volume de poros *versus* raio de poros obtidos por DFT.

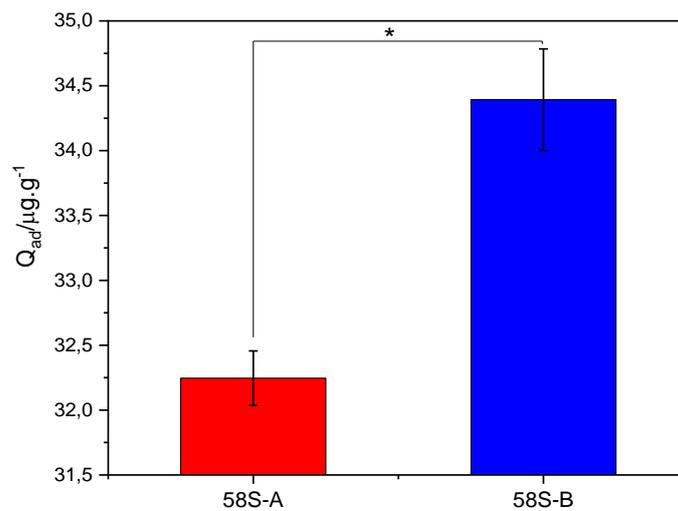


O vidro 58S-A apresenta uma distribuição de poros predominante acima de 2 nm, enquanto que o 58S-B exibe uma quantidade significativa de poros menores que

2 nm. A distribuição da área de superfície e de volume de poros apresenta maior valor acumulado para poros próximos a 2 nm no vidro 58S-B e valores entre 4-6 nm para o vidro 58S-A. O ensaio de adsorção de albumina foi realizado através da imersão de 100 mg de vidro bioativo com uma solução de 1000 $\mu\text{g/L}$ de albumina bovina. A Figura 3 indica o teor de proteína adsorvida por grama de vidro bioativo.

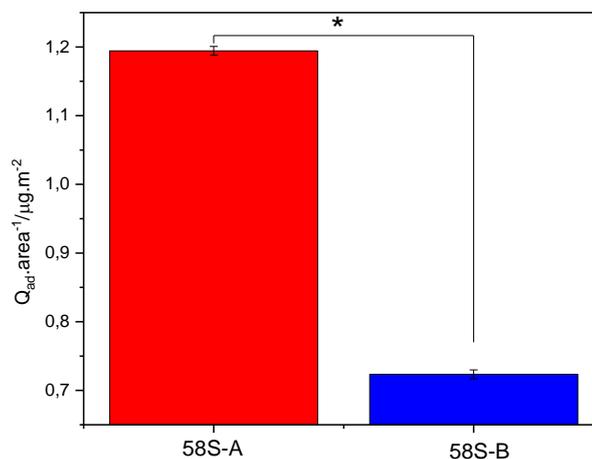
Figura 3: Quantidade de albumina adsorvida por grama de vidro bioativo ($\mu\text{g/g}$).

Legenda: * $p \leq 0,05$ como significativo.



Os resultados indicam que o 58S-B apresenta uma maior adsorção de albumina por grama de vidro e maior área de superfície. Para avaliar se a adsorção da proteína pode estar ligada diretamente a topografia da superfície, foram realizados cálculos correlacionando a concentração de albumina adsorvida por área de vidro bioativo e apresentada na Figura 4.

Figura 4: Quantidade de albumina adsorvida por área de superfície de vidro bioativo. Legenda: * $p \leq 0,05$ como significativo.



De acordo com os resultados apresentados na Figura 4 foi possível inferir que a área e a porosidade da superfície foram determinantes para uma maior adsorção de proteína no vidro 58S-A. Ao considerar que os dois vidros possuem a mesma composição, a adsorção de albumina irá depender da nanotopografia e da química da superfície. No entanto, os parâmetros como área de superfície e raio de poros são totalmente distintos.

Através das curvas de distribuição de tamanho de poros obtidas por DFT foi possível calcular o teor de mesoporos e macroporos em cada vidro bioativo. O vidro 58S-A apresenta 8% de macroporos e 92% de mesoporos, enquanto que o vidro 58S-B apresenta 3% de macroporos e 97% de mesoporos.

A presença de 5% a mais de macroporos no vidro 58S-A pode facilitar a lixiviação ou descolamento de parte das proteínas adsorvidas na superfície, mas também pode favorecer o encapsulamento da albumina no interior dos poros, assim como foi observado no estudo de Zhang *et al.* [7], que indicou que a presença de mesoporos maiores favorece o encapsulamento da albumina nos poros do vidro bioativo.

Através da correlação entre o método BET e as concentrações determinadas via UV-vis, as áreas superficiais calculadas para as amostras 58S-A e 58S-B apresentados na Tabela 1 indicam que o vidro 58S-B apresentou porosidade e área superficial muito mais elevadas do que o vidro 58S-A.

Ao correlacionar os valores de área de superfície de 28 e 49 m²/g, respectivamente, para os vidros 58S-A e 58S-B com a quantidade de albumina adsorvida, foi possível confirmar que a presença de poros maiores tende a facilitar a adsorção da albumina e o seu encapsulamento. A diferença entre a rugosidade dos vidros formados indica uma distinção na porosidade da superfície, o que pode afetar diretamente na adsorção.

4. CONCLUSÕES

O vidro 58S-B apresentou maior distribuição de poros com raios próximos de 2 nm que teve efeito no aumento da área de superfície e, conseqüentemente, maior adsorção de albumina. No entanto, mesmo considerando um vidro de mesma composição, a porosidade da superfície apresentou capacidade de adsorção de albumina divergente, o que indica a importância de se estudar as microestruturas dos vidros e as rotas de síntese que levam a formação dessas microestruturas distintas.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa utilizou as instalações do Condomínio de Laboratórios Multiusuários do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS sob o número de proposta 062025P001.

REFERÊNCIAS

- [1] U. Thamma, T.J. Kowal, M.M. Falk, H. Jain, Nanostructure of bioactive glass affects bone cell attachment via protein restructuring upon adsorption, *Sci. Rep.* 11 (2021) 5763. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85050-7>.
- [2] A. Mahato, B. Kundu, P. Mukherjee, S.K. Nandi, Applications of Different Bioactive Glass and Glass-Ceramic Materials for Osteoconductivity and Osteoinductivity, *Trans. Indian Ceram. Soc.* 76 (2017) 149–158. <https://doi.org/10.1080/0371750X.2017.1360799>.
- [3] J.F.R. Oliveira, U.A. de O. Filho, A.J.S. Rocha, H.C. dos Santos, L.S. Barreto, E.A. dos Santos, The role of calcium nitrate in early crystallization of hydroxyapatite and its effects on the bioactivity and protein adsorption of a 58S glass, *J. Non. Cryst. Solids.* 637 (2024) 123036. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2024.123036>.
- [4] Q. Luo, J.D. Andrade, Cooperative Adsorption of Proteins onto Hydroxyapatite, *J. Colloid Interface Sci.* 200 (1998) 104–113. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5364>.
- [5] K. Zheng, M. Kapp, A.R. Boccaccini, Protein interactions with bioactive glass surfaces: A review, *Appl. Mater. Today.* 15 (2019) 350–371. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.02.003>.
- [6] M.L. Godek, R. Michel, L.M. Chamberlain, D.G. Castner, D.W. Grainger, Adsorbed serum albumin is permissive to macrophage attachment to perfluorocarbon polymer surfaces in culture, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 88A (2009) 503–519. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31886>.
- [7] X. Zhang, D. Zeng, N. Li, X. Jiang, C. Liu, Y. Li, Large-pore mesoporous Ca–Si-based bioceramics with high in vitro bioactivity and protein adsorption capability for bone tissue regeneration, *J. Mater. Chem. B.* 4 (2016) 3916–3924. <https://doi.org/10.1039/C6TB00454G>.
- [8] V. Maciulis, U. Malinovskis, D. Erts, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, S.

- Balevicius, S. Juciute, I. Plikusiene, Porous Aluminium Oxide Coating for the Development of Spectroscopic Ellipsometry Based Biosensor: Evaluation of Human Serum Albumin Adsorption, *Coatings*. 10 (2020) 1018. <https://doi.org/10.3390/coatings10111018>.
- [9] E. Jansson, P. Tengvall, Adsorption of albumin and IgG to porous and smooth titanium, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 35 (2004) 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.02.007>.
- [10] S. Kondo, E. Amano, M. Kurimoto, Effect of pore size of silica for the adsorption of proteins, *Pure Appl. Chem.* 61 (1989) 1897–1901. <https://doi.org/10.1351/pac198961111897>.
- [11] V.A. Gobbo, P. Turkki, C. Santos Dias Palma, V.S. Parihar, E. Vernè, S. Spriano, A. Sanches Ribeiro, V.P. Hytönen, J. Massera, Surface modification of silicate, borosilicate, and phosphate bioactive glasses to improve/control protein adsorption: PART II, *Ceram. Int.* 49 (2023) 12856–12865. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.12.157>.
- [12] B.T. Doumas, D.D. Bayse, R.J. Carter, T. Peters, R. Schaffer, A Candidate Reference Method for Determination of Total Protein in Serum I. Development and Validation, 1981.
- [13] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 87 (2015) 1051–1069. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>.

EFFECT OF THE MICROSTRUCTURE OF 58S BIOGLASS ON ALBUMIN ADSORPTION

ABSTRACT

Two bioactive glasses (58S-A and 58S-B) were synthesized via the sol-gel method with different timings for the addition of calcium nitrate relative to the alkoxides. The characterization of the glasses included analyses of surface area, pore radius, and pore volume via nitrogen adsorption/desorption, with surface areas of 28.03 m²/g for 58S-A and 49.15 m²/g for 58S-B, and pore volumes of 0.18 and 0.23 cm³/g, respectively. The adsorption tests were performed by immersing the glasses in a bovine serum albumin (BSA) solution (1000 µg/L), and the adsorption capacities were 32.2 µg/g for 58S-A and 34.4 µg/g for 58S-B. The glass with a larger surface area (58S-B) adsorbed more proteins; however, the amount adsorbed per unit area was lower due to the pore size relative to the albumin. The microstructure influenced the adsorption, highlighting the importance of studying synthesis routes that lead to distinct microstructures.

KEYWORDS: albumin, adsorption, bioactive glass, microstructure.