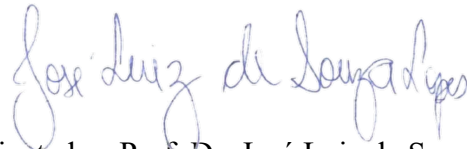


Universidade de São Paulo  
Instituto de Física

# Estudos estruturais de proteínas incorporadas em sílica mesoporosa ordenada

Jéssica Aparecida Ferreira Pedro



Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Souza Lopes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Física  
como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Luiz de Souza Lopes  
Prof(a). Dr(a). Silvia Helena Pires Serrano (IQ - USP)  
Prof(a). Dr(a). Tereza da Silva Martins (ICAQF- UNIFESP)

São Paulo  
2022

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação**  
**do Instituto de Física da Universidade de São Paulo**

Pedro, Jéssica Aparecida Ferreira

Estudos estruturais de proteínas incorporadas em sílica mesoporosa ordenada.  
São Paulo, 2022.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Física. Depto.  
de Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Souza Lopes

Área de Concentração: Biofísica Experimental

Unitermos: 1. Proteínas; 2. Sílica mesoporosa ordenada; 3. SBA-15; 4. Dicroísmo  
circular.

USP/IF/SBI-026/2022

University of São Paulo  
Physics Institute

# Structural studies of proteins incorporated in ordered mesoporous silica

Jéssica Aparecida Ferreira Pedro

Supervisor: Prof. Dr. José Luiz de Souza Lopes

Dissertation submitted to the Physics Institute of the University of Sao Paulo in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science.

Examining Committee:

Prof. Dr. José Luiz de Souza Lopes

Prof(a). Dr(a). Silvia Helena Pires Serrano (IQ - USP)

Prof(a). Dr(a). Tereza da Silva Martins (ICAQF- UNIFESP)

São Paulo  
2022

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Sydney Pedro e Sirley Pedro, e ao amor da minha vida, Alex Alves, por todo o carinho e o apoio que sempre me deram;

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Luiz S. Lopes, por todos os conhecimentos transmitidos nos últimos anos, sendo sempre muito didático e paciente em cada etapa do meu aprendizado;

À Prof. Dra. Tereza S. Martins da UNIFESP, por me apresentar a diversas técnicas experimentais e por diversas colaborações como os processos de síntese e incorporação de proteínas;

Aos professores do IFUSP, Dra. Marcia C.A. Fantini e prof. Dr. Cristiano L.P. Oliveira, por todo suporte às dúvidas em especial com a técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo;

Ao meu colega de laboratório, Dr. Victor Klein de Sousa, que sempre foi muito gentil e me ajudou imensamente com a integração ao grupo;

Ao colega de trabalho, Dr. Luís Cides, que fez o meu treinamento para as medições das isotermas de adsorção de nitrogênio acompanhando todas as medidas;

Ao técnico do Laboratório de Fluidos Complexos do IFUSP, Dr. Arnaldo Oliveira, por toda ajuda com as medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo;

Ao IFSC/USP pela disponibilização de equipamentos e laboratórios para inúmeras medidas de espectroscopia de fluorescência em solução e espectroscopia de dicroísmo circular convencional;

Ao IFUSP e a todos os professores que fizeram parte da minha formação ao longo dos anos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2019/19567-7, que concedeu suporte financeiro imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

Sílicas mesoporosas ordenadas, como a SBA-15, são excelentes suportes para o encapsulamento de proteínas, principalmente por possuírem propriedades texturais e estruturais ajustáveis, bem como a possibilidade de modificação de sua superfície quimicamente. Já é conhecido que a SBA-15 pode proporcionar às proteínas maior estabilidade estrutural e/ou funcional quando expostas a condições desnaturantes, sendo tal aspecto protetor essencial para seu uso em aplicações terapêuticas. Além disso, nos últimos anos, as propriedades adjuvantes da SBA-15 também vêm sendo estudadas por meio da incorporação de proteínas e domínios antigênicos para produção de vacinas, incluindo as formulações orais. Contudo, para aplicações seguras e eficazes, alguns desafios relacionados às particularidades de cada processo de incorporação devem ainda ser superados, sendo importante a realização de estudos que visam as caracterizações dos híbridos produzidos com proteínas distintas.

Neste trabalho, três proteínas representantes de diferentes classes hierárquicas de estruturas proteicas (toda- $\alpha$ , toda- $\beta$  e com baixo conteúdo regular) foram individualmente incorporadas em partículas de SBA-15 em duas razões sílica:proteína (10:1 e 5:1, em massa), a fim de avaliar a adsorção e possíveis alterações estruturais nas proteínas incorporadas. As estruturas secundárias das proteínas em soluções aquosas foram previamente analisadas pela espectroscopia de dicroísmo circular (CD) convencional e pelo CD com radiação síncrotron sob diferentes condições de temperatura e pH. Estas análises estabeleceram os limites de estabilidade térmica destas proteínas (até 40 °C em solução pH 7,0) que foram considerados durante o procedimento de incorporação. As caracterizações das partículas de SBA-15 foram realizadas pelas técnicas *Microscopia Eletrônica de Varredura* (SEM), *Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos* (SAXS) e por medidas de *Isotermas de Adsorção de Nitrogênio* (NAI) que indicaram partículas com grande área superficial (781,5 m<sup>2</sup>/g) e alto volume de poros (1,5 cm<sup>3</sup>/g). Independente da proteína imobilizada, o processo de incorporação reduziu os parâmetros texturais em 20 a 30% nos compósitos, quando considerado o efeito da competição com os íons na solução tampão. Medidas de SAXS sugeriram a presença de estados oligoméricos maiores (e/ou possíveis estados agregados) que podem estar relacionados com a concentração de proteína utilizada durante os processos de incorporação. *Análises Termogravimétricas* (TG) indicaram que o processo de degradação das proteínas incorporadas é iniciado em temperaturas maiores (20 a 30°C) em decorrência de novas interações intermoleculares estabelecidas entre elas e a superfície da sílica. Análises de *Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho com Transformada de Fourier* (FTIR) sugerem que a estrutura secundária predominante para cada proteína foi conservada nos compósitos. Ainda, análises de fluorescência indicaram que os resíduos de triptofano estão, de modo geral, mais protegidos de interações com o ambiente aquoso. Com base nestes resultados, a SBA-15 sintetizada se mostrou adequada para o suporte dos três modelos proteicos avaliados.

**PALAVRAS- CHAVES:** proteínas; sílica mesoporosa ordenada; SBA-15; dicroísmo circular

## ABSTRACT

Ordered mesoporous silicas, such as SBA-15, are excellent carriers for protein encapsulation, mainly because they have adjustable textural and structural properties, as well as the possibility of chemically modifying their surface. It is already known that SBA-15 can provide proteins with greater structural and/or functional stability when exposed to denaturing conditions, and this protective aspect is essential for their use in therapeutic applications. In addition, in recent years, the adjuvant properties of SBA-15 have also been studied through the incorporation of proteins and antigenic domains for vaccine production, including oral formulations. However, for safe and effective applications, some challenges related to the particularities of each incorporation process must still be overcome, and it is important to carry out studies aimed at the characterization of hybrids produced with different proteins.

In this work, three proteins representing different hierarchical classes of protein structures (all- $\alpha$ , all- $\beta$  and low regular content) were individually incorporated into SBA-15 particles in two silica: protein ratios (10:1 and 5:1, w/w), in order to evaluate the adsorption and possible structural changes in the incorporated proteins. The secondary structures of proteins in aqueous solutions were previously analyzed by conventional circular dichroism (CD) spectroscopy and by CD with synchrotron radiation under different conditions of temperature and pH. These analyzes established the thermal stability limits of these proteins (up to 40 °C in pH 7.0 solution) that were considered during the incorporation procedure. The characterizations of SBA-15 particles were performed by Scanning Electron Microscopy (SEM), Low Angle X-Ray Scattering (SAXS) and by Nitrogen Adsorption Isotherms (NAI) measurements, which indicated particles with large surface area (781.5 m<sup>2</sup>/g) and high pore volume (1.5 cm<sup>3</sup>/g). Regardless of the immobilized protein, the incorporation process reduced the textural parameters by 20 to 30% in the composites, when considering the effect of competition with ions in the buffer solution. SAXS measurements suggested the presence of higher oligomeric states (and/or possible aggregate states) that can be related to the protein concentration used during the incorporation processes. Thermogravimetric (TG) analyzes indicated that the degradation process of incorporated proteins is initiated at higher temperatures (20 to 30°C) as a result of new intermolecular interactions established between them and the silica surface. Fourier Transform Infrared (FTIR) vibrational spectroscopy analyzes suggest that the predominant secondary structure for each protein was conserved in the composites. Furthermore, fluorescence analyzes indicated that tryptophan residues are, in general, better protected from interactions with the aqueous environment. Based on these results, the synthesized SBA-15 presented suitable characteristics as support for the three protein models. From these results, the synthesized SBA-15 proved to be adequate to support the three protein models evaluated.

**KEYWORDS:** proteins; ordered mesoporous silica; SBA-15; circular dichroism

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química dos aminoácidos e ligação peptídica .....	11
<b>Figura 2:</b> Representação das estruturas secundárias de proteínas: hélice- $\alpha$ e folhas- $\beta$ .....	13
<b>Figura 3:</b> Esquemática dos mecanismos de síntese da SBA-15.....	16
<b>Figura 4:</b> Esquemática do processo de funcionalização de superfície pelo método de enxerto pós-síntese .....	18
<b>Figura 5:</b> Representação da macro e mesoporosidade da SBA-15.....	19
<b>Figura 6:</b> Características carreadoras da SBA-15 para a entrega de proteínas-modelo.....	22
<b>Figura 7:</b> Representação das estruturas secundárias para as três proteínas .....	27
<b>Figura 8:</b> Estrutura química dos fluoróforos intrínsecos em proteínas.....	39
<b>Figura 9:</b> Espectros de CD convencional para as proteínas .....	43
<b>Figura 10:</b> Comparativos entre espectros de CD convencional e com radiação síncrotron .....	44
<b>Figura 11:</b> Espectros de SRCD: desnaturação térmica da proteína Mb.....	50
<b>Figura 12:</b> Espectros de SRCD: desnaturação térmica da proteína ConA .....	50
<b>Figura 13:</b> Espectros de SRCD: desnaturação térmica da proteína STI.....	51
<b>Figura 14:</b> Comparativos entre os espectros gerados em pH 7,0: a 25 °C e após incubação a 40 °C por 16 h .....	53
<b>Figura 15:</b> Comparativos entre espectros de SRCD sob variação de temperatura e pH.....	54
<b>Figura 16:</b> Comparativos entre os espectros de SRCD para as proteínas em solução aquosa e em filmes semidesidratados .....	58
<b>Figura 17:</b> Espectros de fluorescência intrínseca e estruturas cristalográficas das proteínas .....	61
<b>Figura 18:</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura sobre as partículas de SBA-15.....	63
<b>Figura 19:</b> Curva de espalhamento de raios X a baixos ângulos para a SBA-15.....	64
<b>Figura 20:</b> Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e distribuição de tamanhos de poros para a SBA-15 .....	65
<b>Figura 21:</b> Curvas de TG/DTG e DSC para a SBA-15.....	66
<b>Figura 22:</b> Espectro de FTIR para a SBA-15.....	67
<b>Figura 23:</b> Espectros de CD para os compósitos após suspensão em solução tamponada .....	68
<b>Figura 24:</b> Comparativos entre os espectros de FTIR para a proteína Mb, compósitos e SBA-15 .....	71

<b>Figura 25:</b> Comparativos entre os espectros de FTIR para a proteína ConA, compósitos e SBA-15 .....	71
<b>Figura 26:</b> Comparativos entre os espectros de FTIR para a proteína STI, compósitos e SBA-15 .....	72
<b>Figura 27:</b> Ampliação do espectro de FTIR e a segunda derivada na região das amidas I e II ...	75
<b>Figura 28:</b> Comparativos entre espectros de fluorescência dos compósitos e proteínas em pH 7,0 .....	77
<b>Figura 29:</b> Comparativos entre espectros de fluorescência dos compósitos em pH 2,2 e proteínas em pH 7,0 .....	78
<b>Figura 30:</b> Curvas de espalhamento de raios X a baixos ângulos para todas as amostras contendo SBA-15.....	81
<b>Figura 31:</b> Curvas de SAXS para as proteínas e respectivas análises na região de Guinier.....	82
<b>Figura 32:</b> Curvas de SAXS para as proteínas e respectivas análises na região de Guinier após aumento da força iônica da solução tampão.....	83
<b>Figura 33:</b> Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e distribuição de tamanho de poros para as amostras SBA-15 e SBA-15T .....	84
<b>Figura 34:</b> Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e distribuição de tamanho de poros para as amostras contendo Mb .....	85
<b>Figura 35:</b> Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e distribuição de tamanho de poros para as amostras contendo ConA .....	85
<b>Figura 36:</b> Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e distribuição de tamanho de poros para as amostras contendo STI.....	86
<b>Figura 37:</b> Curvas de TG/DTG para as amostras SBA-15, SBA15-T e sais da solução tampão.	88
<b>Figura 38:</b> Comparativos entre curvas TG/DTG para amostras contendo Mb .....	90
<b>Figura 39:</b> Comparativos entre curvas TG/DTG para amostras contendo ConA .....	90
<b>Figura 40:</b> Comparativos entre curvas TG/DTG para amostras contendo STI.....	91
<b>Figura 41:</b> Curvas de DSC: comparativos entre as proteínas e respectivos compósitos .....	92



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Proteínas, fontes de obtenção e estrutura secundária predominante .....	26
<b>Tabela 2:</b> Nomenclatura das amostras geradas após o processo de síntese e incorporação das proteínas em SBA-15 indicando a proporção de sílica: proteína nos compósitos.....	30
<b>Tabela 3:</b> Estimativas das frações de estrutura secundária com o CD convencional e com o SRCD .....	46
<b>Tabela 4:</b> Estimativas das frações de estrutura secundária com os espectros gerados a partir das estruturas cristalográficas .....	48
<b>Tabela 5:</b> Determinação da temperatura de transição térmica (T <sub>m</sub> ).....	52
<b>Tabela 6:</b> Frações estruturais majoritárias para cada proteína sob variações de pH e temperatura com experimentos de SRCD .....	56
<b>Tabela 7:</b> Número de resíduos de triptofano (Trp) e tirosina (Tyr) na sequência polipeptídica e o percentual em relação ao total de resíduos de aminoácidos na sequência. ....	59
<b>Tabela 8:</b> Posicionamentos das bandas de vibração do grupo amida no espectro de FTIR das proteínas liofilizadas e respectivas vibrações moleculares. ....	72
<b>Tabela 9:</b> Parâmetro de rede e distâncias interplanares para todas as amostras calculados para cada pico de difração indexado .....	80
<b>Tabela 10:</b> Estimativas para o raio de giro das proteínas com a aproximação de Guinier .....	83
<b>Tabela 11:</b> Parâmetros texturais para todas as amostras .....	87
<b>Tabela 12:</b> Parâmetros obtidos com termogravimetria .....	91
<b>Tabela 13:</b> Parâmetros obtidos com calorimetria diferencial de varredura.....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTES	3-aminopropiltriétoxissilano
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barrett-Joyner-Halenda
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>Bovine serum albumin</i>
CD	Dicroísmo circular, do inglês <i>Circular Dichroism</i>
CNTP	Condições normais de temperatura e pressão
ConA	Concanavalin A
DSC	Calorimetria diferencial de varredura, do inglês <i>Differential scanning calorimetry</i>
DTG	Termogravimetria derivada, do inglês <i>Derivative thermogravimetry</i>
EES	Elementos de Estrutura Secundária
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform infrared spectroscopy</i>
HGG	Gamaglobulina G humana, do inglês <i>Human gammaglobulin G</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KJS	Kruk-Jaroniec-Sayari
Mb	Mioglobina
MRW	Peso médio dos resíduos, do inglês <i>Mean Residue Weight</i>
NAI	Isotermas de adsorção de nitrogênio, do inglês <i>Nitrogen adsorption isotherms</i>
NRMSD	Raiz do erro quadrático médio normalizado, do inglês <i>Normalized Root Mean Square Deviation</i>
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
PDB	Banco de dados de proteínas, do inglês <i>Protein Data Bank</i>
SAXS	Espalhamento de raio-X a baixos ângulos, do inglês <i>Small-angle X-ray scattering</i>
SBA-15	Santa Barbara amorfa - 15, do inglês <i>Santa Barbara amorphous - 15</i>
SEM	Microscopia eletrônica de varredura, do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i>
SMO	Sílica mesoporosa ordenada
SRCD	Dicroísmo circular com radiação síncrotron, do inglês <i>Synchrotron Radiation Circular Dichroism</i>

STI	Inibidor de tripsina de soja, do inglês <i>Soybean Trypsin inhibitor</i>
TEOS	Tetraetilortossilicato
TG	Termogravimetria, do inglês <i>Thermogravimetry</i>
TIPB	1,3,5-triisopropilbenzeno
Tm	Temperatura de fusão, do inglês <i>Melting temperature</i>

## SUMÁRIO

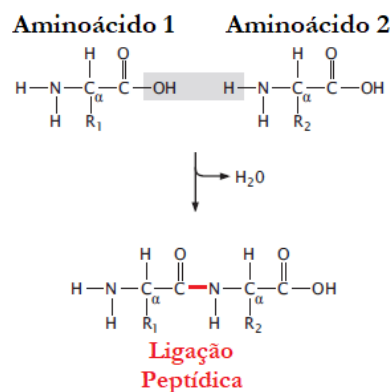
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 Proteínas.....	11
1.2 Sílicas mesoporosas ordenadas e a SBA-15.....	15
1.2.1 Incorporação de biomoléculas .....	18
1.3 Objetivos .....	24
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
2.1 Materiais.....	26
2.1.1 Proteínas-modelo utilizadas.....	26
2.1.2 Reagentes e soluções .....	28
2.2 Métodos.....	28
2.2.1 Síntese da SBA-15 .....	28
2.2.2 Incorporação das proteínas em SBA-15.....	29
2.2.3 Técnicas experimentais .....	31
2.2.3.1 Espalhamento de raios X a baixos ângulos.....	31
2.2.3.2 Isotermas de adsorção de nitrogênio .....	34
2.2.3.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier .....	35
2.2.3.4 Espectroscopia de Dicroísmo Circular .....	36
2.2.3.5 Espectroscopia de fluorescência .....	39
2.2.3.6 Análise térmica.....	40
2.2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura .....	41
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>42</b>
3.1 Caracterizações estruturais dos sistemas proteicos .....	42
3.1.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	42

3.1.2 Espectroscopia de fluorescência .....	59
3.2 Caracterizações das partículas de SBA-15.....	62
3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	62
3.2.2 Espalhamento de raios X a baixos ângulos .....	63
3.2.3 Isotermas de adsorção de nitrogênio .....	64
3.2.4 Análise Térmica.....	65
3.2.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier .....	66
3.3 Estudos sobre a incorporação de modelos proteicos em SBA-15 .....	67
3.3.1 Caracterizações das estruturas proteicas .....	67
3.3.1.1 Ensaio de espectroscopia de dicroísmo circular .....	67
3.3.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier .....	70
3.3.1.3 Espectroscopia de fluorescência .....	76
3.3.2 Estudos sobre a adsorção.....	79
3.3.2.1 Espalhamento de raios X a baixos ângulos.....	79
3.3.2.2 Isotermas de adsorção de nitrogênio .....	84
3.3.2.3 Análise térmica.....	87
<b>4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>94</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Proteínas

Proteínas, também conhecidas como polipeptídeos de cadeias longas, são moléculas sintetizadas a partir de um conjunto de 22 tipos de aminoácidos (ZHANG; GLADYSHEV, 2007) combinados numa sequência específica. Estas moléculas são intensamente estudadas dado que desempenham inúmeras funções essenciais e diversificadas em todas as espécies (ALBERTS et al., 2002; NELSON; COX., 2004). Quimicamente, a chamada cadeia polipeptídica ou cadeia principal das proteínas é construída a partir de ligações covalentes denominadas ligações peptídicas que são estabelecidas entre os grupos  $-NH_2$  de um determinado aminoácido e o grupo  $-COOH$  do próximo aminoácido que compõe a sequência, conforme indicado na Figura 1. Ligações peptídicas são estabelecidas por reações de condensação que promovem a liberação de uma molécula de água. Dessa forma, os aminoácidos que compõe a cadeia polipeptídica passam a ser denominados de resíduo de aminoácido. Já a cadeia R apresenta distinções em suas propriedades físico-químicas e, portanto, é o fator de diferenciação entre os aminoácidos.



**Figura 1: Estrutura química dos aminoácidos e ligação peptídica.** Estrutura química genérica dos aminoácidos onde nota-se um átomo de hidrogênio, os grupos  $-COOH$  e  $-NH_2$  e a cadeia R ligados covalentemente ao átomo de carbono central ( $C_\alpha$ ). A ligação peptídica (destacada em vermelho) é estabelecida entre os grupos  $-COOH$  do aminoácido 1 e o grupo  $-NH_2$  do aminoácido 2 acompanhada da liberação de uma molécula de água.

Fonte: Adaptado de ALMEIDA, 2016.

Existem diversas possibilidades em arranjos espaciais globais para a cadeia polipeptídica denominadas *conformações* que, principalmente resultam da liberdade de rotação das ligações químicas na cadeia, variabilidade nas propriedades físico-químicas dos aminoácidos da sequência

e interações com o solvente (ALBERTS et al., 2002; NELSON; COX., 2004). No entanto, dentre as possibilidades, as conformações denominadas *nativas* (também conhecidas como estados dobrados ou enovelados) possuem relação direta com o desempenho da função biológica das proteínas. Este fundamento, ao longo de décadas, direcionou inúmeros estudos que, além da elucidação dos arranjos nativos, buscaram desvendar os mecanismos com os quais as proteínas adquirem tal conformação (ANFINSEN, 1973; DILL; MACCALLUM; FOLDING, 2012).

Historicamente, estrutura e função são conceitos conectados no estudo de proteínas. Assim, certas alterações estruturais em relação à conformação nativa podem ser suficientes para inativá-las. A cadeia polipeptídica pode ser parcialmente ou completamente desdobrada em um processo chamado *desnaturação proteica*. Quando esse processo ocorre, muitas das ligações intermoleculares que sustentam o arranjo nativo são rompidas e mudanças estruturais locais ou globais podem inibir a sua função e/ou promover interações indesejáveis (ZAMAN et al., 2019).

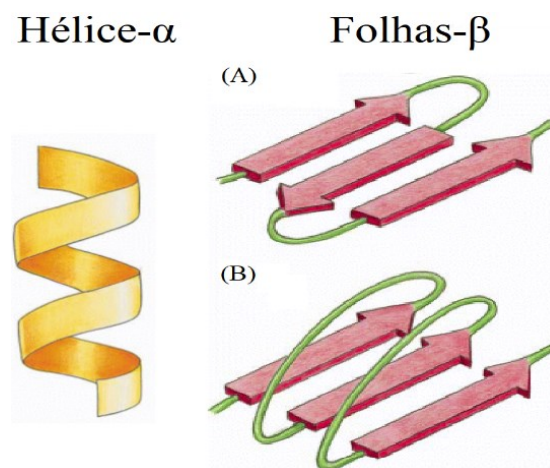
Muitos processos que levam à desnaturação proteica *in vitro* estão relacionados à modificação das condições do meio fisiológico. A elevação da temperatura, variação de pH ou do tipo de solvente em que as proteínas estão imersas são processos comuns que podem culminar na desnaturação proteica (CHATTERJEE; MANDAL, 2003; MEHL; CRAWFORD; ZHANG, 2009). *In vivo*, processos de agregação ocorrendo entre proteínas mal enoveladas no meio celular são identificados como os principais mecanismos para o desenvolvimento de algumas doenças humanas como, por exemplo, doenças neurodegenerativas graves como o Parkinson (CHITI; DOBSON, 2017; SORRENTINO; GIASSON, 2020). Contudo, é importante ressaltar que as proteínas não são moléculas rígidas e que, portanto, é fundamental certo grau de flexibilidade que possibilite mudanças conformacionais controladas que são funcionais como ocorre, por exemplo, em proteínas motoras (ALBERTS et al., 2002).

### 1.1.1 Níveis estruturais de uma proteína

O arranjo molecular das proteínas é comumente descrito em função de quatro níveis estruturais denominados estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. Os aspectos fundamentais que descrevem os níveis estruturais representam uma base solidificada de conhecimentos sobre estruturas proteicas conforme resumidos a seguir com base nas obras de ALBERTS et al. 2002 e NELSON E COX. 2004.

A estrutura primária descreve a sequência específica dos aminoácidos que constituem uma cadeia polipeptídica, sendo ditada pelo código genético dos organismos vivos. Por convenção, o sequenciamento dos aminoácidos é ordenado a partir do grupo amino livre (ou N-terminal) em direção a carboxila livre (ou C-terminal).

A estrutura secundária refere-se a alguns padrões de dobramento em trechos específicos da cadeia polipeptídica que são estabilizados por ligações de hidrogênio entre grupos  $-C=O$  e  $-N-H$  da cadeia principal e, portanto, não envolvem a cadeia R dos resíduos de aminoácidos. Desse modo, mesmo proteínas distintas podem conter tais padrões estruturais comumente chamados de elementos de estrutura secundária (EES). Os principais representantes são hélices- $\alpha$  e fitas- $\beta$  ilustrados na Figura 2. Ainda, trechos da cadeia que conectam conjuntos de hélice- $\alpha$  e/ou fitas- $\beta$  modificando a direção de seus arranjos são denominados alças ou voltas.



**Figura 2: Representação das estruturas secundárias de proteínas: hélice- $\alpha$  e folhas- $\beta$ .** Padrões helicoidais em trechos da cadeia polipeptídica denominados hélices- $\alpha$  (em amarelo). As fitas- $\beta$  (flechas vermelhas) formam padrões denominados folhas- $\beta$  antiparalelas (A) e folhas- $\beta$  paralelas (B) onde os segmentos se dispõem de forma alternada ou alinhada, respectivamente, por intermédio de estruturas denominadas *voltas* (em verde).

Fonte: Adaptado de ALBERTS et al. 2002.

As estruturas do tipo hélices- $\alpha$ , folhas- $\beta$  e voltas são consideradas estruturas com alto grau de ordenamento (estruturas regulares ou canônicas). Entretanto, trechos da cadeia polipeptídica podem ser caracterizados pela ausência de ordenamento espacial regular e específico que são conhecidos como estruturas desordenadas. Proteínas com predominância deste tipo de estrutura são chamadas proteínas intrinsecamente desordenadas (IDP, do inglês *Intrinsically Disordered Protein*) (DYSON; WRIGHT, 2005).



A estrutura terciária refere-se ao arranjo tridimensional total da cadeia e, portanto, corresponde à forma “global” da proteína. Neste sentido, este nível estrutural inclui novas dobras intracadeia que, de forma geral, caracterizam a disposição espacial total das estruturas secundárias. Os arranjos globais são estabilizados por interações intermoleculares (ligações hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações íon-dipolo, interações íon-dipolo induzido, forças de dispersão de London ) que são estabelecidas entre partes distintas da cadeia, incluindo interações entre as cadeias R dos aminoácidos e também efeitos de interações com o solvente (ALMEIDA, 2016). Ligações covalentes conhecidas como pontes de dissulfetos também podem estabilizar a estrutura terciária de algumas proteínas que contêm mais de um resíduo de aminoácido cisteína em sua sequência polipeptídica. Ainda, alguns padrões contendo combinações distintas das estruturas secundárias canônicas e a forma como estão organizados no espaço são chamados de motivos de proteínas (ou estruturas supersecundárias). Estes padrões são reconhecíveis em inúmeras estruturas proteicas e, portanto, também são amplamente utilizados na descrição do arranjo global, por exemplo, o tipo sanduíche- $\beta$  em que duas folhas- $\beta$  antiparalelas ficam dispostas em um arranjo face a face.

Por fim, a estrutura quaternária de uma proteína descreve a organização resultante da interação entre cadeias polipeptídicas distintas cuja estrutura resultante é denominada multímeros.

### 1.1.2 Classificação proteica

Proteínas podem ser agrupadas em função de semelhanças em seus arranjos estruturais possibilitando reconhecer similaridades evolutivas entre proteínas distintas e, possivelmente, pistas sobre a função bioquímica de novas estruturas. Neste contexto, existem algumas bases de dados para classificação de proteínas como o CATH (ORENGO et al., 1997) que utiliza dados de estruturas cristalográficas depositadas no Banco de Dados de Proteínas (PDB, *Protein Data Bank*) para facilitar o reconhecimento destas relações. Os desenvolvedores propuseram quatro níveis hierárquicos para classificação de domínios proteicos agrupados em: (ORENGO et al., 1997)

(C) Classe: agrupamento de domínios em função da composição/proporção semelhante de hélice- $\alpha$  e fitas- $\beta$ . As classificações neste nível são toda- $\alpha$ , toda- $\beta$ ,  $\alpha$ - $\beta$  e pouca estrutura secundária (proteínas com baixo conteúdo em hélice- $\alpha$  e fitas- $\beta$ );

- (A) Arquitetura: agrupamentos de domínios com base na disposição das estruturas secundárias (motivos de proteínas);
- (T) Topologia: agrupamentos de domínio com base no nível anterior, mas diferenciando as conexões entre tais estruturas;
- (H) Homologia: domínios com similaridades estruturais e também funcionais;

## 1.2 Sílicas mesoporosas ordenadas e a SBA-15

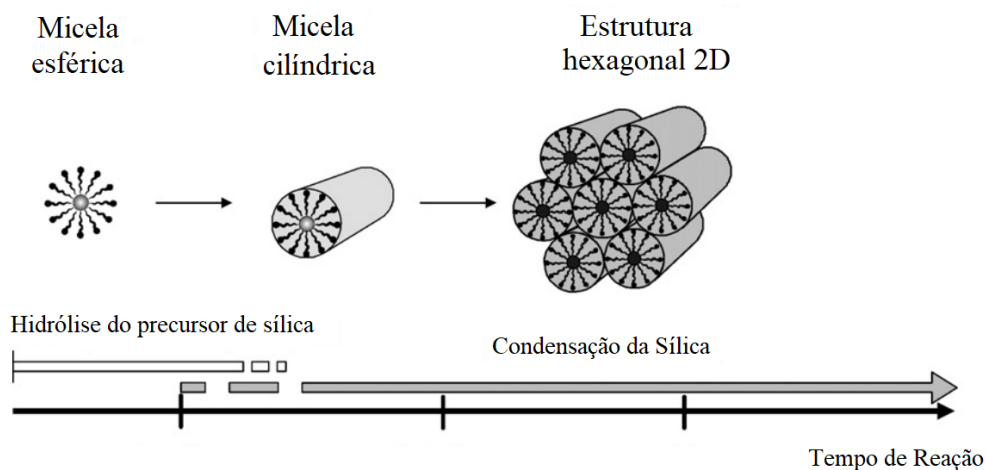
Sílicas mesoporosas ordenadas (SMO) são materiais nanoestruturados que se apresentam em diferentes morfologias, propriedades texturais e estruturas de poros (ALOTHMAN, 2012). Dentre as SMO mais estudadas, está a SBA-15 (*Santa Barbara Amorphous*, nº 15) cujos poros com formato cilíndrico e tamanho uniforme estão dispostos em uma rede bidimensional hexagonal (ZHAO et al., 1998a, 1998b).

No caso da SBA-15, a metodologia de síntese emprega um copolímero tribloco não iônico que atua como direcionador da estrutura durante a formação dos poros cilíndricos (ZHAO et al., 1998a, 1998b). Para a formação da estrutura porosa característica da SBA-15, a síntese deve ocorrer em meio de elevada acidez (solução de ácido clorídrico,  $\text{pH} < 2,0$ ) onde, inicialmente, o copolímero tribloco Pluronic P123 ( $\text{EO}_{20}\text{-PO}_{70}\text{-EO}_{20}$ ) constituído de duas cadeias hidrofílicas de óxido de polietileno (PEO) e uma cadeia hidrofóbica de óxido de polipropileno (PPO) é solubilizado.

A característica anfifílica deste copolímero resulta na automontagem de micelas esféricas com núcleo hidrofóbico e superfície hidrofílica. (MANET et al., 2011a) Com a adição de uma fonte de sílica (TEOS, tetraetilortossilicato), inicia-se a fase de hidrólise deste composto cujos produtos são precursores de sílica e moléculas de etanol. (HENCH; WEST, 1990; MANET et al., 2011b) Juntamente a este processo, ocorre também a polimerização da sílica através de reações de condensação entre as espécies precursoras que, em último estágio, resultarão na parede de sílica deste material.

Segundo a hipótese *Cooperativa de Automontagem* que aborda uma via para a formação da mesoestrutura (WAN; ZHAO, 2007), enquanto os processos de hidrólise e condensação dos precursores de sílica ocorrem de forma concomitante, um processo de transição entre micelas esféricas para micelas cilíndricas de caráter híbrido (orgânico/inorgânico) passa a ocorrer por

intermédio de interações entre o copolímero e o precursor de sílica (ZHOLOBENKO et al., 2008; SUNDBLOM et al., 2009; MANET et al., 2011b). Nos próximos estágios da síntese, ocorre o amadurecimento e a agregação das estruturas cilíndricas que formarão a fase ordenada característica da SBA-15. Este mecanismo para a síntese da SBA-15 é ilustrado na Figura 3.



**Figura 3: Esquemática dos mecanismos de síntese da SBA-15.** Inicialmente o sistema é composto por micelas esféricas do copolímero neutro. Após a adição da fonte de sílica, as micelas sofrem transição para a forma cilíndrica com característica híbrida (orgânica/inorgânica) conforme os processos de hidrólise e condensação dos precursores de sílica ocorrem concomitantemente. Agregados cilíndricos altamente ordenados estão presentes na última etapa da síntese. A seta indica a evolução temporal.

Fonte: Adaptado e traduzido de ZHOLOBENKO et al. 2008

A estrutura mesoporosa da SBA-15 é obtida após a remoção do copolímero por processos de calcinação e/ou extração com solvente orgânico (DE ÁVILA; SILVA; MATOS, 2016). Além dos mesoporos, a SBA-15 também apresenta poros irregulares na escala micrométrica (diâmetro < 2 nm) incrustados na parede de sílica que interconectam os mesoporos (WAN; ZHAO, 2007).

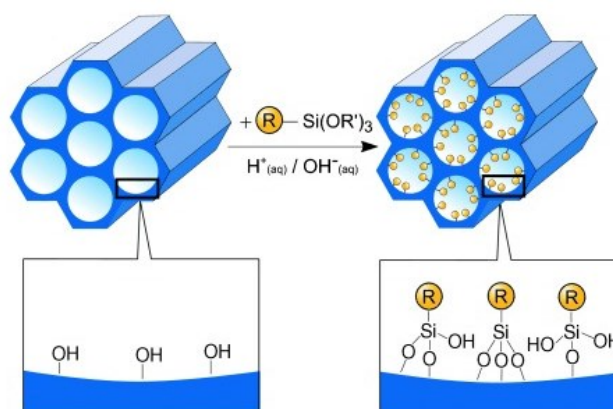
As características do material resultante deste processo de síntese são fortemente dependentes das condições experimentais selecionadas. Alterações na velocidade de agitação, temperatura e tempo aplicados no decorrer da síntese promovem modificações nos parâmetros estruturais e texturais e também na morfologia das partículas (FULVIO; PIKUS; JARONIEC, 2005; DE ÁVILA; SILVA; MATOS, 2016). Assim, muito embora certas condições possam levar à redução do grau de ordenamento dos mesoporos, diâmetro dos poros, espessura parede da sílica entre outras modificações, a sensibilidade ligada ao processo de síntese também possibilita ajustar

as condições mais adequadas de modo que as partículas sintetizadas atendam a algumas características de interesse como por exemplo, o tamanho das partículas e a morfologia.

Assim, a SBA-15 possui propriedades favoráveis para o suporte e carreamento de outras espécies (moléculas orgânicas ou inorgânicas, nanopartículas, etc), principalmente por exibir poros com diâmetro uniforme e ajustáveis (5 – 30 nm), alta área superficial específica (superior a  $600 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ ) e alto volume de poros (em torno de  $1 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ ) (ZHAO et al., 1998a). A SBA-15 também pode apresentar elevada estabilidade hidrotérmica e, além disso, contém o grupo químico reativo silanol (Si-OH) por toda a sua superfície interna e externa que permite a formação de interações intermoleculares com outras espécies (KWON et al., 2013).

A presença do grupo Si-OH também possibilita a modificação da superfície da SBA-15 quimicamente. Tipicamente, para a funcionalização da superfície são utilizados agentes sililantes que apresentam grupos químicos funcionais com propriedades físico-químicas distintas, por exemplo, grupos hidrofóbicos como o grupo fenil ou hidrofílicos como os grupos  $-\text{NH}_2$  e  $-\text{SH}$  (ARAKAKI; AIROLDI, 1999; FERENC et al., 2016). A funcionalização de superfície é um procedimento particularmente importante, pois viabiliza novos tipos de interações com a espécie a ser encapsulada como as ligações covalentes. A funcionalização de superfície pode ser realizada por métodos de condensação direta que ocorre durante a síntese da SBA-15 ou métodos de enxerto pós-síntese (HOFFMANN et al., 2006; MALVI et al., 2009), conforme ilustrado na Figura 4.

Em razão de suas características adaptáveis e relativo baixo custo de síntese, a SBA-15 tem sido estudada para diversas aplicabilidades. Por exemplo, métodos de encapsulamento de nanopartículas metálicas como prata (CHI et al., 2012) foram reportados para fins de desenvolvimento de sensores e propósitos catalíticos. Outros estudos avaliaram a incorporação de polímeros orgânicos para produção de materiais híbridos orgânicos/ inorgânicos com propriedades condutoras melhoradas (PEDROSO et al., 2013). Também há estudos na área ambiental (THUNYARATCHATANON et al., 2017), entrega de ativos/fármacos (HALAMOVÁ et al., 2010) e imobilização de macromoléculas biológica como proteínas (KANG et al., 2007) sendo, este último, o campo de interesse deste trabalho.



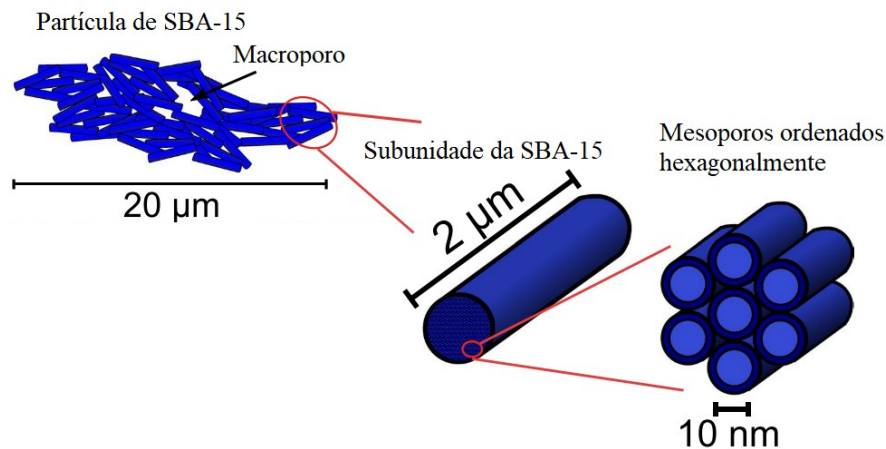
**Figura 4: Esquematização do processo de funcionalização de superfície pelo método de enxerto pós-síntese.** A ilustração destaca a presença dos grupos -OH na superfície dos mesoporos da SBA-15. Após a suspensão das partículas em meio aquoso juntamente ao composto sililante ( $R-Si(OR')_3$ ), parte da cadeia deste composto interagem com os silanóis livres da superfície da sílica e a outra contendo um grupo funcional R com propriedades físico-químicas desejadas pode interagir com a espécie de interesse. A principal vantagem é grande variedade de cadeias R que podem ser empregadas, embora, o controle sobre a homogeneidade destes grupos na superfície possa ser dificultado. Fonte: HOFFMANN et al. 2006

### 1.2.1 Incorporação de biomoléculas

Graças às suas propriedades ajustáveis e elevada estabilidade estrutural, a SBA-15 é uma excelente candidata para o carregamento de proteínas. Neste caso, o principal objetivo é conferir proteção estrutural e, conseqüentemente, funcional para as macromoléculas imobilizadas. O processo de adsorção proteica é intermediado por diversos tipos de interações intermoleculares como as ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e de Van der Waals e, possivelmente, ligações covalentes em SBA-15 funcionalizada (SALIS; BHATTACHARYYA; MONDUZZI, 2010; RABE; VERDES; SEEGER, 2011; GUILHERME et al., 2019). Proteínas suficientemente pequenas para adentrar nos mesoporos da SBA-15 poderão ser ali imobilizadas. A adsorção também pode ocorrer na superfície externa da SBA-15, inclusive ocupando a escala da macroporosidade cujos poros ( $> 50$  nm) se formam entre os aglomerados de bastonetes cilíndricos (RASMUSSEN et al., 2019), conforme se observa na Figura 5.

Em geral, os processos de incorporação ocorrem via impregnação úmida em que as proteínas são dispersas em meio tamponado com as partículas de SBA-15. Em função da estabilidade estrutural da SBA-15, os processos que envolvem a suspensão em solução aquosa são

possíveis de serem conduzidos (MARIANO-NETO et al., 2014), contudo sílica funcionalizadas podem apresentar melhoras contra o processo de lixiviação (IZQUIERDO-BARBA et al., 2010).



**Figura 5: Representação da macro e mesoporosidade da SBA-15.** Ilustração dos macroporos que se formam entre as subunidades de SBA-15, seguida da ilustração das subunidades da SBA-15 (bastonetes cilíndricos de 2 µm de tamanho) onde os mesoporos com diâmetros de 10 nm estão organizados em uma rede hexagonal bidimensional. Fonte: Adaptado e traduzido de RASMUSSEN et al., 2019

Muitas variáveis influenciam o processo de adsorção de proteínas em superfícies sólidas, assim caracterizando um fenômeno de difícil previsibilidade (RABE; VERDES; SEEGER, 2011). Em geral, busca-se em cada processo o equilíbrio entre dois fatores: (i) maximizar a carga de proteínas adsorvidas e (ii) conservar as estruturas proteicas em sua conformação nativa/funcional na matriz porosa.

Algumas variáveis controladas durante a incorporação podem ser categorizadas como fatores externos, tais como a temperatura, pH e força iônica do meio (RABE; VERDES; SEEGER, 2011). De modo geral, estes fatores são reportados na literatura com efeito modulador sobre a taxa de adsorção da proteína na sílica. Por exemplo, o efeito da temperatura foi avaliado em um estudo de incorporação da proteína BSA (Albumina sérica bovina) em SBA-15 com poros expandidos em diferentes tamanhos e superfície funcionalizada com o composto aminado APTES (3-aminopropiltrióxissilano) (NGUYEN et al., 2008). Neste estudo, avaliaram a capacidade de adsorção da SBA-15 em diferentes temperaturas de incubação (20°C, 30°C e 40°C), sendo observado um aumento na capacidade de adsorção conforme o aumento da temperatura.

Alguns estudos investigaram a influência do pH e da força iônica do meio de incorporação observando seus efeitos sobre a quantidade de proteína adsorvida em sílicas mesoporosas (VINU et al., 2004; BHARTI et al., 2014; MOERZ; HUBER, 2015; SALIS et al., 2016) e a atividade

enzimática da proteína incorporada (LYNCH et al., 2016). De modo geral, a adsorção é favorecida quando a proteína e a sílica possuem cargas líquidas de polaridade contrária devido à atração eletrostática. Este processo, portanto, está vinculado ao ponto isoelétrico (P.I.) da proteína e sílica (P.I.  $\sim 2$ ) e depende do pH do meio de incorporação. Entretanto, em condições de incorporação próximas ao ponto isoelétrico da proteína, é comum ocorrer o aumento da quantidade adsorvida devido à redução da repulsão eletrostática entre as moléculas proteicas (SALIS et al., 2016).

As características superficiais do suporte, neste caso a SBA-15, também influenciam o processo de adsorção (RABE; VERDES; SEEGER, 2011). Em alguns estudos, propriedades como tamanho dos mesoporos e área superficial foram identificados como relevantes para a quantidade de proteína adsorvida. Por exemplo, GARCIA et al. 2016 avaliaram os efeitos na capacidade de adsorção das proteínas BSA e HGG (Gamaglobulina humana G) em SBA-15 cujo preparo empregou o composto TIPB (1,3,5-triisopropilbenzeno) durante a síntese para expansão do tamanho dos mesoporos. Observaram aumento de 24% no diâmetro dos mesoporos que elevou a adsorção proteica conforme verificado pela redução dos parâmetros texturais (área de superficial e volume dos poros) e por modelagem de dados de SAXS (Espalhamento de raios X a baixos ângulos). Em contrapartida, também observaram a diminuição da fase ordenada que ocorre devido ao uso do dilatador na síntese (GARCIA et al., 2016).

O citocromo C foi imobilizado em partículas de SBA-15 e em MCM-48 (SMO de estrutura cúbica) em um estudo que demonstrou a proteção atribuída ao suporte de sílica em condições desnaturantes (WASHMON-KRIEL; JIMENEZ; BALKUS, 2000). Neste mesmo estudo, também foi observada a influência de propriedades superficiais e texturais na taxa de incorporação em SMO com morfologias distintas. Além disso, outros trabalhos obtiveram indicativos de que a funcionalização da sílica pode acarretar melhorias no processo de adsorção de diversas espécies orgânicas, incluindo as proteínas, por meio da melhora na seletividade e estabilidade dessas moléculas. (MALVI et al., 2009; POPOVA et al., 2012; FERENC et al., 2016).

As próprias características intrínsecas da proteína a ser imobilizada como o seu tamanho e as suas propriedades superficiais ligada às propriedades físico-química distintas dos resíduos de aminoácidos que compõe a sua cadeia, também são fatores importantes para o processo de adsorção (RABE; VERDES; SEEGER, 2011). Assim, as particularidades de cada proteína podem, a princípio, limitar as condições de incorporação (fatores externos) a fim de evitar diversos processos

que resultem em alteração estrutural e perda da funcionalidade das proteínas, bem como interações intermoleculares indesejadas.

As cargas superficiais locais das proteínas também são relevantes no processo de adsorção, possivelmente atuando no direcionamento da proteína durante a adsorção na sílica principalmente em função das interações eletrostáticas e de Van der Waals (MOERZ; HUBER, 2014). Este efeito também pode estar relacionado às situações bem-sucedidas de incorporação proteica em sílicas mesoporosas que ocorrem mesmo quando a carga superficial líquida da proteína e da superfície da sílica possuem a mesma polaridade (por exemplo, ambas carregadas negativamente) (KUBIAK-OSSOWSKA; JACHIMSKA; MULHERAN, 2016).

#### 1.2.1.1 O uso de SBA-15 na produção de Vacinas

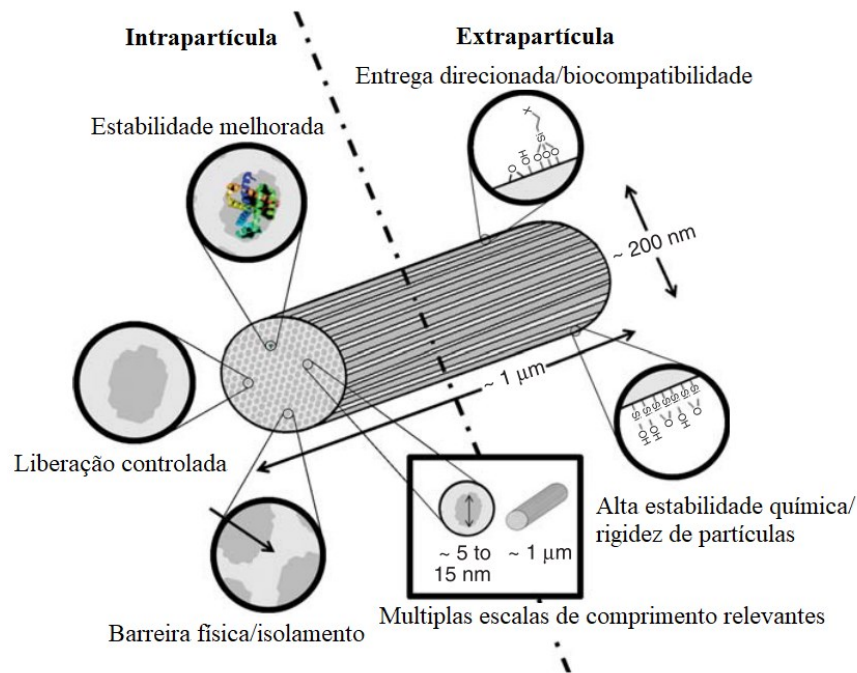
Uma aplicação altamente sofisticada que engloba a incorporação de proteínas em SBA-15 é a imobilização de proteínas/domínios antigênicos para produção de vacinas. A Figura 6 ressalta algumas características atribuídas a SBA-15 que possibilitam esta aplicação, tais como a melhora da estabilidade proteica, liberação controlada e biocompatibilidade (SIEFKER; KARANDE; COPPENS, 2014). Além disso, para algumas tecnologias de vacinas como as baseadas em subunidades proteicas (POLLARD; BIJKER, 2021) é importante que as formulações contenham substâncias adjuvantes capazes de promover uma resposta imune mais forte em comparação com o antígeno sozinho (MOHAN; VERMA; NAGESWARA RAO, 2013).

Neste contexto, alguns estudos com modelos vivos avaliaram o potencial da SBA-15 como um novo veículo/adjuvante para vacinas (incluindo as vacinas orais) indicando que tal aplicação pode produzir uma resposta imunológica eficaz (MERCURI et al., 2006; CARVALHO et al., 2010; KUPFERSCHMIDT et al., 2014). Outros estudos com a proteína bacteriana recombinante int1 $\beta$  de *Escherichia coli* e com a proteína BSA indicaram melhores propriedades adjuvantes da SBA-15 em relação aos adjuvantes de uso comercial baseados em Al(OH)<sub>3</sub> (MERCURI et al., 2006; CARVALHO et al., 2010).

A avaliação da citotoxicidade também é essencial para uso efetivo da SBA-15 com fins terapêuticos para garantir uma aplicação segura. Neste contexto, a toxicidade da SBA-15 (pura e funcionalizada) e da sílica amorfa foi avaliada em relação a alguns tipos de células (células promielocítica humana, leucemia linfoblástica de células T e células de fígado de rato) sendo



observado maior viabilidade das células tratadas com SBA-15 em relação as células tratadas com sílica amorfa (FERENC et al., 2016).



**Figura 6: Características carreadoras da SBA-15 para a entrega de proteínas.** A ilustração apresenta as principais características da SBA-15 que permitem o suporte e a entrega de proteínas subdivididas em duas categorias: propriedades intrapartícula relacionadas a características dos mesoporos e interações com as proteínas imobilizadas e as propriedades interpartícula relacionadas à superfície externa da SBA-15 e as interações com o ambiente. As propriedades intrapartículas incluem a melhora da estabilidade das proteínas, liberação controlada, a existência de uma barreira física com o meio fisiológico e a possibilidade de variação dos tamanhos de poros. As propriedades interpartículas estão relacionadas com a biocompatibilidade, entrega direcionada, alta estabilidade química e a rigidez da partícula de SBA-15.

Fonte: Traduzido de SIEFKER; KARANDE; COPPENS, 2014.

Embora a integridade estrutural seja importante para proteção do antígeno, no meio fisiológico o processo de degradação também é um fator essencial, pois a sílica deve ser eliminada pelo organismo (IZQUIERDO-BARBA et al., 2010; PARIS et al., 2017). Neste contexto, a eliminação completa do silício já foi observada em estudo com órgão de camundongos calcinados que receberam previamente administração intracutânea e oral de SBA-15 (MARIANO-NETO et al., 2014).

O potencial uso da SBA-15 como carreador para imunização por via oral caracteriza uma aplicação promissora. Devido à natureza não invasiva destas formulações, os riscos de infecções são diminuídos, e ainda há o benefício da redução em custos com insumos como agulhas e curativo,

descarte dos resíduos infectantes e a não necessidade de profissionais especializados para a aplicação (VELA RAMIREZ; SHARPE; PEPPAS, 2017). Os principais desafios atribuídos à imunização por via oral estão vinculados a proteção dos antígenos por uma rota através do trato gastrointestinal que, sobretudo, impõe condições físico-químicas adversas que podem degradar o antígeno, tais como a elevada acidez do estômago e a presença de enzimas digestivas (VELA RAMIREZ; SHARPE; PEPPAS, 2017).

Novos adjuvantes são importantes tanto para o desenvolvimento de novas vacinas como para melhorar a eficácia de vacinas já existentes. SCARAMUZZI et al. 2016 verificaram em estudos *in vivo* tal potencial para imunização via oral da SBA-15 após a incorporação de proteína recombinante do vírus da hepatite B (SCARAMUZZI et al., 2016). Outro estudo avaliou o encapsulamento da anatoxina diftérica com o mesmo objetivo (RASMUSSEN et al., 2021). Além dos parâmetros de adsorção comumente obtidos, também acessaram a estrutura da proteína imobilizada por métodos espectroscópicos como dicroísmo circular e fluorescência. Assim, observaram que a estrutura nativa foi conservada havendo eficácia do imunológico para aplicação por via oral.

Dado que a forma funcional da proteína deve ser mantida quando na matriz porosa da SBA-15, os métodos de análises para caracterização estrutural de proteínas são essenciais para acessar tal informação de forma indireta. Em suma, muito embora as propriedades carreadoras e protetoras da SBA-15 já sejam conhecidas, estudos com este tipo de sistema continuam sendo muito relevantes em função das particularidades do processo de adsorção e desafios relacionados à entrega direcionada (SIEFKER; KARANDE; COPPENS, 2014). Assim, o uso de proteínas-modelo para este fim é o ideal, visto o conhecimento estrutural detalhado já previamente adquirido acerca destes modelos, e sobretudo porque antígenos são frequentemente obtidos em quantidades reduzidas e com custo mais elevado do que muitas proteínas comerciais.

### 1.3 Objetivos

#### 1.3.1 Objetivos gerais

Devido ao potencial uso da SBA-15 como veículo protetor para biomoléculas e novo adjuvante para vacinas, este trabalho propõe estudar os sistemas híbridos de proteína e SBA-15 resultantes da incorporação individual de três proteínas-modelo representantes de diferentes classes hierárquicas de estruturas proteicas (toda- $\alpha$ , toda- $\beta$  e com elevado conteúdo não ordenado).

#### 1.3.2 Objetivos específicos

Com base no elevado interesse e possibilidade de imunização por via oral, em diversas etapas deste estudo foram selecionadas as condições de pH e temperatura previstas para uma rota gastrointestinal.

O presente trabalho foi subdividido em três eixos: os dois primeiros descrevem a caracterização dos sistemas individuais (proteínas e SBA-15) e, na sequência, foi o realizado o estudo dos compósitos (híbridos de proteína e SBA-15) conforme as etapas experimentais a seguir:

- I. Caracterização dos três sistemas proteicos:
  - Avaliação da estrutura secundária das proteínas com ensaios de dicroísmo circular convencional (CD, *Circular Dichroism*) e com radiação síncrotron (SRCD, *Synchrotron Radiation Circular Dichroism*) em soluções aquosas, bem como, ensaios em filmes parcialmente desidratados;
  - Monitoramento do ambiente químico dos resíduos aromáticos das proteínas em solução aquosa por espectroscopia de fluorescência;
  
- II. Preparação do sistema mesoporoso do tipo SBA-15 e posterior caracterização morfológica, estrutural e textural com as técnicas: SEM (*Scanning Electron Microscopy*), SAXS (*Small Angle X-Ray Scattering*) e NAI (*Nitrogen Adsorption Isotherm*);

- III. Incorporação individual das proteínas Mioglobina (Mb), Concanavalina A (ConA) e Inibidor de Tripsina de Soja (STI) em partículas de SBA-15:
- Reavaliação os parâmetros estruturais e texturais da SBA-15 após a incorporação com as técnicas de SAXS e NAI;
  - Estudo do comportamento térmico dos compósitos com as técnicas de termogravimetria (TG, *Thermogravimetry*) e calorimetria diferencial de varredura (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*);
  - Avaliação estrutural das proteínas imobilizadas em SBA-15 com as técnicas de CD e espectroscopia de infravermelho (FTIR, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*);
  - Estudo o ambiente químico das proteínas incorporadas em SBA-15 por meio de ensaios de espectroscopia de fluorescência após obter os compósitos em solução aquosa;

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 Proteínas-modelo utilizadas

As três proteínas estudadas foram adquiridas da Sigma Aldrich (MERCK) com elevado grau de pureza e liofilizadas sendo, para o presente trabalho, consideradas proteínas-modelo para as respectivas estruturas secundárias predominantes, conforme indicado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Proteínas, fontes de obtenção e estrutura secundária predominante

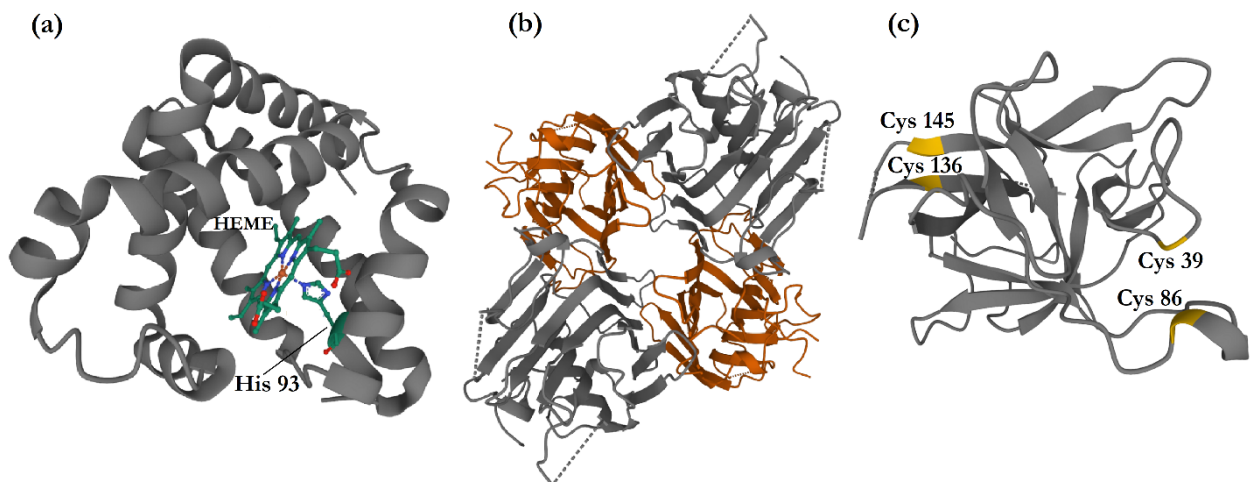
<i>Proteína</i>	<i>Fonte de obtenção</i>	<i>Estrutura secundária predominante</i>
Mioglobina (Mb)	Músculo esquelético de equino	<i>Hélice-<math>\alpha</math></i>
Concanavalina A (ConA)	<i>Canavalia ensiformes</i> (feijão-de-porco)	<i>Fitas-<math>\beta</math></i>
Inibidor de Tripsina de Soja (STI)	<i>Glycine max</i> (soja)	<i>Não ordenada</i>

Algumas características vantajosas fizeram parte dos critérios de escolha das proteínas avaliadas tais como suas dimensões relativamente pequenas para, a princípio, adentrar nos mesoporos da SBA-15, estruturas cristalográficas resolvida já depositadas no PDB, além de inúmeros estudos biofísicos reportados na literatura. A primeira delas, a mioglobina (Mb), é uma hemoproteína da família das globinas que desempenha funções em cardiomiócitos e células musculares relacionadas ao armazenamento de O<sub>2</sub>, transporte de O<sub>2</sub> por difusão facilitada e processos reguladores de níveis de O<sub>2</sub> e NO nas células (WITTENBERG; WITTENBERG, 1989; ORDWAY; GARRY, 2004).

A Mb é um monômero globular (17 kDa) com dimensão aproximada de 4,5 x 3,5 x 2,5 nm (BOS et al., 1994) cuja cadeia polipeptídica apresenta 153 resíduos de aminoácidos (35% carregados, 14% polares e 51% apolares). A Mb foi a primeira proteína a ter sua estrutura tridimensional determinada com resolução atômica (KENDREW et al., 1958). Estruturalmente, é constituída por 8 hélices- $\alpha$  que são conectadas por pequenos segmentos da cadeia (*voltas*), além da presença de um único grupo prostético heme (grupo ferro-protoporfirina) (ORDWAY; GARRY, 2004), conforme a representação na Figura 7(a).

Concanavalina A (ConA), membro da família das lectinas de leguminosas, é uma proteína com afinidade por carboidratos (CHOWDHURY; WEISS, 1975; I. J. GOLDSTEIN, C. E. HOLLERMAN, 1965). O monômero (25,5 kDa) é constituído de 237 resíduos de aminoácidos (21% carregados, 32% polares e 47% apolares) com dimensões aproximadas de 4,2 x 4,0 x 3,9 nm e presença de dois sítios de ligação a íons metálicos ( $Mn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ) em seu estado de origem (CHOWDHURY; WEISS, 1975). Em solução com pH abaixo de 6,5 encontra-se na forma de um homodímero, mas em pH acima de 6,8 como homotetrâmero (LÓPEZ-JARAMILLO et al., 2004). A ConA apresenta estrutura predominantemente em conformações do tipo- $\beta$  conforme a representação da Figura 7 (b) onde cada monômero apresenta arquitetura do tipo sanduíche- $\beta$ .

O inibidor de tripsina de soja (STI), encontrado nas sementes de soja (*Glycine max*), age reduzindo a atividade da enzima proteolítica tripsina devido à formação de um complexo estável com esta proteína (SAVAGE; MORRISON, 2003). Com dimensões aproximadas 4,5 x 4,2 x 4,0 nm, o STI apresenta massa molar em torno de 20 kDa, alto conteúdo não ordenado (não canônico), baixo conteúdo em hélices (quase ausente) e a presença de 6 pares de fitas- $\beta$  antiparalelas (KUNITZ, 1946; SONG; SUH, 1998). A cadeia polipeptídica contém de 181 resíduos de aminoácidos (28% carregados, 20% polares e 52% apolares) com duas pontes de dissulfeto entre resíduos de cisteínas (Cys 39 e Cys 86 ; Cys 136 e Cys 145) que estabilizam sua conformação, destacadas em amarelo na Figura 7 (c) (KUNITZ, 1946; SONG; SUH, 1998).



**Figura 7: Representação das estruturas secundárias para as três proteínas-modelo.** (a) Estrutura secundária da Mb (em cinza) em sua forma deoxi (PDBID: 5D5R) com destaque para a interação entre o grupo heme e a cadeia R do resíduo histidina (His 93); (b) (b) estrutura secundária da ConA (PDBID: 1APN) em sua forma oligomérica (homotetrâmero) destacando os monômeros (em cinza e marrom) e (c) estrutura secundária (em cinza) do STI (PDBID: 1AVU) destacando os resíduos de cisteína (Cys, em amarelo) que possibilitam a formação de ligações de dissulfeto entre os resíduos Cys 145 e Cys 136 e entre Cys 39 e Cys 86.

### 2.1.2 Reagentes e soluções

As soluções tampão fosfato de sódio pH 2,2 e pH 7,0 foram preparadas a partir da mistura de concentrações equimolares ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e, de concentrações equimolares de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , respectivamente.

Todas as soluções aquosas de proteínas foram preparadas por reidratação das proteínas liofilizadas, sem etapas extras de purificação. A cada novo preparo, as concentrações das soluções foram aferidas no espectrofotômetro NanoDrop One (ThermoFisher) com as leituras de absorção na região do UV-visível. Soluções contendo a proteína ConA ( $\epsilon = 32,43 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) ou STI ( $\epsilon = 17,21 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) foram avaliadas por medidas de absorção em 280 nm. Já as concentrações de soluções contendo a proteína Mb foram determinadas pela absorção em 205 nm considerando  $\epsilon = 31 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (ANTHIS; CLORE, 2013).

Para a síntese da SBA-15, os seguintes reagentes foram utilizados: solução  $2 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido clorídrico (HCl, 37 %, Sigma Aldrich); copolímero tribloco Pluronic P123 ( $\text{EO}_{20}\text{-PO}_{70}\text{-EO}_{20}$ , MM: 5800 g/mol, Sigma Aldrich); tetraetilortossilicato (TEOS, 98 % de pureza, Sigma Aldrich), álcool etílico (P.A, Synth). Nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ,  $2 \text{ mol L}^{-1}$ , Synth) e ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ , Synth) foram utilizados para o teste de cloreto nas águas de lavagem da SBA-15. Todos os reagentes utilizados foram de grau PA.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Síntese da SBA-15

As partículas de SBA-15 foram sintetizadas segundo o método descrito por Zhao e colaboradores (1998) (ZHAO et al., 1998a, 1998b). O procedimento de síntese foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Tereza S. Martins no Laboratório de Materiais Híbridos (LMH) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

O processo de síntese da SBA-15 é subdividido em três etapas:

- (i) Adição do Pluronic em solução ácida e adição do TEOS;
- (ii) Tratamento hidrotérmico;
- (iii) Remoção do molde;

A primeira etapa da síntese foi iniciada com a adição de 4,0 g de Pluronic P123 em 120 mL de solução de HCl com acréscimo de 30 mL de água deionizada. A solução resultante foi mantida em agitação magnética por 1 h em temperatura ambiente.

Em seguida, 8,9 mL do precursor de sílica (TEOS) foram lentamente adicionados. Após a completa adição, a mistura foi mantida em agitação magnética vigorosa a 40 °C durante 24 h. O tratamento hidrotérmico foi iniciado com a transferência da amostra para uma autoclave revestida de teflon que foi mantida na estufa a 100 °C por 48 h. Após o resfriamento em temperatura ambiente, o material passou pelos processos de filtração e lavagem com água deionizada. Durante o procedimento da lavagem da amostra, foram realizados diversos testes de verificação da presença de íons H<sup>+</sup> utilizando nitrato de prata em meio ácido (HNO<sub>3</sub>) até que se verificasse a completa eliminação de íons cloreto da amostra.

A remoção do copolímero P123 foi realizada por dois métodos de extração distintos, são eles: extração com solvente orgânico e calcinação. Inicialmente, uma parcela do copolímero P123 foi extraída utilizando um sistema de extração simples. A amostra de SBA-15 foi transferida para um béquer contendo 200 mL de etanol em agitação por 4 h. Na sequência, o material foi filtrado e lavado com etanol e mais um ciclo deste procedimento foi aplicado. Este processo possibilita a reutilização do copolímero P123, diminui a perda de grupos silanóis da superfície da SBA-15, além de evitar modificações estruturais que podem ocorrer em processos prolongados de calcinação (DE ÁVILA; SILVA; MATOS, 2016).

Em seguida, a amostra foi transferida para um dessecador para secagem e, posteriormente, calcinada com a razão de aquecimento 5 °C/min em atmosfera de ar por 2 h a 540°C. Este protocolo de síntese resultou em 2,0 g de amostra na forma de pó denominada SBA-15 que foram armazenadas em temperatura ambiente.

### 2.2.2 Incorporação das proteínas em SBA-15

As proteínas (Mb, ConA e STI) foram incorporadas em partículas de SBA-15 individualmente. Este procedimento foi realizado incubando a proteína em solução aquosa com as partículas de sílica, em duas proporções de sílica/proteína diferentes: 10:1 e 5:1, em massa, conforme a metodologia descrita em trabalhos realizados por GARCIA et al., 2016, MERCURI et al., 2006 e FERENC et al., 2016.



Inicialmente, a SBA-15 sintetizada passou por um processo de ativação de sua superfície para a remoção de moléculas de água ou impurezas adsorvidas. Neste processo, a amostra foi aquecida a 180 °C durante 2 h e transferida para o dessecador onde foi mantida a pressão reduzida por 1 h. Na sequência, 15,0 mg e 30,0 mg de cada proteína liofilizada foram pesadas e solubilizadas individualmente em béqueres contendo 5,0 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,0). Em cada uma das soluções proteicas foram adicionadas 150,0 mg de SBA-15. A mistura resultante foi mantida sob agitação magnética durante 24 h em temperatura ambiente (25 °C) para promover a interação entre proteína e sílica. Após esse período, as amostras foram colocadas na estufa a  $35 \pm 2$  °C para a eliminação do solvente (água) por evaporação por 22 h.

O protocolo descrito resultou na preparação de seis compósitos (híbridos de proteína e SBA-15) distintos, com o rendimento aproximado de 200 mg que foram estocadas a 25 °C. Uma amostra controle, que corresponde a partículas de SBA-15 incubada apenas com a solução tampão foi preparada sob as mesmas condições. As amostras geradas pelos processos de síntese e incorporação foram nomeadas conforme a Tabela 2.

**Tabela 2:** Nomenclatura das amostras geradas após o processo de síntese e incorporação das proteínas em SBA-15 indicando a proporção de sílica: proteína (10:1 ou 5:1, em massa) nos compósitos.

Composição	Nomenclatura das amostras	
SBA-15 sintetizada	SBA-15	
SBA15 + solução tampão fosfato (amostra controle)	SBA15T	
SBA15 + mioglobina	Mb 10:1	Mb 5:1
SBA15 + concanavalina A	ConA 10:1	ConA 5:1
SBA15 + inibidor de tripsina de soja	STI 10:1	STI 5:1

### 2.2.3 Técnicas experimentais

#### 2.2.3.1 Espalhamento de raios X a baixos ângulos

O espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) (GUINIER, A. & FOURNET, 1955) é uma técnica bastante utilizada para a caracterização de sistemas nanoestruturados, tais como as SMO e as proteínas. Para as medidas, um feixe de raios X é aplicado sobre a amostra e, devido à interação com os elétrons desta amostra, a radiação é espalhada. No SAXS, os fótons espalhados de forma elástica são coletados sob baixíssimos ângulos de espalhamento ( $2\theta$ ). Entretanto é bastante comum apresentar a intensidade de espalhamento ( $I$ ) em função do vetor de espalhamento  $q$  (em  $\text{\AA}^{-1}$  ou  $\text{nm}^{-1}$ ) dado pela Equação 1, onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação incidente sobre a amostra.

$$q = \frac{4\pi \sin(\theta)}{\lambda} \quad (1)$$

Neste trabalho, todos os ensaios com SAXS foram realizados no equipamento multiusuário Xeuss 1.0 (Xenocs) disponível no Laboratório de Fluidos Complexos do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP). As medidas foram feitas utilizando uma fonte de raios X (*GeniX*) com alvo de cobre ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) e detector *Pilatus 300k* (*Dectris*).

##### 2.2.3.1.1 Estudos de SAXS para proteínas em solução aquosa

A técnica de SAXS possibilita acessar a estrutura terciária e quaternária das proteínas, assim, a forma global e o tamanho destas moléculas podem ser investigadas, bem como o seu estado oligomérico (MERTENS; SVERGUN, 2010; DA VELA; SVERGUN, 2020). Também é possível estudar a evolução de sistemas em função do tempo, tais como processos de oligomerização e formação de agregados (OLIVEIRA et al., 2009; VETRI et al., 2013).

Os parâmetros globais, raio de giro ( $R_G$ ) e a intensidade direta  $I(q=0)$ , podem ser obtidos diretamente da curva de espalhamento. Para partículas com simetria esférica, a aproximação de Guinier pode ser utilizada para a determinação destes parâmetros, conforme a Equação 2 (GUINIER, A. & FOURNET, 1955). A estimativa é feita por um ajuste linear no gráfico de  $\ln(I(q))$

versus  $q^2$  válido na região que satisfaz  $R_G \cdot q < 1,3$ , onde  $R_G$  e  $I(0)$  são calculados pela determinação do coeficiente angular e linear da reta ajustada, respectivamente .

$$\ln(I(q)) \cong \ln(I(0)) - \frac{R_G^2 q^2}{3} \quad (2)$$

O parâmetro  $R_G$  corresponde a uma relação de distribuição dos centros espalhadores em relação ao centro da partícula e, portanto fornece a uma estimativa de tamanho, enquanto que a intensidade  $I(0)$  pode ser utilizada para a determinação da massa molecular das proteínas. A Equação 3 expressa uma maneira para determinar a massa molecular (MM, em Da) para dados na escala absoluta ( $\text{cm}^{-1}$ ), sendo  $N_A$  a constante de Avogadro,  $c$  a concentração da proteína (em  $\text{mg/mL}$ ) e  $\Delta\rho_m$  a densidade de comprimento de espalhamento em excesso por unidade de massa (OLIVEIRA, 2011).

$$MM = \frac{I(0) N_A}{c(\Delta\rho_m)^2} \quad (3)$$

Análises do  $R_G$  e MM também permitem avaliar o estado oligomérico da proteína e a presença de estados agregados/aglomerados que se formam quando há forte interação entre as moléculas do sistema. Outras informações sobre tamanho, forma global da proteína e também sobre a evolução do sistema podem ser obtidas pela análise da forma da Função de Distribuição de Distâncias ( $P(r)$ ) (GLATTER, 1977). A função  $P(r)$  descreve uma distribuição de pares de distanciamentos entre centros espalhadores dentro do volume da partícula. Esta função é obtida com a transformada de Fourier indireta (IFT, *Indirect Fourier Transform*) aplicada à intensidade de espalhamento  $I(q)$ . As relações entre  $I(q)$  e  $P(r)$  são mostradas nas Equações 4 e 5 onde  $D_{\max}$  (diâmetro máximo) corresponde à máxima distância observada no volume da partícula (PILZ; GLATTER; KRATKY, 1979).

$$P(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty \frac{q^2 I(q) \sin(qr)}{qr} dq \quad (4)$$

$$I(q) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} P(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (5)$$

As curvas de espalhamento das proteínas foram coletadas a 25 °C em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0) sob a concentração de 6 mg/mL. Também foram feitas medidas após a adição de 75 mmol L<sup>-1</sup> e 150 mmol L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio (NaCl) na composição da solução tampão original. Os dados foram tratados segundo subtração das curvas de espalhamento do capilar de vidro vazio e solução tampão nas mesmas condições da amostra. Os dados também foram convertidos para a escala absoluta utilizando a água como padrão de normalização.

#### 2.2.3.1.2 Estudos de SAXS aplicado à sílica mesoporosa ordenada

A curva de SAXS da SBA-15 apresenta um padrão com picos característicos que resultam da interferência construtiva da radiação espalhada por sua estrutura. Este padrão tem origem na diferença na densidade eletrônica entre a parede de sílica e os mesoporos especialmente dispostos em uma rede ordenada (FLODSTRÖM et al., 2004; SUNDBLÖM et al., 2009) e pode ser avaliado com base na lei de Bragg (BRAGG; BRAGG, 1913) dada pela Equação 6 para ângulos  $\theta$  pequenos, onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação incidente;  $d$  é a distância interplanar,  $n$  é um número inteiro que indica a ordem da difração.

$$n \lambda = 2d \operatorname{sen}(\theta) \quad (6)$$

A caracterização com SAXS possibilita a determinação do parâmetro de rede ( $a$ ) e as distâncias interplanares ( $d_{(hkl)}$ ) que descrevem a estrutura de poros da SBA-15. A relação entre as distâncias interplanares e o vetor de espalhamento  $q_{(hkl)}$  é dada pela Equação 7, onde (hkl): (100), (110), (200), (210) e (300) são planos cristalográficos indexados pelos índices de Miller para uma rede hexagonal bidimensional que, tipicamente, são identificados na curva de SAXS da SBA-15. Já o parâmetro de rede está relacionado às distâncias interplanares pela Equação 8 (CULLITY, 1978).

$$d_{(hkl)} = 2\pi/q_{(hkl)} \quad (7)$$

$$\frac{1}{d_{(hkl)}^2} = \frac{4}{3} \frac{(h^2 + hk + k^2)}{a^2} \quad (8)$$

Neste trabalho, as curvas de SAXS foram obtidas para todas as amostras contendo SBA-15. As medidas foram feitas com as amostras em forma pó a 22 °C, sob pressão reduzida e distância detector-amostra de 0,83 m. Os dados foram tratados segundo a subtração da curva de espalhamento gerada por uma camada dupla de filmes de poliamida (Kapton, 4 µm) e ruído de fundo no detector.

### 2.2.3.2 Isotermas de adsorção de nitrogênio (NAI)

Análises de NAI registram o fenômeno de adsorção física (ou fisissorção) que ocorre quando moléculas de um gás como o nitrogênio são transferidas para uma superfície de um sólido denominado adsorvente, sendo o conteúdo adsorvido denominado adsorvato (SING, 1982). Este fenômeno ocorre de forma reversível, não localizada e, por definição, não são estabelecidas interações químicas de natureza covalente entre as espécies envolvidas (ROUQUEROL; ROUQUEROL; SING, 1999). Medidas de NAI são amplamente utilizadas na caracterização textural de sólidos porosos como a SBA-15, pois viabilizam estimar a área superficial específica, o volume e a distribuição de tamanhos de poros (SING, 1982; CHOMA; JARONIEC, 2007; THOMMES et al., 2015).

As principais etapas observadas na adsorção nos mesoporos correspondem à formação de monocamada onde as moléculas do adsorvato estão em contato direto com a superfície sólida e uma fase de acumulação caracterizada pela formação de filmes multicamadas. Conforme a adsorção em multicamadas vai ocorrendo, os poros são preenchidos. Este processo leva à condensação do gás adsorvido por um mecanismo denominado *condensação capilar*. Já na fase de dessorção (processo inverso em que o adsorvato é reduzido), um comportamento distinto da fase anterior pode ser identificado levando à formação um *loop* de *histerese* de ocorrência muito comum em materiais mesoporosos como a SBA-15 (SING, 1982; THOMMES, 2004).

As medidas de NAI ocorrem em duas etapas consecutivas: degaseificação e análise. A primeira etapa trata-se de um tratamento de superfície preliminar para reduzir a umidade e impurezas. Inicialmente, a amostra do adsorvente (neste trabalho, todas as amostras contendo SBA-15) é transferida e encerrada em um porta-amostra de volume conhecido onde é submetida à pressão reduzida em temperatura controlada.

A etapa seguinte trata-se da leitura das isotermas propriamente. As medidas são realizadas em baixas temperaturas (-196,15 °C) por meio do contato do porta-amostra com um banho contendo nitrogênio na fase líquida. As isotermas registram a quantidade de nitrogênio adsorvida na amostra (em cm<sup>3</sup>/g) em função da pressão relativa de equilíbrio ( $p/p_0$ ) que é atingida a cada admissão de gás nitrogênio no sistema, onde  $p_0$  é a pressão de saturação do gás nitrogênio na temperatura do banho (SING, 1982; THOMMES et al., 2015).

Neste trabalho, as amostras foram analisadas com o porosímetro modelo ASAP 2020 (Micromeritics) localizado no Laboratório de Cristalografia (LCr) do Instituto de Física da Universidade São Paulo. Cada ensaio foi realizado com 100 mg de amostra. O processo de degaseificação foi realizado a 180 °C para a SBA-15 pura e a 35 °C para amostras com conteúdo biológico. As isotermas foram registradas por 48 h utilizando gás nitrogênio de 99,999% de pureza.

As curvas experimentais foram avaliadas com o método desenvolvido por BRUNAUER et al. 1938 (BET) para a determinação da área superficial ( $S_{BET}$ ). A estimativa do volume e da distribuição de tamanho de poros foi realizada pelos métodos BJH (BARRETT; JOYNER; HALENDA, 1951) com as correções do método KJS (KRUK; JARONIEC; SAYARI, 1997). O cálculo da espessura da parede de sílica ( $b$ ) foi determinado conforme a Equação 9 (KRUK; JARONIEC, 1999) onde  $a$  é o parâmetro de rede obtido com a técnica de SAXS e  $D$  é o diâmetro médio de poros determinado pelo método BJH.

$$b = a - D \quad (9)$$

### 2.2.3.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é frequentemente utilizada para a caracterização química de amostras por meio da identificação das bandas de absorção relacionadas à vibrações moleculares específicas (ROBERT M. SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Na região do infravermelho médio (4000-400 cm<sup>-1</sup>), as bandas registradas têm origem na absorção de fótons com energia suficiente para promover alterações nos estados rotacionais-vibracionais das ligações atômicas das espécies químicas na amostra (ROBERT M. SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Os espectros de FTIR registram a

intensidade de absorção em absorbância (A em %) ou transmitância (T em %) em função do número de onda (tipicamente em  $\text{cm}^{-1}$ ) que é proporcional a energia do fóton absorvido.

Os espectros de FTIR foram obtidos com o espectrômetro modelo IRPrestige-21 (Shimadzu) localizado no Laboratório LMH da UNIFESP com o acessório de refletância difusa (MITCHELL, 1993) modelo DRS-8000A (Shimadzu). Este acessório permite o preparo de amostras sólidas (em pó) sem a necessidade de prensas. As amostras em pó foram diluídas em brometo de potássio (KBr) a 25 °C. Os espectros gerados no modo absorbância com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 256 varreduras foram tratados segundo a subtração do espectro correspondente ao KBr, correção da linha de base e normalização.

#### 2.2.3.4 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A metodologia de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) avalia a diferença de absorção de luz circularmente polarizada à direita e à esquerda que ocorre ao passar por moléculas contendo centros quirais, tais como as proteínas e os peptídeos. Na região do UV-distante (190 - 250 nm), o principal cromóforo para o CD aplicado ao estudo de proteínas refere-se ao carbono quiral alfa ( $C_\alpha$ ) presente na cadeia polipeptídica (KELLY; PRICE, 2005; WALLACE; JANES, 2009).

A espectroscopia de CD é amplamente utilizada para a caracterização estrutural de proteínas, pois possibilita identificar e estimar os percentuais dos elementos estruturais canônicos (hélices- $\alpha$ , fitas- $\beta$ , voltas) e intrinsecamente desordenados que compõem a estrutura secundária. A técnica também permite investigar alterações conformacionais em função da temperatura aplicada na amostra ou por outras modificações no meio, como o tipo solvente, pH, etc (W. CURTIS JOHNSON, 1988; KUMAGAI; ARAUJO; LOPES, 2017).

Nos equipamentos convencionais, a intensidade do sinal de CD ( $\theta$ ) que chega aos detectores é registrada (tipicamente em miligráus) em função do comprimento de onda  $\lambda$  de absorção (em nm). Para eliminar o efeito da concentração permitindo análises comparativas entre espectros, pode-se converter os dados para a unidade  $\Delta\epsilon$  (em  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ) conforme a Equação 10:

$$\Delta\epsilon = \theta \cdot \frac{0,1 MRW}{c \cdot l 32998} \quad (10)$$

Onde  $c$  é a concentração em mg/mL,  $l$  é o caminho ótico da cubeta (em cm) e MRW (*Mean Residue Weight*) expressa uma relação entre a massa molecular da proteína (MM em Da) e  $n$  número de resíduos de aminoácidos dada por  $MRW = MM/(n-1)$ .

#### 2.2.3.4.1 Proteínas em solução aquosa

##### 2.2.3.4.1.1 Efeitos da temperatura e pH

Os ensaios com CD convencional com as proteínas em solução aquosa (0,2 mg/mL) foram realizados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e/ou no Grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, em ambos com o espectropolarímetro modelo J-815 (Jasco). Em cada medida, um total de seis varreduras foram coletadas individualmente no intervalo de 280 - 185 nm com passos de 1 nm em cubetas retangulares de quartzo de 1,0 mm de caminho ótico, tempo de integração de 2,0 s e velocidade de varredura em 50 nm/min. Os espectros foram coletados em pH 7,0 e pH 2,2, em temperaturas de 25 °C ou 37 °C.

Embora amplamente utilizada, a técnica de CD convencional apresenta algumas limitações em decorrência da baixa luminosidade da fonte luz nos espectropolarímetros convencionais, presença de aditivos nas amostras, presença de centros espalhadores, etc (LEES; WALLACE, 2002; WALLACE, 2009). Para superar as limitações dos equipamentos convencionais, as caracterizações estruturais das três proteínas foram também realizadas com o método de dicroísmo circular com radiação síncrotron (SRCD).

Ensaio de SRCD foram realizados no laboratório de luz síncrotron ASTRID2, na linha AU-CD do *Institute of Storage Ring Facilities, Aarhus University* na Dinamarca pelo Prof. Dr. José Luiz Lopes. O efeito da temperatura na estrutura das proteínas foi investigado obtendo as curvas de desnaturação térmica que foram avaliadas em pH 7,0 e pH 2,2 no intervalo de 10 °C a 90 °C em intervalos de 10 °C, permitindo 5 min de equilíbrio térmico antes de medir cada espectro. Os espectros foram coletados no intervalo de 280 - 170 nm em cubetas cilíndricas de quartzo de 100  $\mu$ m de caminho ótico.

Todos os espectros de CD e SRCD foram processados com o *software* CDTToolX (LEES et al., 2004) que fornece a média dos espectros individuais, realiza a subtração das contribuições do



espectro da solução tampão nas mesmas condições e zera os espectros na região de 265 - 270 nm, além de converter a unidade do sinal  $\theta$  (originalmente em miligraus) para a unidade  $\Delta\epsilon$  ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) para eliminação do efeito da concentração utilizando os valores de MRW de 111,5; 108,6 e 111,6, para a Mb, a ConA e a STI, respectivamente.

Como controle, para avaliar os limites de temperatura e condições adequadas usadas no procedimento de incorporação, cada proteína foi incubada a 40 °C em tampão fosfato (pH 7,0). Os respectivos espectros foram coletados antes (a 25 °C) e após a incubação por 16 h com SRCD e por 24 h com CD.

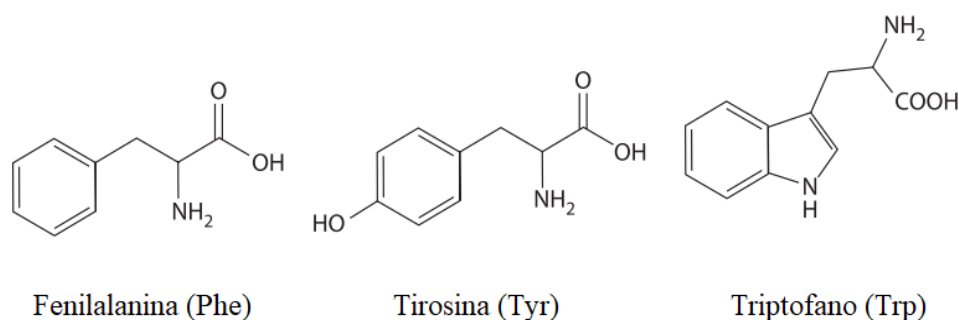
#### 2.2.3.4.2 Estudo de SRCD em filmes proteicos semidesidratados

Um filme proteico foi formado na superfície das placas de quartzo com cada uma das proteínas investigadas. Alíquotas (20  $\mu\text{L}$ ) de cada uma das proteínas, nas mesmas condições mencionadas anteriormente, foram depositadas sobre as placas, vagarosamente espalhadas na superfície e levadas, a um dessecador por 16 horas para promover a evaporação do solvente e formação do filme semidesidratado sobre a placa. As placas circulares de Suprasil-quartzo (Hellma Analytics) foram utilizadas para simular um ambiente cuja química de superfície (grupo O-H) e o grau de hidratação estão mais próximos ao das proteínas imobilizadas em SBA-15.

Para a averiguação do comportamento de cada proteína adsorvida na superfície destas placas, as placas foram acopladas e fixadas em suportes de cobre, preparados para se encaixarem no porta-amostras do espectropolarímetro e tiveram seus espectros de SRCD coletados na região de 280-150 nm, em intervalos de 1 nm, a 25 °C. Após cada varredura, foi promovida uma variação angular de 90° nos suportes (e conseqüentemente na placa), e tomando nova varredura, de modo que em cada medida realizou-se um total de 4 posições angulares distintas (0, 90, 180 e 270°) em cada proteína. Os espectros gerados nestas condições foram normalizados utilizando o valor correspondente para a intensidade do pico em 222 nm de cada proteína quando em solução aquosa, devido à impossibilidade de determinação da concentração das proteínas adsorvida no filme com a técnica.

### 2.2.3.5 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência (JAMESON, 2014) é uma técnica biofísica muito usada no estudo de proteínas que se baseia na emissão de fótons via transição entre os estados eletrônicos excitados e o estado fundamental de menor energia. As proteínas podem conter fluoróforos intrínsecos, os aminoácidos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) cujas estruturas químicas são apresentadas na Figura 8. Pequenas mudanças conformacionais envolvendo, em particular o triptofano, e/ou suas vizinhanças, promovem diferenças no espectro de emissão de fluorescência, no rendimento quântico ou no deslocamento do máximo de emissão. Dessa forma, é possível monitorar alterações no ambiente químico localizadas na microvizinhança do Trp quando em diferentes condições.



**Figura 8: Estrutura química dos fluoróforos intrínsecos em proteínas.** Representação dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Fonte: Adaptado e traduzido de JAMESON, 2014

As medidas de fluorescência intrínseca dos resíduos aromáticos das proteínas investigadas em solução aquosa foram tomadas no fluorímetro ISS K2 (*ISS, Fluorescence, Analytical and Biomedical Instruments*), no modo estático, do IFSC/USP em cubetas de quartzo de 1,0 cm. Todas as amostras foram excitadas em 280 nm e 295 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 300 - 450 nm. Os espectros de fluorescência das proteínas foram tomados em solução tampão de pH 7,0 ou pH 2,2 a 25 °C ou a 37 °C. Como controle do processo de incorporação, foram coletados os espectros de fluorescência antes e após a incubação de cada proteína a 40 °C por 24 h em solução tampão pH 7,0. Para monitorar as proteínas imobilizadas em SBA-15 foram tomados os espectros de fluorescência das amostras contendo 0,1 mg/mL de cada composto nas mesmas condições das proteínas puras (pH 7,0 e pH 2,2 a 25 e 37 °C). As amostras foram mantidas sob agitação magnética constante para atenuar o efeito da decantação da sílica.

### 2.2.3.6 Análise térmica

Neste trabalho, duas técnicas foram utilizadas para avaliar o comportamento térmico das amostras: a termogravimetria (TG) e a calorimetria diferencial de varredura (DSC) (WENDLANDT, 1986). As análises termogravimétricas baseiam-se na identificação dos eventos térmicos que vão ocorrendo devido ao aumento de temperatura aplicado na amostra. As curvas registram a variação do peso inicial das amostras ao longo do experimento em função da temperatura ou do tempo. Com as curvas de TG também é possível calcular a temperatura extrapolada ( $T_{onset}$ ) que marca o início de um dado evento térmico. Outro recurso de análise é a chamada DTG (*Derivative thermogravimetry*) que corresponde à primeira derivada da curva de termogravimetria em relação à temperatura. As curvas DTG são comumente utilizadas como auxílio na identificação dos eventos térmicos e dos intervalos de temperatura em que ocorrem.

A técnica de DSC registra o fluxo de calor na amostra em relação a um referencial em função da temperatura ou do tempo, dessa forma, pode-se estimar a energia absorvida (evento endotérmico) ou liberada (evento exotérmico) durante um evento térmico através do cálculo da variação de entalpia ( $\Delta H$ ). Estas estimativas são realizadas por meio da integração da área dos picos observados no perfil de DSC.

As análises de TG e DSC constituem uma ferramenta poderosa para avaliar o perfil térmico das amostras preparadas. Em conjunto, podem indicar a estabilidade térmica das amostras e o estabelecimento de interações entre sílica e proteína (CHRZANOWSKA; DERYLO-MARCZEWSKA, 2019). Neste trabalho, o perfil térmico de todas as amostras em estado sólido (proteínas liofilizadas, SBA-15 e compósitos) foi avaliado. Para fins comparativos, as mesmas análises foram realizadas com os sais da solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0) usada no procedimento de incorporação que foram obtidos após a evaporação de 100 mL da solução a 80 °C.

As curvas de TG e DSC foram obtidas com a termobalança modelo SDT 650 (T.A. Instrument) que possibilita medidas simultâneas para ambas as técnicas. Tais medidas foram realizadas em cadinho de alumina e platina. Contudo, neste trabalho, apresentamos as curvas de DSC obtidas com cadinho de alumina em virtude de uma melhor definição para os eventos térmicos observados nesta condição e as curvas de TG obtidas com cadinho de platina que são mais indicados para a análise dos resíduos.

Os ensaios em cadinho de platina (110  $\mu\text{L}$ ) foram realizados com 5,0 mg de amostra sob atmosfera dinâmica de ar sintético (100 mL  $\text{min}^{-1}$ ). As medidas iniciaram a partir da temperatura ambiente no forno  $\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  até  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$  com razão de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . As medidas de em cadinho de alumina foram obtidas no intervalo de  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$  incluindo uma etapa de estabilização a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes da leitura da rampa. Os demais parâmetros foram fixados conforme as medidas em cadinho de platina. Todos os cálculos e análises foram realizados utilizando o *software* TRIOS (versão v5.1.1.46572, *T.A. Instrument*).

#### 2.2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura

A avaliação morfológica das partículas de SBA-15 foi realizada com a técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM) que possibilita a obtenção de imagens que podem revelar a superfície das amostras. Com esta técnica, as imagens são geradas conforme um feixe de elétrons de alta energia (1 - 30 keV) percorre de forma controlada a superfície da amostra. Com a varredura, os elétrons do feixe incidente interagem com os átomos da amostra, assim, as radiações que emergem destas interações podem ser detectadas, tais como elétrons secundários, elétrons retroespalhados e raios X característico (GOODHEW; HUMPHREYS; BEANLAND, 2000).

O tipo de informação obtida depende da natureza do sinal gerado na interação. Por exemplo, os elétrons secundários (10 - 50 eV) são provenientes da interação do feixe com os átomos mais superficiais da amostra. Assim, conforme as variações na intensidade no sinal são computadas durante a varredura da superfície, imagens são simultaneamente geradas apresentando as características topográficas da amostra neste caso (GOODHEW; HUMPHREYS; BEANLAND, 2000).

Neste trabalho, as imagens de SEM para a análise da superfície da SBA-15 sintetizada foram obtidas no equipamento JEOL, modelo JSM-6610LV do Núcleo de Instrumento para Pesquisa e Ensino (NIPE) da Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema. As amostras na forma de pó foram depositadas sob fita de carbono e metalizadas com ouro para serem analisadas.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

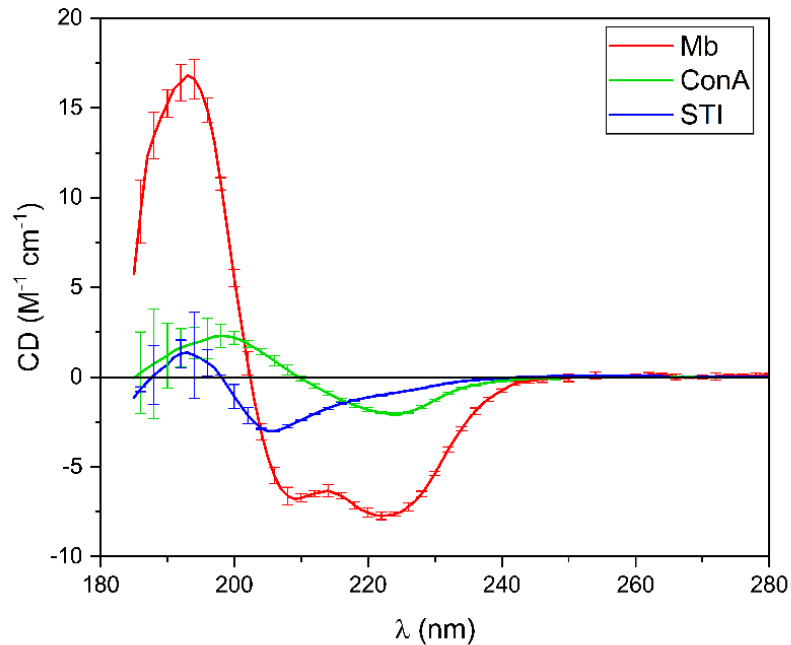
#### 3.1 Caracterizações estruturais dos sistemas proteicos

##### 3.1.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

###### 3.1.1.1 Proteínas em solução aquosa

Espectros de CD convencional para as três proteínas em solução tamponada (pH 7,0 e 25 °C) são apresentados Figura 9. No espectro da proteína Mb, foi observada uma intensa banda positiva em torno de 192 nm e dois mínimos negativos de menor magnitude em 208 e 222 nm que caracterizam a presença de estrutura secundária organizada em hélice- $\alpha$ , como de fato era esperado para esta proteína (MEHL; CRAWFORD; ZHANG, 2009). Já para a ConA, uma proteína composta majoritariamente de elementos em fitas- $\beta$ , o espectro de CD apresentou um máximo positivo em 197 nm e também uma larga banda negativa de baixa intensidade na região de 220 nm (AHMAD et al., 2007). O espectro de CD do STI em solução aquosa apresentou uma pequena banda positiva em torno de 187 nm e apenas uma banda negativa centrada em torno de 202 nm, caracterizando o alto conteúdo intrinsecamente desordenado (não canônico, não regular ou não ordenado) da cadeia polipeptídica (KUMAGAI; DEMARCO; LOPES, 2017).

É possível notar que, além do diferente posicionamento das bandas entre os espectros de CD de cada proteína, ocorre também diferenças notáveis na intensidade dos sinais das bandas observadas. A diferença de intensidade entre os espectros de proteínas do tipo toda- $\alpha$  e do tipo toda- $\beta$  é verificada com os dois representantes aqui utilizados (Mb e ConA, respectivamente). Também é possível observar que a intensidade do sinal de CD de proteínas formadas majoritariamente por fitas- $\beta$  ou estruturas intrinsecamente desordenadas são bastante atenuadas em relação aos espectros de proteínas formadas por estruturas em hélice. Este perfil está relacionado ao momento de dipolo elétrico resultante das ligações peptídicas que se orientam de maneira distinta em cada um destes tipos de estrutura secundária (NELSON; COX., 2004). De fato, o dipolo resultante que se forma paralelamente ao eixo da hélice- $\alpha$  é muito maior do que os formados nas demais estruturas. Dessa forma, a interação do dipolo resultante de uma hélice com a luz polarizada nos espectropolarímetros de CD é favorecida em comparação com os demais elementos estruturais.

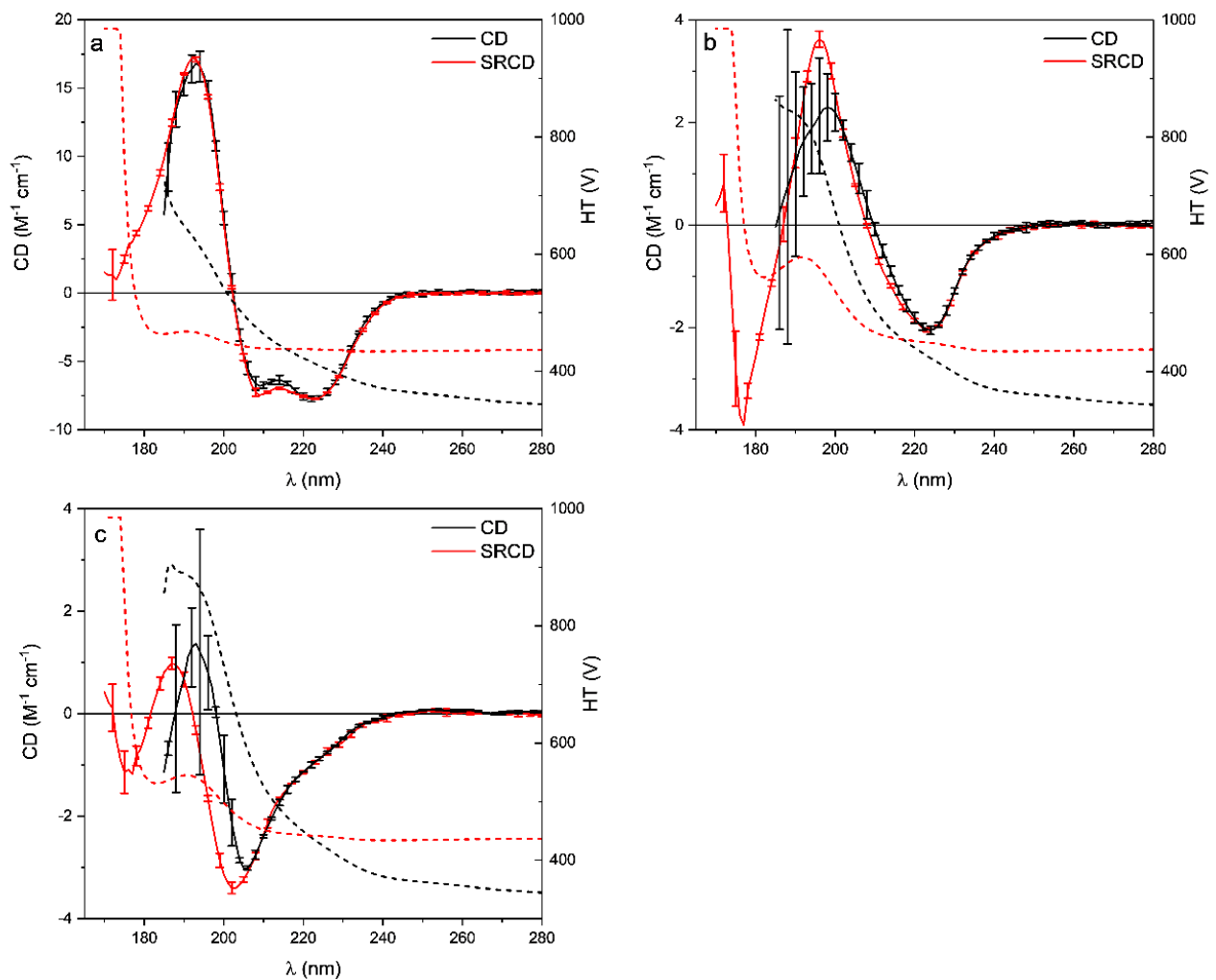


**Figura 9: Espectros de CD convencional para as proteínas.** Comparativos entre os espectros da Mb, ConA e STI gerados em pH 7,0 a 25 °C

Com a técnica de SRCD, foram feitas medidas mais acuradas e precisas atingindo comprimentos de onda menores do que os que foram alcançados com a técnica convencional (até ~173 nm com fonte de luz síncrotron e até ~190 nm com os equipamentos convencionais com lâmpada de Xe). O ganho de informações adicionais ocorre também devido ao alto fluxo de fótons no feixe de luz síncrotron. Em geral, as vantagens relacionadas a coleta de dados por SRCD foram a extensão do intervalo de dados coletados e o aumento da relação sinal-ruído que conjuntamente contribuem para a melhor detecção e mais clara distinção em mudanças conformacionais (LEES; WALLACE, 2002; WALLACE, 2009).

A Figura 10 (a-c) mostra um comparativo entre os espectros de CD convencional e SRCD. Primeiramente, pode-se observar a equivalência dos espectros nas duas diferentes abordagens, preservando o perfil típico do espectro em cada proteína, isto é, o posicionamento e as intensidades das bandas nos três casos. Nota-se que há grandes barras de erros começando a partir de 200 nm em direção a comprimentos de onda menores nos espectros de CD convencional. Com SRCD, pode-se avançar a comprimentos de ondas inferiores a 200 nm, sem comprometimento da relação sinal/ruído da medida. Neste caso, barras de incertezas maiores aparecem apenas em comprimentos

de onda abaixo de 175 nm. Desta forma, obtém-se um maior intervalo de dados confiáveis para ser analisados nos espectros de SRCD. Outra diferença é o aparecimento de um pico negativo adicional no espectro das proteínas ConA e STI (177 nm) que não podem ser vistos com o CD convencional (WALLACE, 2003; MILES; WALLACE, 2006; KUMAGAI; DEMARCO; LOPES, 2017; YONEDA et al., 2017). Este pico é atribuído a contribuições de conformações do tipo- $\beta$  que estão presentes tanto na ConA quanto no STI (MILES; WALLACE, 2006).



**Figura 10: Comparativos entre espectros de CD convencional e com radiação sincrotron.** Espectros para Mb(a), ConA (b) e STI (c) em solução tampão pH 7,0 a 25 °C.

Devido à baixa intensidade dos espectros de CD para as proteínas do tipo toda- $\beta$  e majoritariamente desordenada (ConA e STI, respectivamente), é possível notar a vantagem em se empregar o SRCD para realizar tais análises. Para o caso do STI, em particular, os dois picos estão

em regiões onde o CD convencional apresenta maior incerteza na determinação das bandas (< 200 nm). Dessa forma, aqui se observa a justificativa do emprego do SRCD para o estudo de proteínas ditas como intrinsecamente desordenadas (DUNKER et al., 2001) e proteínas cujo conteúdo em hélices é reduzido ou ausente (KUMAGAI; ARAUJO; LOPES, 2017).

Durante a medida dos espectros de CD/SRCD ocorre a medida simultânea da curva HT (*High Tension voltage*) que indica a alta voltagem aplicada na fotomultiplicadora (curvas tracejadas na Figura 10 (a - c)). Tipicamente, quando a curva de HT sofre um aumento abrupto (em torno de 700 V no equipamento convencional da Jasco) ocorre um grande aumento da incerteza associada ao sinal de CD. Dessa forma, a curva HT pode ser utilizada como uma estimativa do limite da região de pontos confiáveis num espectro de CD, quando este limite é atingido este ponto é descrito como o *cut off* do espectro.

As proteínas são formadas por uma combinação de elementos estruturais distintos, canônicos ou não. Contudo, dadas as diferenças relacionadas à interação de cada um destes tipos estruturais com a luz polarizada, não é apropriado inferir o conteúdo estrutural ou mesmo determinar o componente estrutural majoritário com base apenas em uma análise visual (ou qualitativa) dos espectros. Mas há a possibilidade de utilizar *softwares* que fazem a análise computacional do conteúdo estrutural do espectro de CD experimental.

Dessa forma, as frações das estruturas secundárias das proteínas foram estimadas (quantificados) com três algoritmos de desconvolução para espectros de CD e SRCD: ContinLL (PROVENCHER; GLÖCKNER, 1981), Selcon-3 (SREERAMA; WOODY, 1993) e CDSSTR (COMPTON; JOHNSON, 1986) disponíveis no servidor Dichroweb (MILES; RAMALLI; WALLACE, 2022) utilizando o banco de referências SP175t (LEES et al., 2006). Os espectros também foram analisados com outro método, o BeStSel (MICSONAI et al., 2015), mais indicado para aumentar a precisão e a distinção entre conformações do tipo- $\beta$  principalmente em proteínas com elevada proporção desse tipo de estrutura. Os algoritmos calculam os percentuais de cada EES com base em um conjunto de espectros de CD de proteínas solúveis cujas estruturas secundárias já são conhecidas.

Além da qualidade do espectro experimental coletado, a acurácia e precisão dos EES calculados é influenciada por diversos fatores como a escolha do algoritmo e do conjunto de espectros de referências selecionados durante a análise (WALLACE, 2003; SOUSA et al., 2021). A Tabela 3 sumariza os resultados obtidos com CD e SRCD por quatro algoritmos.



**Tabela 3:** Estimativas das frações de estrutura secundária com o CD convencional e com o SRCD

<b>Mb</b>		Hélice- $\alpha$ (%)	Fitas- $\beta$ (%)	Voltas (%)	Desordenada (%)	NRMSD
CD	CDSSTR	76	1	10	13	0,006
	Selcon 3	67*	4*	10*	19*	0,111
	Contin-LL	71	2	10	17	0,017
	BeStSel	64	2	11	23	0,006
	Média	70(6)	2(1)	10(1)	18(5)	
SRCD	CDSSTR	78	2	9	12	0,004
	Selcon 3	72	1	10	17	0,064
	Contin-LL	73	1	10	17	0,016
	BeStSel	69	1	10	20	0,008
	Média	73(4)	1(1)	10(1)	16(3)	
<b>ConA</b>		Hélice- $\alpha$ (%)	Fitas- $\beta$ (%)	Voltas (%)	Desordenada (%)	NRMSD
CD	CDSSTR	5	43	11	40	0,069
	Selcon 3	-	-	-	-	-
	Contin-LL	4	42	12	42	0,099
	BeStSel	0	48	14	38	0,026
	Média	3(3)	44(3)	12(2)	40(2)	
SRCD	CDSSTR	6	44	11	39	0,027
	Selcon 3	8	40	12	38	0,088
	Contin-LL	9	40	13	39	0,051
	BeStSel	4	44	8	43	0,017
	Média	7(2)	42(3)	11(2)	40(2)	
<b>STI</b>		Hélice- $\alpha$ (%)	Fitas- $\beta$ (%)	Voltas (%)	Desordenada (%)	NRMSD
CD	CDSSTR	7	38	13	42	0,065
	Selcon 3	-	-	-	-	-
	Contin-LL	12*	35*	13*	41*	0,350
	BeStSel	6	34	15	45	0,031
	Média	7(1)	36(3)	14(2)	43(2)	
SRCD	CDSSTR	7	35	13	44	0,016
	Selcon 3	14*	33*	13*	36*	0,968
	Contin-LL	15	30	15	41	0,031
	BeStSel	10	26	15	48	0,018
	Média	11(4)	30(4)	14(1)	44(4)	

Nota: As deconvoluções dos espectros de CD e SRCD gerados em pH 7,0 a 25 °C foram realizadas com *cut off* de 190 nm e 175 nm, respectivamente.

(-) valor indeterminado.

(\*) Valor desconsiderado no cálculo da média e desvio padrão (NRMSD > 0,100)

A estrutura hélice- $\alpha$  indica a soma de hélices regulares e hélices que apresentam distorções axiais (hélices irregulares), já as estimativas percentuais para fitas- $\beta$  é composta pela soma das organizações paralelas e antiparalelas. As estimativas percentuais dos componentes estruturais também são acompanhadas pelo indicador NRMSD (*Normalized Root Mean Square Deviation*). O NRMSD indica a proximidade do ajuste em relação ao modelo, isto é, quanto menor o seu valor maior a correspondência entre o espectro experimental e os modelos durante a desconvolução (WALLACE, 2003). Tipicamente, ajustes adequados podem ser alcançados para NRMSD < 0,100. Contudo, conforme sugerido por MILES et al. 2005, os valores de NRMSD são mais indicados para o descarte das estimativas pouco acuradas. (MILES; WHITMORE; WALLACE, 2005)

Os resultados com CD confirmaram a predominância de conteúdo em hélice- $\alpha$  (70%, em média) para a proteína mioglobina. Para a ConA foi verificada a predominância de fitas- $\beta$  (48%, com o algoritmo BeStSel) e, para a proteína STI, o conteúdo majoritário corresponde a estruturas intrinsecamente desordenadas (43%, em média).

Já as estimativas médias obtidas por SRCD para a proteína mioglobina indicaram a presença de 73%, em média, no conteúdo em hélice- $\alpha$ . Para a proteína ConA, foi estimado 44% de conformações do tipo fitas- $\beta$  com o algoritmo BeStSel indicando redução em relação aos valores obtidos com CD e para o STI as estruturas intrinsecamente desordenadas foram estimadas em 44%, em média. Assim, segundo os resultados de CD/SRCD, cada uma das proteínas selecionadas pode ser utilizada como um modelo estrutural correspondente ao EES majoritário.

Além das informações obtidas experimentalmente, a composição estrutural também foi avaliada com métodos de bioinformática. As predições teóricas foram feitas com base em modelos cristalográficos (arquivos *PDB*, *Protein Data Bank*) utilizando o método *DSSP* (*Dictionary of Secondary Structure of Proteins*) (KABSCH W, 1983) contido no servidor *2StrucCompare* (DREW; JANES, 2019). Os novos cálculos indicaram para a Mb (77% de hélice- $\alpha$  e 23% de outras), ConA (4% de hélice- $\alpha$ ; 48% de fitas- $\beta$  e 48% de outras) e STI (2% de hélice- $\alpha$ ; 37% de fitas- $\beta$  e 61% de outras). Neste caso, o termo ‘outras’ inclui a soma das demais estruturas, com exceção das hélice- $\alpha$  e fitas- $\beta$ .

É importante ressaltar que o conjunto de dados de referência utilizado na desconvolução dos espectros (SP175t) é constituído por proteínas globulares, regularmente ordenadas. No caso do STI, este fato pode ter relação com as estimativas mais elevadas para o conteúdo em hélice- $\alpha$  (~11%) obtido experimentalmente por SRCD em comparação com método DSSP (2%). Contudo,

utilizando outros conjuntos de referência que contêm espectros de proteínas desnaturadas, por exemplo, os conjuntos de referência 6 ou 7, também no servidor Dichroweb, as estimativas médias para hélice- $\alpha$  são reduzidas para 7(4) % e 2(1) %, respectivamente (SREERAMA; VENYAMINOV; WOODY, 2000).

Ainda, espectros de CD gerados a partir de arquivos PBD no servidor PDBMD2CD (DREW; JANES, 2021) também foram analisados com os mesmos algoritmos de desconvolução para comparações. A Tabela 4 apresenta os resultados em cada caso, em que se nota ampla concordância com os resultados experimentais (CD/SRCD).

**Tabela 4:** Estimativas das frações de estrutura secundária com os espectros gerados a partir das estruturas cristalográficas

<b>Mb</b>	Hélice- $\alpha$ (%)	Fitas- $\beta$ (%)	Voltas (%)	Desordenada (%)	NRMSD
<b>PDB: 5D5R</b>					
CDSSTR	76	0	10	13	0,002
Selcon 3	72	3	10	19	0,006
Contin	75	0	11	14	0,008
BeStSel	67	3	10	19	0,004
Média	73(4)	2(2)	10(1)	16(3)	
<b>ConA</b>	Hélice- $\alpha$ (%)	Fitas- $\beta$ (%)	Voltas (%)	Desordenada (%)	NRMSD
<b>PDB: 1APN</b>					
CDSSTR	8	45	10	38	0,009
Selcon 3	9*	44*	10*	38*	0,165
Contin	7	44	10	39	0,038
BeStSel	7	38	12	43	0,005
Média	7(1)	42(4)	11(1)	40(3)	
<b>STI</b>	Hélice- $\alpha$ (%)	Fitas- $\beta$ (%)	Voltas (%)	Desordenada (%)	NRMSD
<b>PDB: 1AVU</b>					
CDSSTR	3	36	13	47	0,006
Selcon 3	7	29	13	47	0,092
Contin	6	34	14	46	0,030
BeStSel	4	35	12	50	0,040
Média	5(2)	33(3)	13(1)	47(2)	

Nota: As desconvoluções dos espectros foram realizadas com *cut off* 190 nm.

(\*) Valor desconsiderado no cálculo da média e desvio padrão (NRMSD > 0,100)

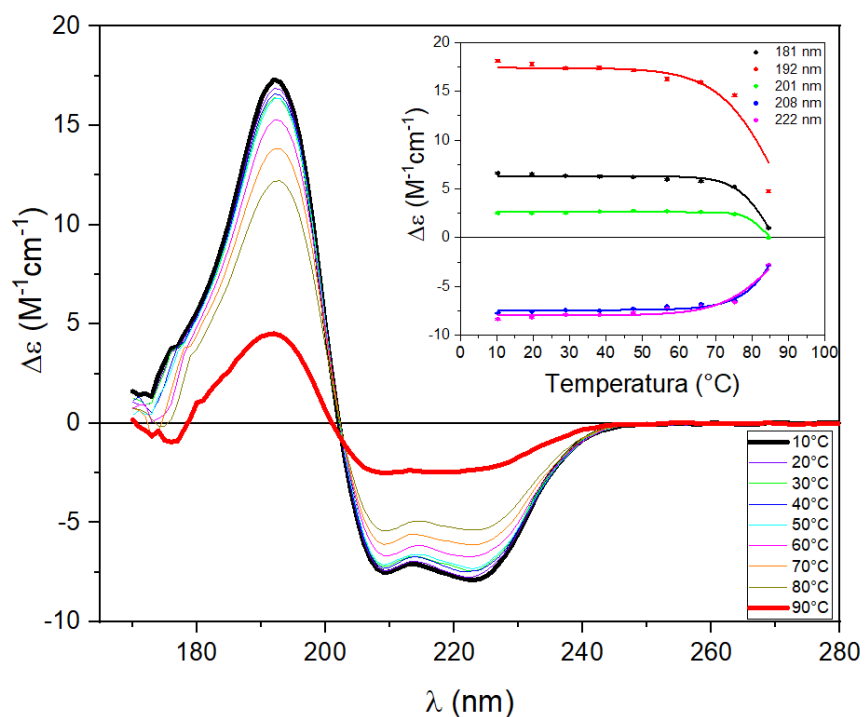
### 3.1.1.1.1 Efeitos da temperatura e pH

#### (i) Curvas de desnaturação térmica com dados de SRCD

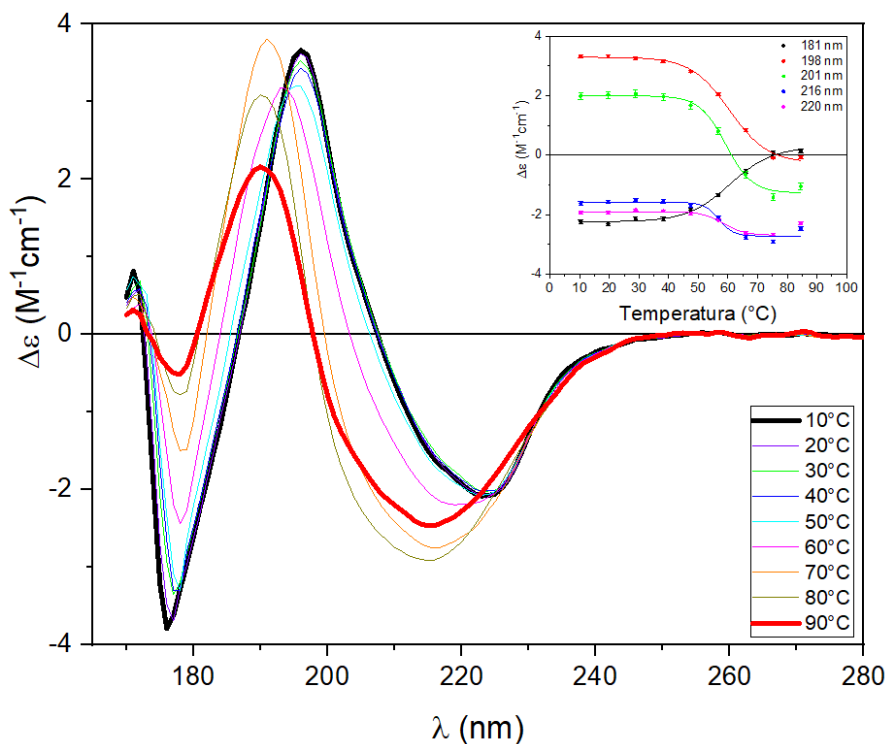
A influência da temperatura sobre a estrutura proteica foi avaliada para identificar as condições adequadas para o procedimento de incorporação na sílica. As Figuras 11, 12 e 13 mostram os efeitos do aumento de temperatura nos espectros de SRCD tomados a pH 7,0, onde se nota a desnaturação térmica para as três proteínas quando temperaturas elevadas ( $> 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) são atingidas. Em geral, a estabilidade termoestrutural das três proteínas foi observada até  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  que está acima do limite de temperatura aplicado na incorporação.

Para as curvas da Mb, pode-se observar que no intervalo de  $10$  a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o espectro de CD permaneceu praticamente inalterado, preservando a estrutura nativa da proteína. Mudanças significativas foram notadas a partir de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  caracterizadas pela diminuição progressiva na intensidade do sinal e deslocamentos das posições das bandas em  $192$ ,  $208$  e  $222\text{ nm}$ , sugerindo a perda da fração em hélice desta proteína. Para a ConA, nota-se que apenas alterações sutis ocorreram no espectro de  $10$  a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  mantendo a estrutura nativa da proteína neste intervalo. Acima de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ocorreram alterações estruturais significativas caracterizadas, principalmente, pelo aumento da intensidade de CD e deslocamentos drásticos (de  $7$  a  $9\text{ nm}$ ) para comprimentos de ondas menores nas posições iniciais dos picos.

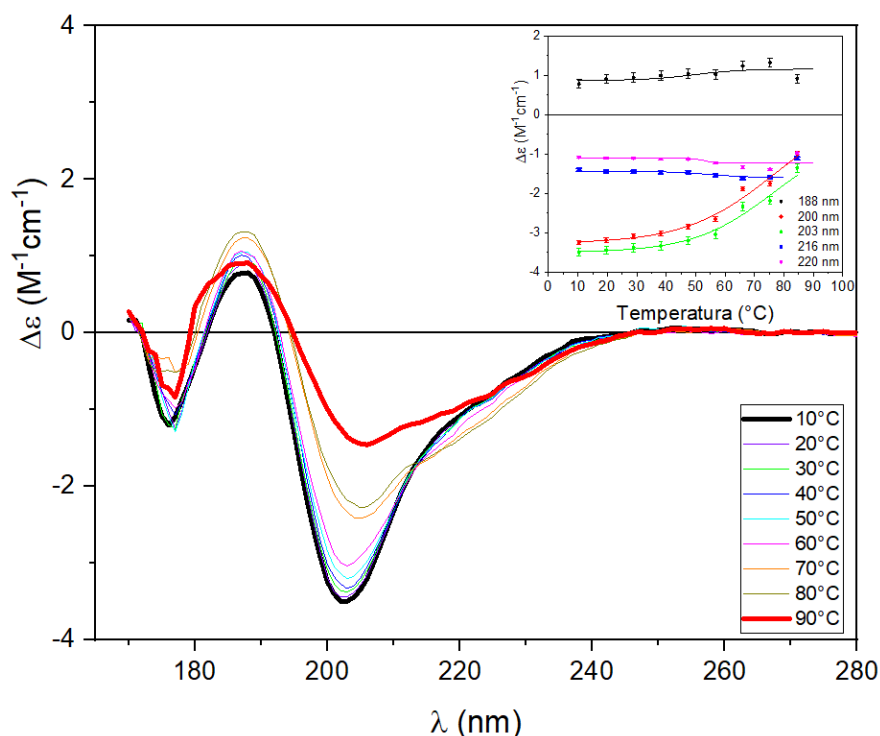
Conforme relatado em LOPES et al. 2013, a curva de desnaturação térmica de proteínas com alto conteúdo não ordenado pode exibir um ganho discreto em elementos estruturais canônicos em função do aumento da temperatura. Este efeito foi observado para a proteína STI através da diminuição da intensidade em torno de  $202\text{ nm}$  acompanhado de um pequeno aumento de intensidade em  $187$  e  $222\text{ nm}$  que estão associados a estruturas mais ordenadas. Particularmente, o aumento de intensidade na região de  $222\text{ nm}$  é maior entre  $60 - 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , contudo, a proteína aparenta reduzir tal ganho em elementos ordenados ao atingir  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uma hipótese sugerida por UVERSKY, 2009, considera que a elevação da temperatura poderia favorecer o efeito hidrofóbico contribuindo para a formação de dobras na cadeia. Este efeito não foi observado nas curvas de desnaturação térmica das proteínas globulares, cuja estrutura tridimensional foi desestabilizada conforme aplicado o aumento da temperatura, reduzindo o conteúdo ordenado da conformação nativa.



**Figura 11: Espectros de SRCD: desnaturação térmica da proteína Mb.** Espectros gerados em pH7,0 com leituras de 10 a 90 °C a passos de 10 °C. Os ajustes sigmoidais são mostrados nas figuras internas para os comprimentos de onda 181nm (preto), 192nm (vermelho), 201nm (verde), 208nm (azul) e 222nm (magenta).



**Figura 12: Espectros de SRCD: desnaturação térmica da proteína ConA.** Espectros gerados em pH7,0 com leituras de 10 a 90 °C a passos de 10 °C. Os ajustes sigmoidais são mostrados nas figuras internas para os comprimentos de onda 181nm (preto), 198nm (vermelho), 201nm (verde), 216nm (azul) e 220nm (magenta).



**Figura 13: Espectros de SRCD: desnaturação térmica da proteína STI.** Espectros gerados em pH7,0 com leituras de 10 a 90 °C a passos de 10 °C. Os ajustes sigmoidais são mostrados nas figuras internas para os comprimentos de onda 188nm (preto), 200nm (vermelho), 203nm (verde), 216nm (azul) e 220nm(magenta).

Como esperado, por meio da análise da forma de linha dos espectros, o aumento da temperatura foi capaz de provocar alterações visíveis nos espectros de CD indicando uma crescente perda do conteúdo estrutural nativo a partir de uma temperatura limite. Para melhor monitorar esta variação, 5 comprimentos de ondas foram selecionados e monitorados em cada ensaio e suas curvas em função da temperatura foram ajustadas para indicar o ponto médio da transição térmica das três proteínas. A temperatura onde se encontram 50% das proteínas no estado nativo e 50% no estado desnaturado da transição térmica ( $T_m$ , do inglês *Temperature of melting*) associada a cada comprimento de onda foi calculada por ajustes sigmoidais, conforme realizado em (GARCIA et al., 2013; LOPES et al., 2013) e são apresentadas na Tabela 5. A  $T_m$  média para a transição térmica da Mb, ConA e STI foi estimada em 88(3) °C; 59(1) °C e 62(14) °C, respectivamente, que corresponde à transição do estado nativo dobrado (F, *folded*) para o estado desdobrado (U, *unfolded*).

Os monitoramentos para ConA mostraram a presença de patamares bem definidos, sendo este um perfil comum para proteínas globulares. No caso da Mb, o estado enovelado foi aparente

até ~ 65 °C enquanto o estado completamente desenovelado deve, provavelmente, ocorrer acima do limite de temperatura avaliado no experimento (MEHL; CRAWFORD; ZHANG, 2009). Já os comprimentos de ondas monitorados para o STI mostram um comportamento quase linear para alguns comprimentos de onda e com estágios não tão bem definidos como foi observado para as proteínas globulares. Neste caso, o alto valor estimado para o desvio padrão da média decorre do comportamento anômalo relacionado ao alto percentual de conteúdo não ordenado.

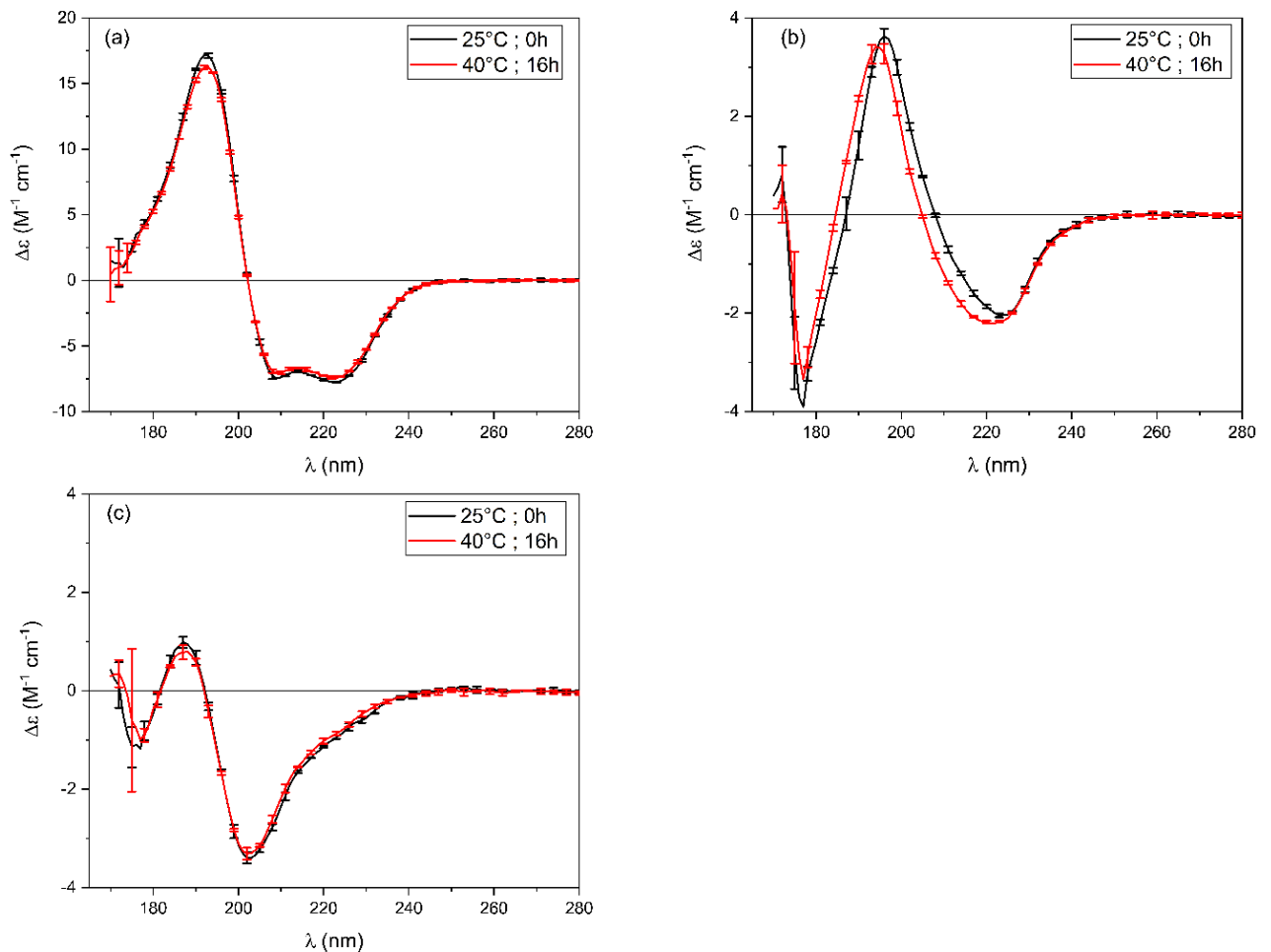
**Tabela 5:** Determinação da temperatura de transição térmica (T<sub>m</sub>)

λ (nm)	<b>Mb</b>	λ(nm)	<b>ConA</b>	λ(nm)	<b>STI</b>
	T <sub>m</sub> (°C)		T <sub>m</sub> (°C)		T <sub>m</sub> (°C)
181	89	181	61	188	49
192	88	198	61	200	77
201	83	201	59	203	77
208	90	216	57	216	55
222	88	220	59	220	53
Média	88(3)	Média	59(1)	Média	62(14)

(ii) Incubação em solução tampão (pH 7,0) a 40°C

A Figura 14 (a - c) apresenta os comparativos entre espectros de SRCD obtidos em pH 7,0 em duas condições: a 25 °C e após a incubação a 40 °C por 16 h. Após o procedimento de incubação, a Mb apresentou redução de 5,5% no conteúdo em hélices- $\alpha$ . A ConA apresentou redução de 4,8 %, em média, em conformações do tipo- $\beta$ . Já de acordo com estimativas com o algoritmo BeStSel, as reduções foram ~ 11% que pode indicar maior influência da temperatura em comparação com a proteína Mb. Já as análises para a proteína STI não indicaram variações após a incubação.

O mesmo experimento foi realizado com CD convencional, mas com aumento no tempo de incubação para 24 h para equivaler ao limite de tempo usado durante a incorporação das proteínas em SBA-15. Os resultados com este novo procedimento foram qualitativamente equivalentes, indicando a maior sensibilidade para as proteínas com elevado conteúdo ordenado (Mb e ConA).



**Figura 14: Comparativos entre os espectros gerados em pH 7,0: a 25 °C e após incubação a 40 °C por 16 h.** Espectros de SRCD para as proteínas (a) Mb, (b) ConA e (c) STI.

(iii) Efeitos da variação de pH

Proteínas podem diminuir seu conteúdo estrutural ordenado (hélices- $\alpha$  e fitas- $\beta$ ) em soluções ácidas por meio do rompimento das ligações de hidrogênio que estabilizam a conformação nativa. A Figura 15 (a - c) apresenta novos espectros de SRCD tomados imediatamente ao atingir os dois pontos de temperatura de interesse (25 °C e 37 °C) em soluções pH 7,0 e pH 2,2 para verificar tal efeito. Nota-se que a variação de pH (de neutro para ácido) provocou drástica alteração no perfil do espectro da proteína Mb sugerindo relevante alteração conformacional. Na Figura 15 (a), as bandas características do conteúdo em hélice- $\alpha$  da Mb desapareceram e a proteína passou a



apresentar espectro de CD típico de estruturas não ordenadas (único pico negativo em torno de 198 nm) quando em solução ácida. Neste caso, as frações dos EES estimadas indicaram uma significativa perda de estruturas em hélices- $\alpha$  em relação à conformação nativa (de 73 % para 11 %, em média, para medições a 25 °C). A perda de hélice- $\alpha$  também foi acompanhada pelo aumento das estimativas médias das estruturas desordenadas (de 16 % na conformação nativa para 47 % em pH 2,2).

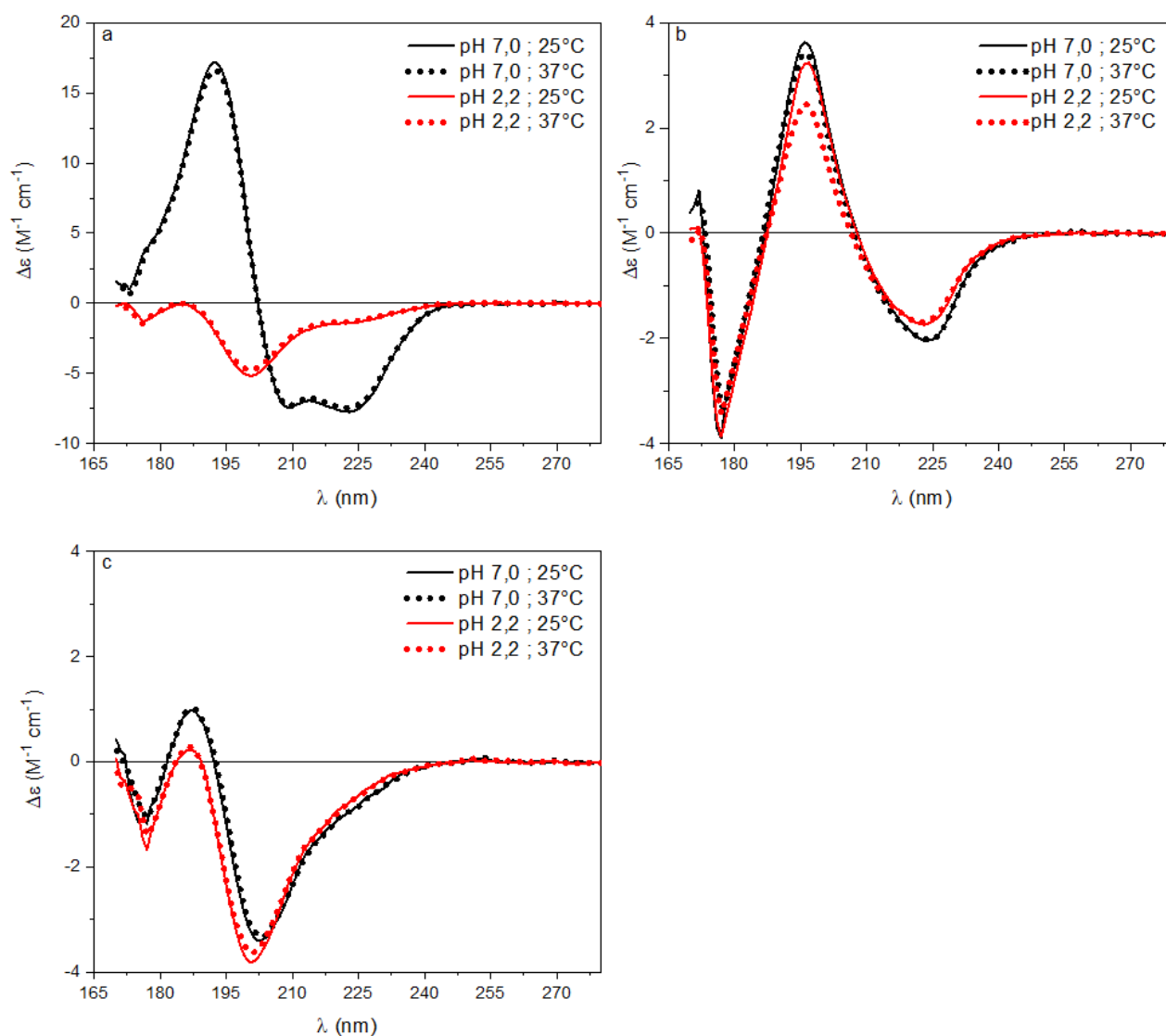


Figura 15: Comparativos entre espectros de SRCD sob variação de temperatura e pH: (a)Mb; (b)ConA e (c)STI.

As demais proteínas, ConA e STI, apresentaram maior estabilidade para a variação de pH aplicada. Em ambos os casos, os comparativos entre as medidas a 25°C em pH 7,0 e pH 2,2 não indicaram alterações significativas em seus elementos estruturais predominantes. No caso da ConA, foi observado maior sensibilidade a variações de temperatura (conforme a seção anterior) do que variações de pH.

As estimativas percentuais para o EES majoritário para cada proteína em função das variações de temperatura e pH aplicadas são apresentadas na Tabela 6. Apenas os resultados obtidos com SRCD são mostrados em razão da maior sensibilidade a mudanças estruturais. Dessa forma, os monitoramentos das alterações estruturais neste estudo, sugerem que as condições usadas no procedimento de incorporação em solução neutra sob a temperatura de 35°C por 22 horas, estão de acordo com os limites de temperatura e pH suportados pelas estruturas nativas das três proteínas.

De modo geral, o tempo de incubação em solução neutra revelou pouca influência sob o processo de alterações conformacionais. Além disso, vale ressaltar que os experimentos de incubação extrapolaram os limites de temperatura usados no procedimento de incorporação justamente para observar tais efeitos.

**Tabela 6:** Frações estruturais majoritárias para cada proteína sob variações de pH e temperatura com experimentos de SRCD

pH	7,0	7,0	7,0	2,2	2,2					
T (°C)	25	37	40**	25	37					
<b>Mb</b>	Hélice- $\alpha$ (%)	NRMSD	Hélice- $\alpha$ (%)	NRMSD	Hélice- $\alpha$ (%)	NRMSD	Hélice- $\alpha$ (%)	NRMSD	Hélice- $\alpha$ (%)	NRMSD
CDSSTR	78	0,004	77	0,003	74	0,003	8	0,020	7	0,022
Selcon 3	72	0,064	71	0,063	69	0,068	14*	0,363	13*	0,231
Contin	73	0,016	72	0,021	70	0,015	15	0,024	11	0,021
BeStSel	69	0,008	66	0,008	65	0,007	11	0,023	8	0,022
Média	73(4)		71(5)		69(4)		11(4)		9(2)	
<b>ConA</b>	Fitas- $\beta$ (%)	NRMSD	Fitas- $\beta$ (%)	NRMSD	Fitas- $\beta$ (%)	NRMSD	Fitas- $\beta$ (%)	NRMSD	Fitas- $\beta$ (%)	NRMSD
CDSSTR	44	0,027	42	0,027	41	0,019	43	0,035	43	0,031
Selcon 3	40	0,088	40*	0,102	40*	0,151	39*	0,166	32	0,132
Contin	40	0,051	39	0,051	40	0,058	42	0,050	40	0,037
BeStSel	44	0,017	40	0,021	39	0,019	45	0,017	42	0,020
Média	42(3)		40(2)		40(1)		43(2)		42(2)	
<b>STI</b>	Desord. (%)	NRMSD	Desord. (%)	NRMSD	Desord. (%)	NRMSD	Desord. (%)	NRMSD	Desord. (%)	NRMSD
CDSSTR	44	0,016	43	0,016	43	0,020	45	0,012	44	0,013
Selcon 3	36*	0,968	39	0,071	37*	0,145	-	-	36*	1,036
Contin	41	0,031	41	0,027	41	0,034	44	0,035	43	0,041
BeStSel	48	0,018	47	0,020	47	0,023	46	0,027	47	0,028
Média	44(4)		42(4)		44(3)		45(1)		45(2)	

(-) valor não determinado

(\*) Valor desconsiderado no cálculo da média e desvio padrão (NRMSD > 0,100)

(\*\*) Resultados do experimento de incubação com SRCD por 16 h a 40 °C.

### 3.1.1.2 Filmes proteicos semidesidratados

Para avaliar a adsorção proteica em superfícies sólidas e possíveis alterações conformacionais ocasionadas por este processo e também pela redução do grau de hidratação do meio, realizamos ensaios de CD sob filmes proteicos parcialmente desidratados depositados sob placas de quartzo. A superfície das placas de quartzo possui similaridade química com a SBA-15 como a presença do grupo químico -OH sob a sua superfície permitindo mimetizar um ambiente mais aproximado ao encontrado pelas proteínas quando incorporadas em SBA-15.

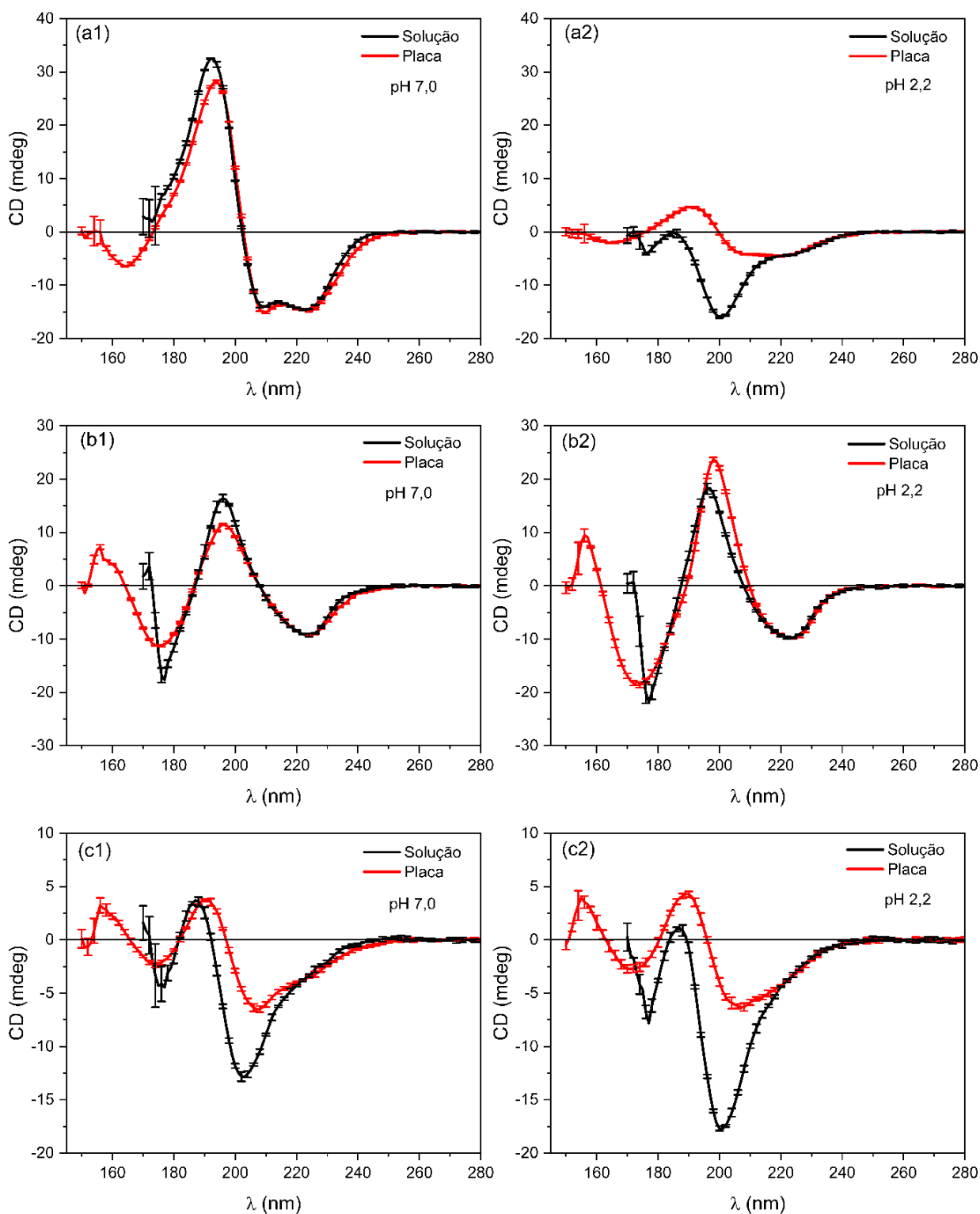
A Figura 16 mostra os comparativos entre os espectros de SRCD em solução aquosa e em filmes proteicos formados em pH 7,0 e pH 2,2 sob as placas de quartzo. Os espectros

correspondentes aos filmes parcialmente desidratados alcançaram comprimento de ondas menores (150 nm) do que os observados em solução (170 nm). Este efeito está relacionado à redução do número de moléculas de água que apresentam forte absorção na região abaixo de 170 nm (YONEDA et al., 2017). O espectro gerado em filme foi normalizado pelo respectivo valor em solução em 222 nm, devido à impossibilidade em determinar a concentração das proteínas nesta situação para, assim, eliminar seu efeito sobre a intensidade do sinal. Nestes casos, apenas análises qualitativas podem ser realizadas já que os algoritmos de desconvolução necessitam deste parâmetro para comparação com os espectros de referência.

Segundo YONEDA et al., 2017, proteínas com alto conteúdo não ordenado, quando depositadas em filmes, passam a apresentar espectros característicos de estruturas com maior grau de ordenamento estrutural. Este efeito foi atribuído à diminuição do número de moléculas de água disponíveis para interagir com a proteína permitindo o estabelecimento de novas interações intracadeia. Dessa forma, novas dobras da cadeia polipeptídica podem elevar o grau de ordenamento estrutural de forma parcial. Aqui, este efeito foi observado nos espectros em filmes parcialmente desidratados da proteína STI conforme as Figuras 16 (c1) e 16 (c2). Neste caso, foi verificado um deslocamento do pico positivo de 187 nm para 190 nm e no pico negativo de 202 nm para ~208 nm acompanhado de uma deformação em torno de 222 nm que sugere a formação de elementos mais ordenados.

Quando a proteína é globular, altamente ordenada em solução aquosa, não se espera alterações significativas de seu conteúdo estrutural quando depositada em filme. Este efeito pode ser observado com a ConA nas Figuras 16 (b1) e 16 (b2), que não exibiu alteração do formato de linha do espectro nas duas condições (filme e solução aquosa) e para a Mb em pH 7,0 na Figura 16 (a1).

No caso da Mb em pH 2,2, um fenômeno similar ao da proteína STI pode ser observado na Figura 16 (a2). Conforme apresentado na seção anterior, a Mb exibiu drástica redução em hélices- $\alpha$  e aumento de estruturas desordenadas quando em solução ácida, no entanto, os picos associados a hélices- $\alpha$  (com intensidade bastante reduzida) passam a ser observados novamente com a proteína depositada na placa sugerindo um ganho parcial de estruturas mais ordenadas quando no filme.



**Figura 16: Comparativos entre os espectros de SRCD para as proteínas em solução aquosa e em filmes semidesidratados.** Espectros para as proteínas Mb (a1 e a2), para ConA (b1 e b2) e para STI (c1 e c2). Espectros na placa normalizados em 222nm

Dessa forma, o estudo sobre a adsorção proteica em superfícies sólidas/rígidas buscando mimetizar um ambiente mais aproximado ao da SBA-15 que também considere o grau de hidratação das proteínas é particularmente importante, uma vez que o meio nativo/ fisiológico das proteínas é essencialmente aquoso. Desse modo, quando incorporadas em SBA-15, as proteínas podem apresentar espectros de CD com características similares aos observados nos filmes. Contudo, a influência de outros fatores como a densidade superficial do grupo reativo (-OH) e as diferenças entre as geometrias da placa (superfície plana) e os poros cilíndricos da SBA-15 não podem ser eliminadas e, ainda podem afetar o espectro de CD e o fenômeno da adsorção propriamente (LUNDQVIST; SETHSON; JONSSON, 2004; SIEFKER; KARANDE; COPPENS, 2014).

### 3.1.2 Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de fluorescência das proteínas foram obtidos com a excitação dos fluoróforos intrínsecos triptofano (Trp) e tirosina (Tyr). A Tabela 7 apresenta a quantidade destes resíduos de aminoácidos para cada proteína obtida com a análise da sequência. A complexidade relacionada a interpretação dos espectros de fluorescência é maior conforme a quantidade destes fluoróforos na cadeia polipeptídica. Este efeito decorre da somatização das interações individuais de cada fluoróforo com outros aminoácidos em sua microvizinhança e interações com o solvente (JAMESON, 2014). É importante ressaltar que a excitação em  $\lambda_{Ex} = 280 \text{ nm}$  carrega a contribuição de ambos os resíduos de amino ácido (Trp e Tyr) enquanto com  $\lambda_{Ex} = 295 \text{ nm}$ , a fluorescência se deve a emissão dos resíduos de Trp, predominantemente (LAKOWICZ, 2006). A presença em menor número na sequência polipeptídica e a sensibilidade ao meio dos resíduos de Trp facilita a análise dos espectros gerados com excitação em 295 nm.

**Tabela 7:** Número de resíduos de triptofano (Trp) e tirosina (Tyr) na sequência polipeptídica e o percentual em relação ao total de resíduos de aminoácidos na sequência.

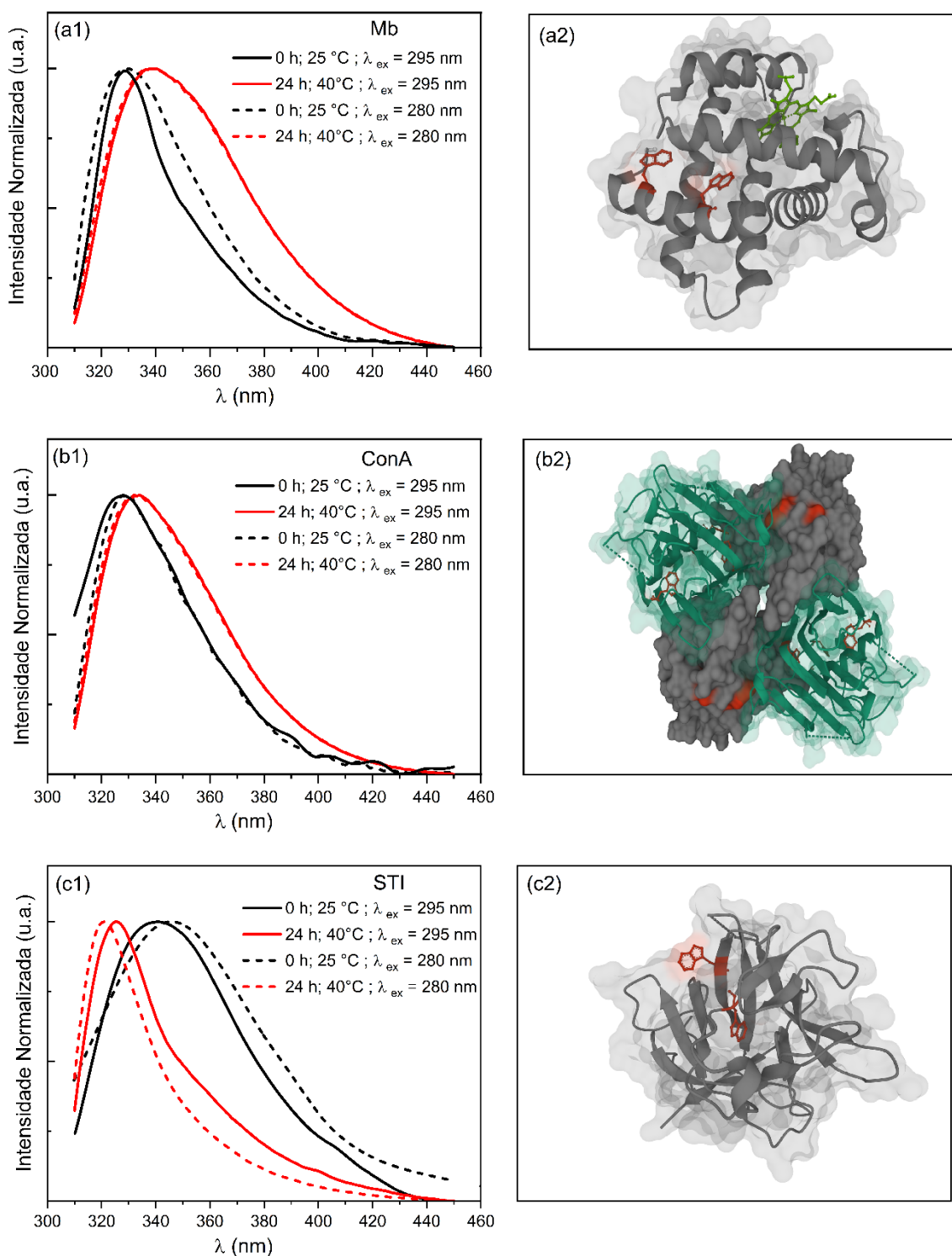
Proteína	Trp	Tyr
Mb	2 (1,3%)	2 (1,3%)
ConA	4 (1,7%)	7 (3,0%)
STI	2 (1,1%)	4 (2,2%)

Os resíduos de Trp são altamente sensíveis às propriedades físico-químicas do ambiente, assim, variações de temperatura e pH que promovem alterações conformacionais na vizinhança das sondas podem ser monitoradas (CHATTERJEE; MANDAL, 2003, 2005; BANERJEE; KISHORE, 2004) posto que o estado energético dos fótons emitidos sob uma nova conformação sofre variações durante o processo de retorno do estado excitado ao estado de menor energia. Uma forma de avaliar tais alterações corresponde ao monitoramento da posição dos máximos de fluorescência nos espectros conforme as modificações no meio vão sendo aplicadas. De modo geral, alterações que realoquem as cadeias laterais dos resíduos de Trp para regiões menos expostas às interações com o solvente apresentam o máximo de fluorescência deslocado para comprimento de ondas menores (deslocamento para o azul, *blue shift*, do inglês) enquanto a maior exposição ao solvente aquoso ocorre o deslocamento para comprimentos de ondas maiores (deslocamento para o vermelho, *red shift*, do inglês) (LAKOWICZ, 2006).

A Figura 17 (a1, b1 e c1) mostra os espectros de fluorescência intrínseca com excitação em 280 nm e 295 nm para cada proteína em solução tamponada (pH 7,0) coletados imediatamente a 25 °C e após a incubação a 40 °C por 24h.

No caso das proteínas globulares (Mb e ConA), não foi observado variação significativa no máximo de emissão quando a excitação foi realizada em 280 ou 295 nm, nas condições de temperatura testadas (a 25°C ou a 40 °C no experimento de incubação). O espectro de emissão da proteína Mb a 25°C apresentou o máximo centrado em ~330 nm indicando que os aromáticos da proteína se encontram em um ambiente menos polar, sendo compatível com o estado de proteínas globulares enoveladas, que geralmente escondem as cadeias laterais de tais resíduos em ambientes protegidos de interação com água.

Após a incubação a 40 °C, a posição do máximo de emissão foi deslocada para ~338 nm. Este resultado sugere que o processo de aquecimento por tempo prolongado levou a uma pequena alteração na vizinhança dos fluoróforos monitorados, tornando-os mais expostos ao solvente, porém ainda protegido da exposição ao ambiente aquoso. Em particular, os espectros em 295 nm são resultantes principalmente das emissões dos dois resíduos de Trp da mioglobina. Conforme a estrutura cristalográfica (PDBID 5D5R) apresentada na Figura 17 (a2), o primeiro (Trp 7) está alocado em regiões mais periféricas da proteína podendo interagir com o solvente polar, neste caso. O segundo (Trp 14) está alocado em porções mais aterradas no núcleo hidrofóbico e, portanto, mais isolado das interações com o solvente (MAURUS et al., 1998)



**Figura 17: Espectros de fluorescência intrínseca e estruturas cristalográficas das proteínas.** Espectros de fluorescência das proteínas (a1) Mb, (b1) ConA e (c1) STI em solução tampão (pH 7,0) coletados imediatamente a 25°C em comparação com espectros coletados após a incubação por 24h a 40°C. Estruturas cristalográficas para as proteínas: (a2) Mb (PDB: 5D5R), (b2) ConA (PDB: 1APN) e (c2) STI (PDB: 1AVU) destacando os resíduos de aminoácido triptofanos em vermelho.



O espectro de fluorescência da ConA apresentou apenas um pequeno deslocamento no máximo de emissão (de ~328 nm para ~333 nm) em resposta ao processo de incubação a 40 °C. Entretanto, a interpretação do seu espectro de emissão constitui um desafio maior, visto que o estado oligomérico dessa proteína é um tetrâmero (em pH 7,0) totalizando 16 resíduos de Trp (REEKE; BECKER; EDELMAN, 1975; LÓPEZ-JARAMILLO et al., 2004). Conforme a estrutura cristalográfica (PDBID 1APN) apresentada na Figura 17 (b2), cada monômero possui dois resíduos de Trp (Trp 40 e Trp 109) localizados em porções mais isoladas do solvente, enquanto os demais (Trp 88 e Trp 182) estão mais acessíveis.

Os espectros do STI na conformação nativa, apresentaram máximos de fluorescência em ~346 nm e ~340 nm para excitação em 280 nm e 295 nm, respectivamente. Neste caso, o espectro encontra-se deslocado para comprimentos de onda maiores em relação as proteínas globulares indicando maior exposição das sondas ao ambiente aquoso, sendo tal efeito relacionado com o elevado conteúdo estrutural não ordenado desta proteína. Já o experimento de incubação proveu um efeito *blue shift* no máximo observado de 25 nm e 15 nm para excitação em 280 nm e 295 nm, respectivamente. A proteína STI apresenta dois resíduos de Trp: um deles (Trp 93) encontra-se em uma região dentro do núcleo ordenado composto por fitas- $\beta$  (PDBID 1APN), enquanto o segundo (Trp 117) está localizado numa porção essencialmente mais exposta para interações com solventes (SONG; SUH, 1998) conforme apresentado na Figura 17 (c2),

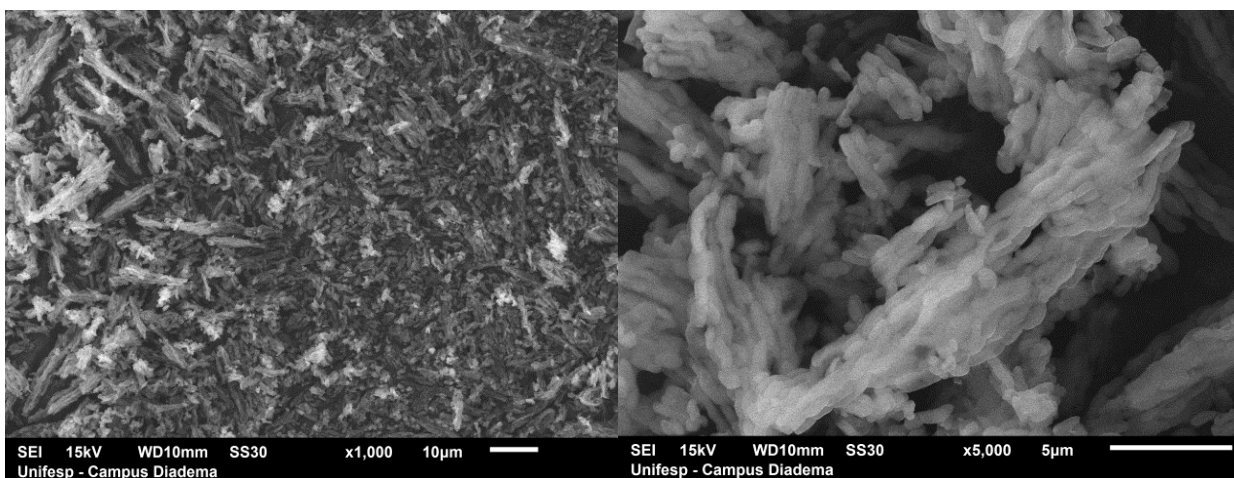
Os espectros de fluorescência observados a 25 °C estão em concordância com os dados obtidos com a técnica de CD. Assim, os máximos de emissão observados próximos a 330 nm sugerem alto grau de preservação do estado nativo da proteína em seu estado globular (para Mb e ConA) e menor compactação para o caso do STI, que apresentou maior exposição dos resíduos de Trp ao meio polar, coerente com o caso das proteínas com elevado conteúdo não ordenado

## 3.2 Caracterizações das partículas de SBA-15

### 3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

Conforme a Figura 18, as imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) da SBA-15 sintetizada revelaram partículas com formato cilíndrico (bastonetes) de tamanho uniforme (1-2

$\mu\text{m}$ ) e a presença de aglomerados de partículas em alta conformidade com o protocolo de síntese utilizado (ZHAO et al., 1998a). A uniformidade no tamanho e na forma das partículas observadas na imagem é um aspecto essencial em sistemas de entregas, pois favorece o controle sobre a especificidade e homogeneidade das interações com o ambiente (SIEFKER; KARANDE; COPPENS, 2014). Ainda, nota-se a macroporosidade da SBA-15 ( $> 50 \text{ nm}$ ) que possibilita a incorporação de moléculas grandes quando o acesso aos mesoporos é dificultado/impedido em função da relação de tamanho proteína/mesoporos (SCARAMUZZI et al., 2016; RASMUSSEN et al., 2019).



**Figura 18:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura sobre as partículas de SBA-15. As imagens foram geradas após extração do copolímero Pluronic P123.

### 3.2.2 Espalhamento de raios X a baixos ângulos

A Figura 19 apresenta a curva de SAXS para a SBA-15 sintetizada. Pode-se observar cinco picos atribuídos à simetria bidimensional hexagonal dos mesoporos (grupo espacial  $p6mm$ ). A presença dos últimos dois picos desta curva sugere de forma qualitativa que o material analisado apresenta alto grau de ordenamento dos mesoporos (ZHAO et al., 1998a), contudo é importante que tal aspecto seja avaliado em conjunto com outras técnicas experimentais como NAI. O parâmetro de rede ( $a$ ) foi estimado em  $11,36(3) \text{ nm}$ , segundo a média dos valores associados aos picos individuais.

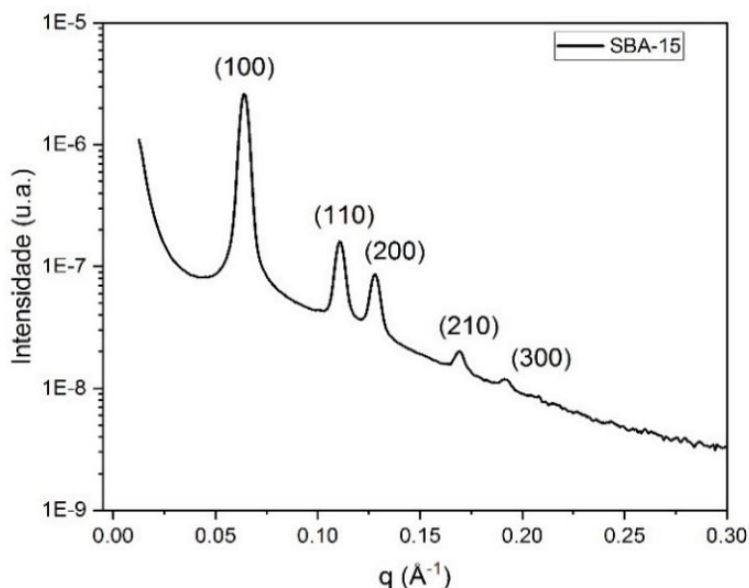


Figura 19: Curva de espalhamento de raios X a baixos ângulos para a SBA-15.

### 3.2.3 Isotermas de adsorção de nitrogênio

A Figura 20 mostra as isotermas de adsorção/dessorção para a SBA-15 sintetizada em alta concordância com a descrição da IUPAC para materiais mesoporosos (curvas de adsorção do tipo IV e histerese do tipo H1) (SING, 1982; THOMMES et al., 2015). A explicação clássica para o fenômeno de histerese (caracterizado pela diferença de caminho entre as isotermas de adsorção e dessorção) está vinculada ao processo de condensação capilar ocorrendo nos mesoporos. Uma explicação para os mecanismos que levam à histerese, considerando o modelo de único poro cilíndrico e aberto, está relacionada ao processo de evaporação/dessorção que, ao iniciar pela interface líquido-vapor na extremidade do poro, promove um recuo do menisco previamente formado na fase de condensação capilar, sendo tal processo distinto da etapa adsorção que ocorre em camadas (THOMMES, 2004).

Conforme avaliado com o método BET, a síntese resultou em partículas com ampla área superficial ( $S$ ) estimada em  $781,53 \pm 2,19 \text{ m}^2/\text{g}$  coerente com outros trabalhos reportados (FULVIO; PIKUS; JARONIEC, 2005; CHOMA; JARONIEC, 2007). O cálculo foi realizado na região  $0,02 < p/p_0 < 0,19$ . Já o loop de histerese foi observado no intervalo de  $0,65 < p/p_0 < 0,77$ . O volume médio dos poros ( $V$ ) foi estimado em  $1,51 \text{ cm}^3/\text{g}$  com o método BJH e a espessura da

parede da sílica (*b*) foi estimada em 2,01 nm por dados de SAXS e NAI conjuntamente. A estreita distribuição de tamanho de poros para as partículas (gráfico interno na Figura 20) sugere alta uniformidade no diâmetro dos mesoporos (diâmetro médio de poros (*D*) 9,26 nm). Este aspecto é bastante vantajoso para sistemas de entregas de proteínas posto que favorece o controle das interações da sílica com o conteúdo proteico nos mesoporos (SIEFKER; KARANDE; COPPENS, 2014).

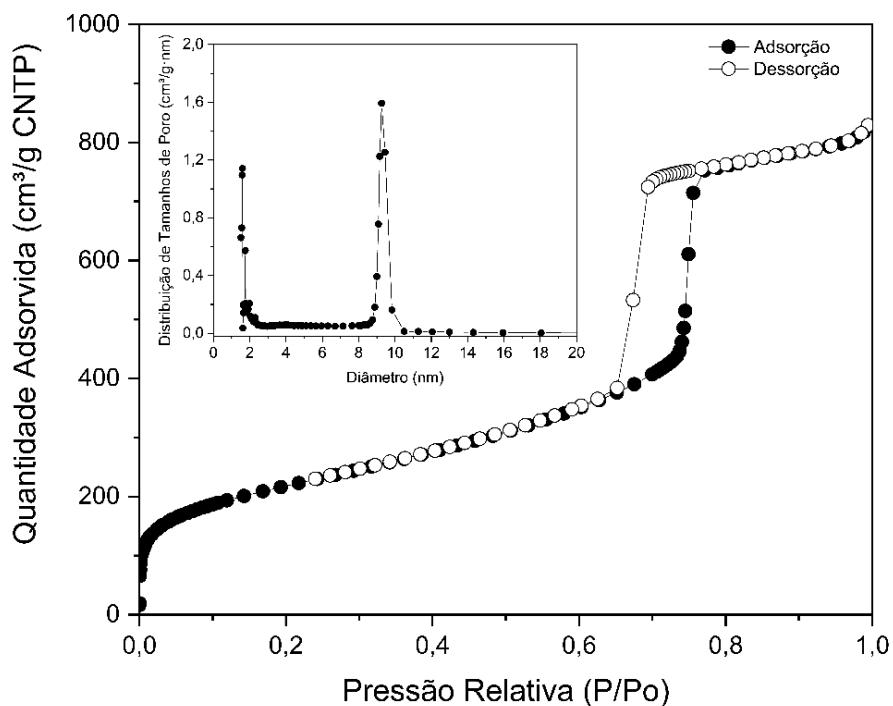


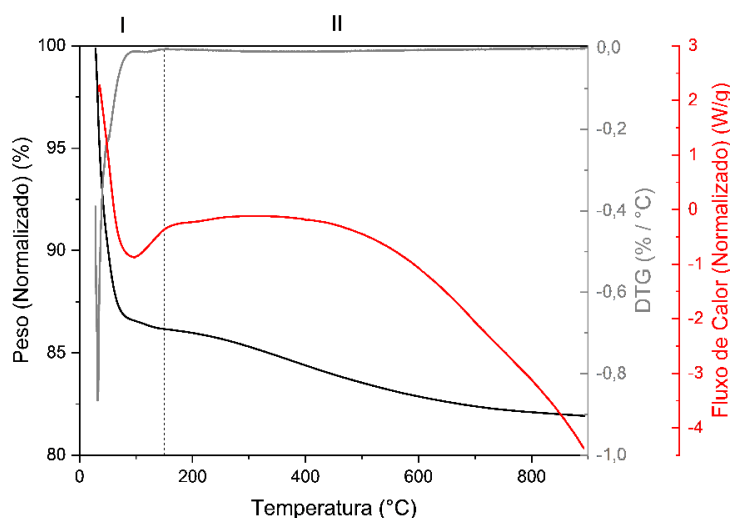
Figura 20: Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e distribuição de tamanhos de poros para a SBA-15.

### 3.2.4 Análise Térmica

A Figura 21 apresenta as curvas de TG/DTG e DSC para a SBA-15 obtidas em cadinho de platina e alumina, respectivamente. Para estas partículas, foram observadas a presença de dois eventos térmicos (I e II). O primeiro evento ocorreu entre  $\sim 25 - 150$  °C e foi atribuído à dessorção das moléculas de água na superfície da sílica, reduzindo o peso inicial da amostra em 13,7%. O segundo evento (4,2%) ocorreu entre  $150 - 900$  °C que foram atribuídos a moléculas de água mais fortemente ligadas à sílica e grupos Si-OH na superfície (PEDROSO et al., 2013;

CHRZANOWSKA; DERYLO-MARCZEWSKA, 2019) . No limite de temperatura avaliado (900 °C), a massa residual foi estimada em 82,1%.

A curva de DSC indicou a ocorrência de um evento endotérmico ( $\Delta H = -918,3 \text{ J/g}$ ) entre 35 – 160 °C (centrado em 97,7 °C) coerente com o fenômeno de dessorção da água verificado por TG e um segundo evento exotérmico observado até o encerramento do experimento indicando a degradação dos silanóis.



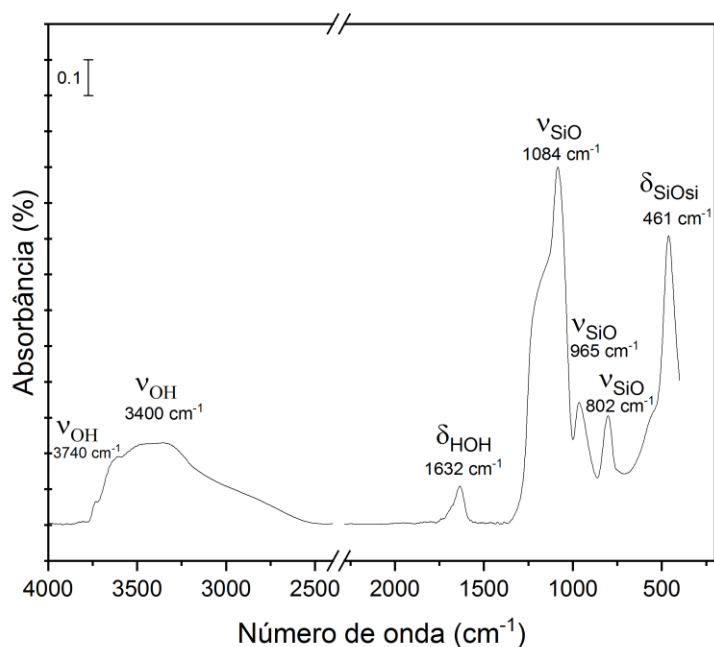
**Figura 21: Curvas de TG/DTG e DSC para a SBA-15.** As medidas de TG foram tomadas em cadinho de platina e as medidas de DSC em cadinho de alumina com etapa de estabilização a 35 °C.

### 3.2.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier

A identificação das bandas de vibração molecular no espectro de FTIR permite a caracterização química das amostras, além da possibilidade de indicar a presença de impurezas. A Figura 22 apresenta o espectro obtido para a SBA-15 pura onde foram identificadas todas as bandas de vibração de estiramento ( $\nu$ ) e flexão ( $\delta$ ) características dos grupos químicos funcionais que compõem este material.

Na região de altas energias, observa-se uma banda intensa e ampla de 3700 a 3100  $\text{cm}^{-1}$  (centrada em 3400  $\text{cm}^{-1}$ ) atribuída às vibrações de estiramento da ligação  $\nu_{\text{O-H}}$  dos grupos silanóis e moléculas de água adsorvidas. Também se observa uma pequena banda em 3740  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde à vibração de estiramento da ligação  $\nu_{\text{O-H}}$  dos grupos silanóis livres (IZQUIERDO-BARBA et al., 2010).

A banda em  $1632\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída a flexão das ligações O-H das moléculas de água adsorvidas na superfície da sílica  $\delta_{\text{HOH}}$ . Já a banda de intensidade média em  $965\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração de estiramento na ligação  $\nu_{\text{Si-O}}$  dos silanóis. As demais posições observadas correspondem às vibrações características dos grupos siloxanos (Si-O-Si). A vibração de flexão foi observada em  $\delta_{\text{Si-O-Si}}$  em  $461\text{ cm}^{-1}$  e as bandas de vibração de estiramento  $\nu_{\text{Si-O-Si}}$  assimétrica e simétrica em  $1084\text{ cm}^{-1}$  e  $802\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. (IZQUIERDO-BARBA et al., 2010)



**Figura 22: Espectro de FTIR para a SBA-15.** Espectro normalizado e com corte na região de  $2400\text{-}2480\text{ cm}^{-1}$  que contém as vibrações relacionadas ao dióxido de carbono atmosférico.

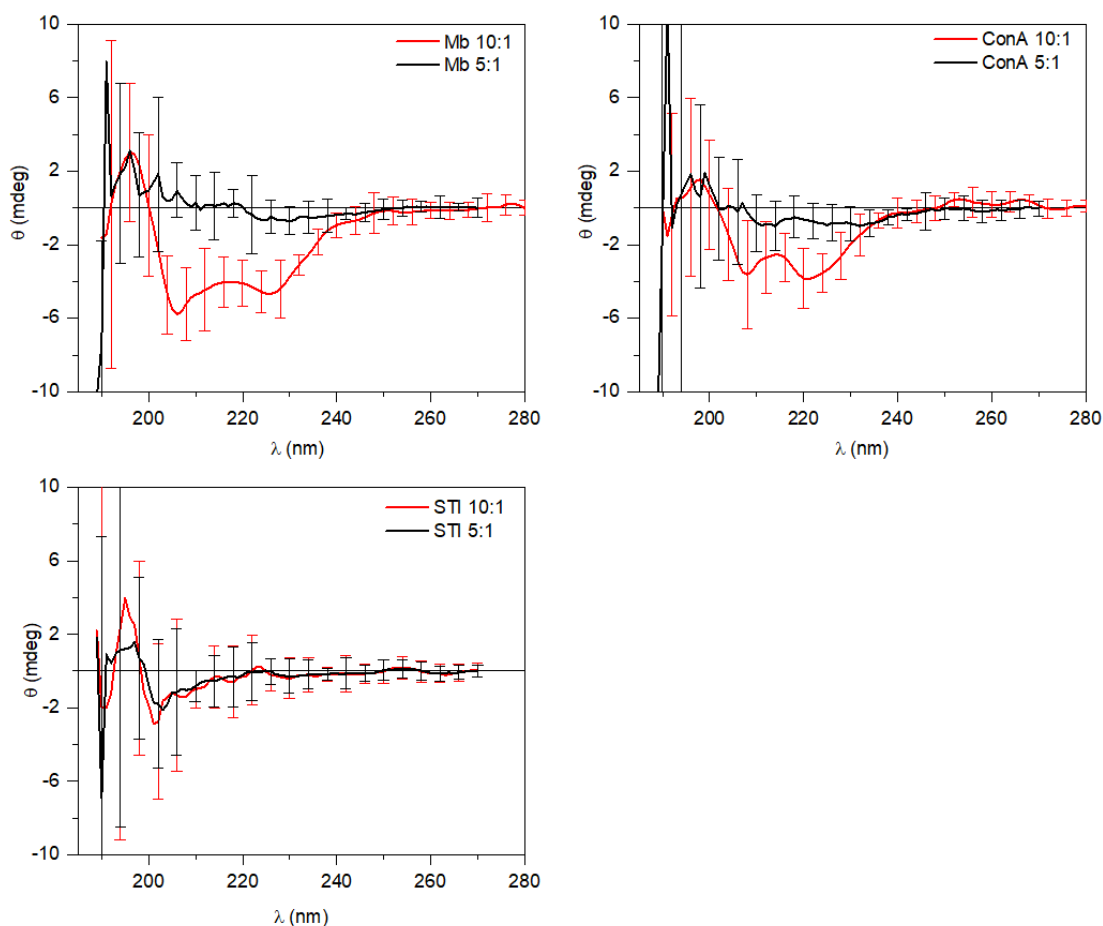
### 3.3 Estudos sobre a incorporação de modelos proteicos em SBA-15

#### 3.3.1 Caracterizações das estruturas proteicas

##### 3.3.1.1 Ensaios de espectroscopia de dicroísmo circular

Tentativas sem sucesso foram realizadas para a medição dos espectros de CD dos compósitos. Após a suspensão dos compósitos em solução tamponada, as amostras apresentaram

alguns aspectos físicos que dificultaram/impediram a aquisição de espectros de boa qualidade com CD convencional tornando as análises de CD com métodos quantitativos (como aquelas apresentadas no Capítulo 3.1.1) totalmente inviáveis. Para exemplificar, alguns espectros de CD coletados são apresentados na Figura 23. Em todos os casos foi observado um sinal de magnitude relativamente pequena comparada ao da proteína sozinha em solução, resultando ainda numa grande incerteza associada a cada ponto (altos valores para as barras de erro).



**Figura 23: Espectros de CD para os compósitos após suspensão em solução tamponada.** Espectros gerados a 25 °C em solução tampão fosfato a pH 7,0.

Os resultados foram comuns a todas as amostras de compósitos investigadas, isto é, independente da proteína e/ou de sua taxa de incorporação, de forma que acreditamos que estejam relacionados aos aspectos experimentais, possivelmente da preparação e/ou, estocagem prolongada da amostra, mas não associados a alterações estruturais provocadas pela interação com a sílica. Os

aspectos e fenômenos físicos que, possivelmente, ocasionaram as limitações destas medidas são descritos a seguir:

- **Espalhamento extra:** o espalhamento de luz provocado pelas próprias partículas de sílica em suspensão interfere significativamente na intensidade do sinal de CD que chega ao detector dificultando uma análise mais acurada.
- **Decantação das partículas:** o feixe de luz incidente durante as medidas de CD deve atingir uma amostra homogênea. Contudo, as partículas de SBA-15 contendo as proteínas imobilizadas podem decantar rapidamente. Embora o conjunto de parâmetros de leitura do equipamento tenham sido modificados (diminuição do tempo de integração para 0,25 s e aumento da velocidade de varredura em 100 nm/min) além de efetuar uma nova homogeneização a cada medida, tais procedimentos não foram suficientes para eliminar o efeito da decantação das partículas dos compósitos.
- **Partículas aglomeradas:** as amostras apresentaram um aspecto granular/floculento após a suspensão em solução aquosa que favoreceu o aumento do tamanho global e a decantação das partículas de sílica contendo as proteínas imobilizadas. Embora houvesse sido realizadas tentativas de homogeneização da amostra em pó e diminuição do tamanho dos aglomerados (com almofariz e pistilo além de centrifugação) quando em solução, não foram observadas melhoras na qualidade dos espectros de CD.

Para superar as dificuldades experimentais encontradas sugere-se três alternativas a serem empregadas futuramente:

- **Medidas com SRCD.** Devido ao alto fluxo de fótons no feixe de luz incidente das instalações síncrotron é possível observar a melhora da relação sinal-ruído, aumento da sensibilidade a alterações conformacionais, além de superar as limitações relacionadas a absorção por componentes da solução tampão e espalhamento extras como os observados para as partículas de sílica (LEES; WALLACE, 2002; WALLACE, 2009). Neste trabalho, medidas de SRCD com os compósitos não puderam ser realizadas em função da impossibilidade de realizar novas visitas às linhas de SRCD européias em função da pandemia de COVID-19.



- **Medidas de SRCD com feixe de luz passando verticalmente na cubeta de amostras.** Há um novo sistema de medidas de SRCD disponível na linha AU-CD do síncrotron ASTRID2, desenvolvido justamente para amostras que tendem a decantar em solução, impedindo a medida de CD em sistemas tradicionais. Este sistema se chama “*Periscope*” e foi criado e desenvolvido pelos cientistas da Universidade de Aarhus, onde está o ASTRID2. Propostas de utilização deste sistema serão enviadas para solucionar nossa limitação encontrada até o momento com o CD dos compósitos.
- **Desenvolvimento de um porta-amostras “giratório”.** O desenvolvimento de um novo porta-amostras com sistema de rotação durante a medida de CD, a ser acoplado no equipamento de CD convencional J-715 é uma alternativa que estamos pensando para a tomada medidas de partículas que sofrem um acentuado processo de decantação. Com tal sistema, pode-se manter as partículas de sílica em suspensão durante tempo suficiente para uma aquisição de dados adequada.

Contudo, de modo a superar esta limitação, incluímos neste estudo as medidas da adsorção em superfícies sólidas (Seção 3.1.1.2) que indicam o comportamento esperado para os espectros de CD para cada proteína, visto que a redução do conteúdo hídrico ocorre por processos idênticos (evaporação) nos dois procedimentos e incluem o efeito do substrato quimicamente similar. Diferenças entre o procedimento de incorporação e a formação de filmes semidesidratados podem ocorrer devido à somatização dos efeitos da temperatura e do tempo de incorporação. Contudo, tais efeitos mostraram pouca influência sobre os espectros em condições extrapoladas conforme o experimento de incubação com SRCD (Seção 3.1.1.1.1). Ainda, como alternativa às análises estruturais que seriam realizadas com CD, análises qualitativas com a técnica de FTIR são apresentadas a seguir de forma complementar.

### 3.3.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier

As Figuras 24, 25 e 26 mostram os espectros de FTIR para cada proteína com seus respectivos compósitos (10:1 e 5:1) e a SBA-15. Como não foram observadas diferenças entre os espectros da SBA-15 e a amostra SBA-15T (amostra controle), os comparativos são apresentados sem perda de informação.

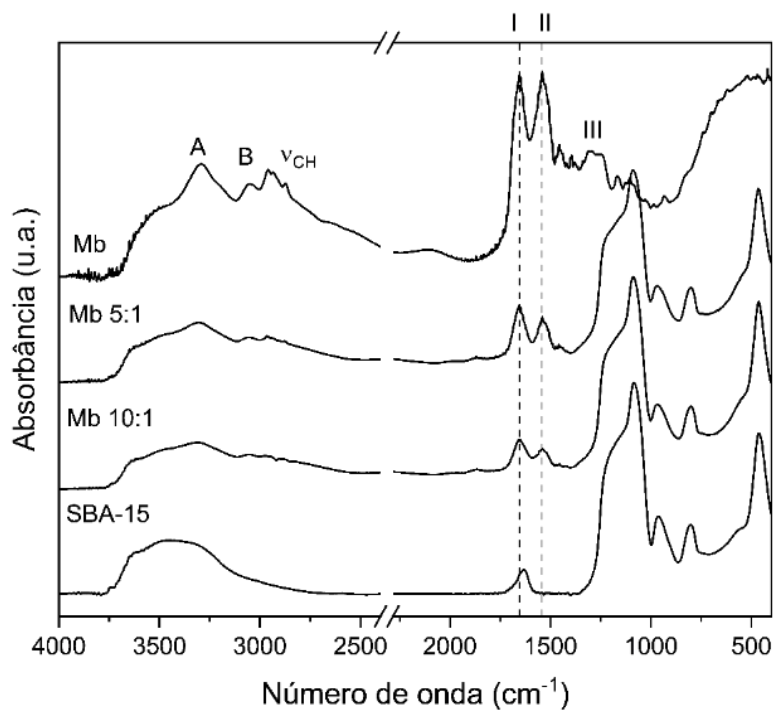


Figura 24: Comparativos entre os espectros de FTIR para a proteína Mb, compósitos e SBA-15.

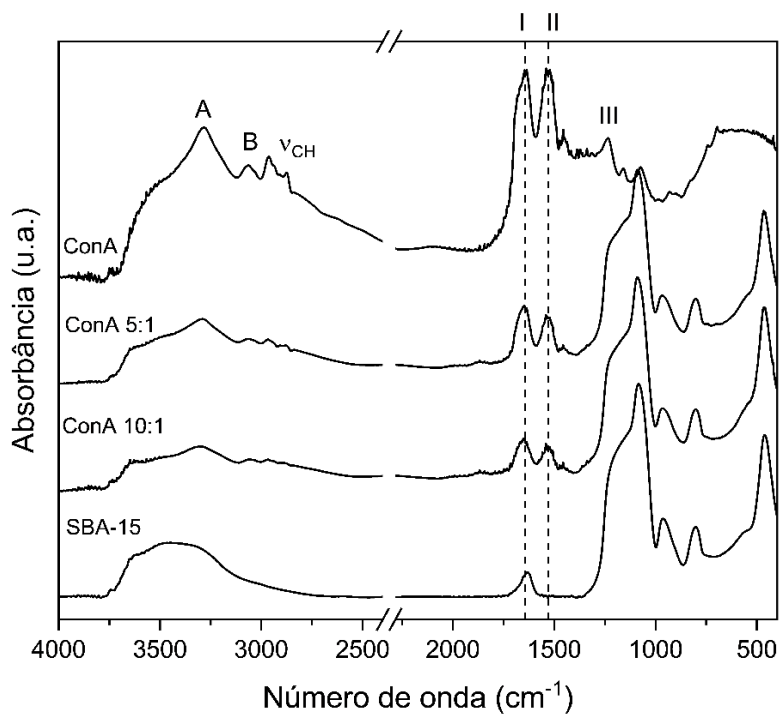


Figura 25: Comparativos entre os espectros de FTIR para a proteína ConA, compósitos e SBA-15.

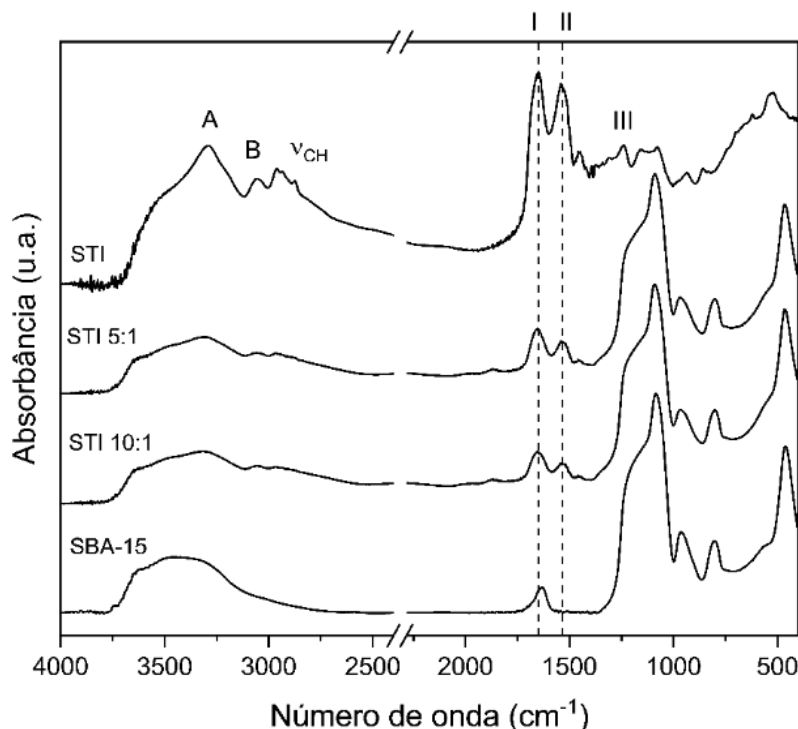


Figura 26: Comparativos entre os espectros de FTIR para a proteína STI, compósitos e SBA-15.

As posições de algumas das bandas de vibração características do grupo amida da cadeia polipeptídica (amidas A, B, I, II e III) foram identificadas nos espectros de FTIR das proteínas liofilizadas conforme indicado na Tabela 8. Ainda, três bandas localizadas na região de altas energias foram atribuídas às vibrações de estiramento em ligações CH dos grupos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. As vibrações assimétricas nos grupos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  foram localizadas em torno de 2960 e 2935  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente e a banda de estiramento simétrico do grupo  $\text{CH}_3$  em torno de 2875  $\text{cm}^{-1}$  (CASAL; MANTSCH, 1984; NOVAK; GRDADOLNIK, 2017).

Os espectros dos compósitos exibiram uma combinação de bandas específicas das proteínas e da SBA-15. No intervalo de 1400 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , foi observada a predominância das vibrações previamente atribuídas aos grupos funcionais da SBA-15. Já a presença das proteínas foi confirmada pela mudança na forma de linha do espectro da SBA-15 pela presença das amidas I e II (1700 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ ) e as demais bandas atribuídas às proteínas (3300 -2850  $\text{cm}^{-1}$ ) com intensidades atenuadas.

**Tabela 8:** Posicionamentos das bandas de vibração do grupo amida no espectro de FTIR das proteínas liofilizadas e respectivas vibrações moleculares.

Nomenclatura	Mb (cm <sup>-1</sup> )	ConA (cm <sup>-1</sup> )	STI (cm <sup>-1</sup> )	Principais vibrações moleculares no grupo amida no espectro de FTIR para proteínas (BARTH, 2007)
Amida A	~3292	~3283	~3292	Vibrações $\nu_{N-H}$
Amida B	~3055	~3065	~3057	Vibrações $\nu_{N-H}$
Amida I	~1654	~1641	~1648	Principalmente contribuições das vibrações $\nu_{C=O}$ e também as vibrações $\nu_{C-N}$
Amida II	~1541	~1532	~1541	Principalmente contribuições das vibrações $\delta_{N-H}$ (no plano) e também das vibrações $\nu_{C-N}$
Amida III	~1302	~1234	~1240	Vibrações $\nu_{C-N}$ e $\delta_{NH}$ (no plano) acopladas em fase e contribuições das vibrações $\nu_{C-C}$ e $\delta_{CO}$ (no plano)

Nota: As posições das amidas têm como fonte o próprio autor.

Nota: As informações sobre as vibrações moleculares foram extraídas de BARTH, 2007 e apresentadas na forma de tabela.

Em especial, a amida I é a banda do espectro de FTIR mais utilizada na avaliação da estrutura secundária, embora as amidas II e III também contenham esse tipo de informação (KAIDEN; MATSUI; TANAKA, 1987; BARTH, 2007). Esta análise se dá, pois, a amida I é altamente sensível às ligações de hidrogênio entre os grupos C=O e N-H (Tabela 8) que estabilizam cada EES. Dessa forma, eventuais alterações estruturais, podem também ser observadas com o monitoramento da amida I, isto porque a amida I representa uma combinação de bandas que individualmente correspondem a ESS distintos que podem ser identificados e também estimados quantitativamente (WI; PANCOSKA; KEIDERLING, 1998). Segundo BYLER E SUSI 1986, em um estudo com um conjunto de 21 proteínas, que incluiu as três proteínas aqui estudadas (Mb, ConA e STI), os intervalos de correspondência para cada EES na região da amida I foram: folhas- $\beta$  (1620 - 1640 cm<sup>-1</sup> e 1671 - 1679 cm<sup>-1</sup>), desordenada (1641 - 1649 cm<sup>-1</sup>), hélice- $\alpha$  (1650 - 1657 cm<sup>-1</sup>) e voltas- $\beta$  (1659 - 1671 cm<sup>-1</sup> e 1681 - 1696 cm<sup>-1</sup>).

Os espectros das proteínas e respectivos compósitos foram analisados na região das amidas I e II para verificar a preservação da estrutura majoritária após a incorporação (KUMOSINSKI; FARRELL, 1993). A Figura 27 apresenta estes comparativos juntamente a segunda derivada do espectro para ressaltar a presença dos EES. A abordagem qualitativa foi escolhida devido à presença da vibração de estiramento da ligação -OH no espectro da SBA-15 que coincide com a

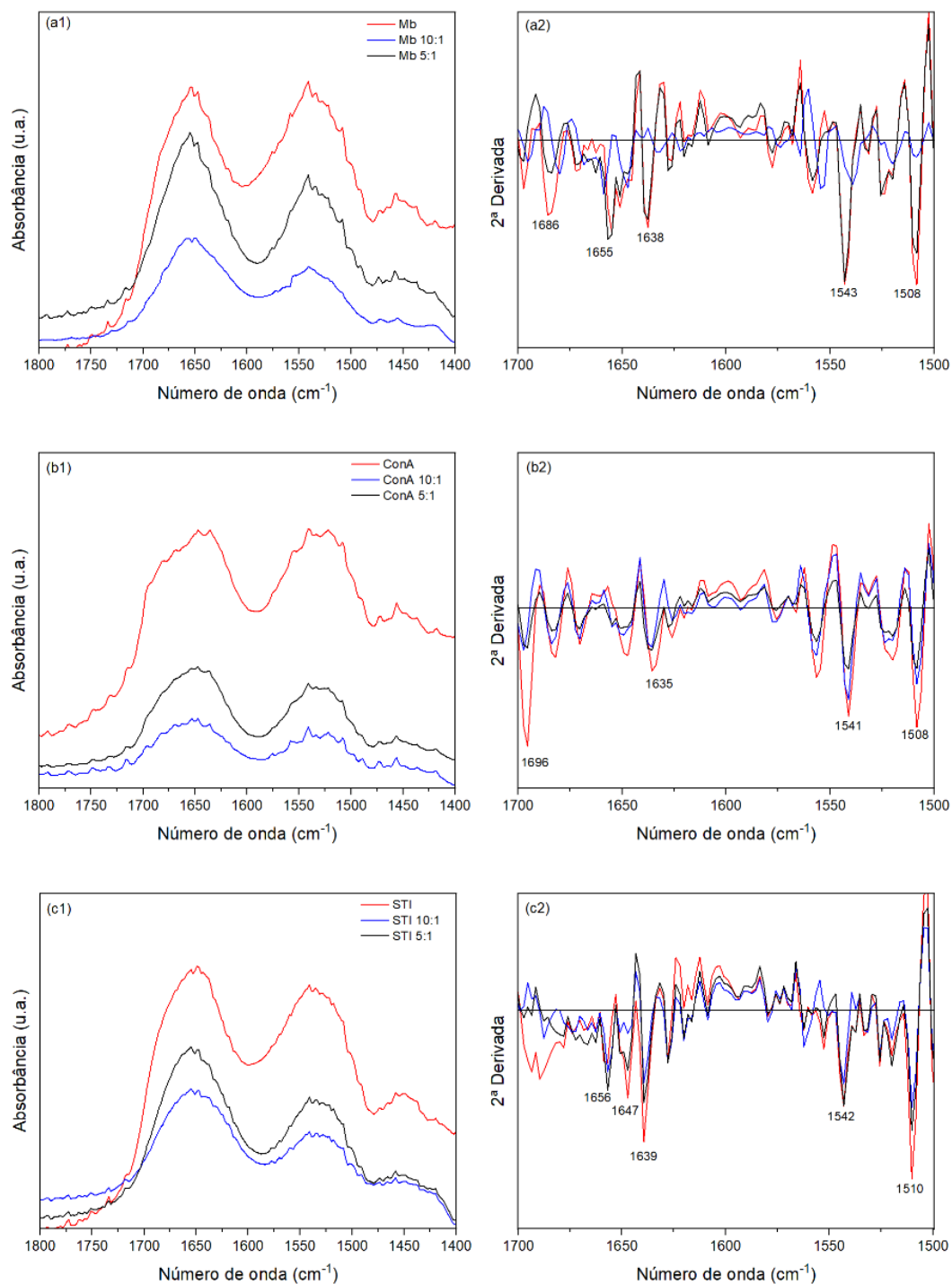
região da amida I dificultando as análises quantitativas com métodos de aumento de resolução (segunda derivada, autodesconvolução de Fourier e ajustes de picos) (KAUPPINEN et al., 1981; YANG et al., 1985).

Na região da amida I, a segunda derivada do espectro da proteína Mb apresentou um pico centralizado em  $1655\text{ cm}^{-1}$  indicando a presença de estruturas helicoidais. Outros dois picos característicos de estruturas tipo- $\beta$  podem, neste caso, corresponder a pequenas segmentos da cadeia que conectam as hélices (YANG et al., 1985; BYLER; SUSI, 1986). Todavia, diferenças relacionadas ao estado liofilizado e nativo já foram reportadas para proteínas toda- $\alpha$  (incluindo a Mb) que corresponde ao aumento de conformações do tipo- $\beta$  e diminuições de hélices- $\alpha$  após o processo de liofilização (KAIDEN; MATSUI; TANAKA, 1987; GRIEBENOW; KLIBANOV, 1995). No entanto, tal efeito não pode ser confirmado sem comparativos com as proteínas em solução. Um perfil similar ao da proteína liofilizada foi observado no compósito Mb 5:1, já no espectro do compósito Mb 10:1, foi observado um deslocamento em  $4\text{ cm}^{-1}$  para números de ondas maiores em relação à proteína.

A segunda derivada do espectro da proteína ConA apresentou dois picos característicos de folhas- $\beta$  coerente com o conteúdo estrutural majoritário (NOVAK; GRDADOLNIK, 2017; SADAT; JOYE, 2020). Os compósitos desta proteína apresentaram as mesmas características que também correspondem a predominância de folhas- $\beta$  e voltas- $\beta$ . No caso da proteína STI, além do pico característico de estruturas desordenadas ( $1647\text{ cm}^{-1}$ ), foi observado um pico central que corresponde a conformações do tipo- $\beta$  posto que este tipo de estrutura também está presente em sua composição ( $\sim 30\%$ , conforme as análises com SRCD em solução aquosa). Além disso, como visto por ensaios com CD em placas de quartzo, durante a adsorção da proteína STI pode ocorrer um aumento em elementos estruturais mais ordenados em decorrência da diminuição de moléculas de água.

A posição da amida II indicou pouca diferença entre as três proteínas que pode estar relacionado a menor sensibilidade desta banda para a avaliação das estruturas secundárias com o método de análise aplicado (KUMOSINSKI; FARRELL, 1993). Ainda, é importante ressaltar que as contribuições das frações proteicas eventualmente desprotegidas ou desassociadas da sílica são indistinguíveis por FTIR daquelas que foram potencialmente preservadas nos compósitos, dessa forma, não se pode descartar que eventuais diferenças entre os espectros contenham contribuições

destes efeitos, bem como, diferenças entre o estado liofilizado das proteínas e o reidratado nos compósitos.



**Figura 27:** Ampliação do espectro de FTIR e a segunda derivada na região das amidas I e II para a Mb (a1 e a2), ConA (b1 e b2) e STI (c1 e c2) e respectivos compósitos.

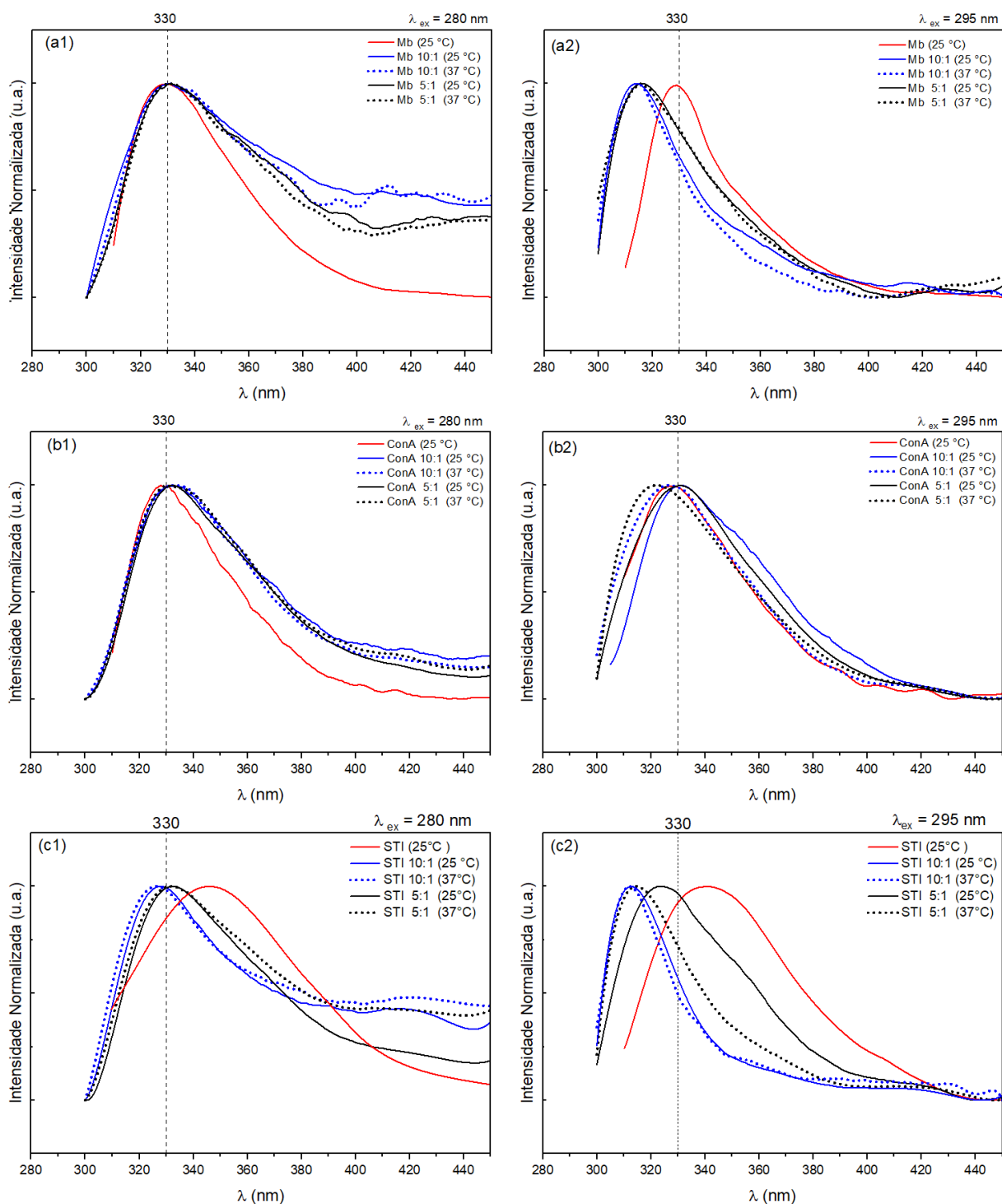
### 3.3.1.3 Espectroscopia de fluorescência

A Figura 28 mostra os comparativos entre os espectros de fluorescência para as proteínas e seus respectivos compósitos após a suspensão em solução tamponada a pH 7,0. Para as proteínas Mb e ConA, os comparativos para excitação em 280 nm apresentaram-se em alta conformidade com os espectros da proteína nativa (~330 nm). Este resultado sugere que a preservação do ambiente químico das sondas intrínsecas nos compósitos. Para a proteína STI foi observado um desvio para o azul de 18 e 14 nm para os compósitos 10:1 e 5:1, respectivamente, indicando um ambiente mais apolar ou protegido do solvente.

Um comportamento semelhante foi observado nos espectros obtidos com excitação a 295 nm. A proteína Mb, mostrou um desvio no máximo de emissão para comprimento de ondas menores (~315 nm) em relação ao seu estado nativo, sugerindo que após a imobilização em SBA-15, o ambiente em que os resíduos Trp estão localizados é mais protegido de interações com o solvente polar. O mesmo comportamento foi observado para a proteína STI. Já as medidas a 25 °C para os compósitos da ConA não apresentaram variações em relação ao seu estado nativo, mantendo a posição do máximo de emissão também nos compósitos. Entretanto, em 37 °C observou-se uma pequena variação de posicionamento (para 327 nm e 321 nm para os compósitos 10:1 e 5:1, respectivamente).

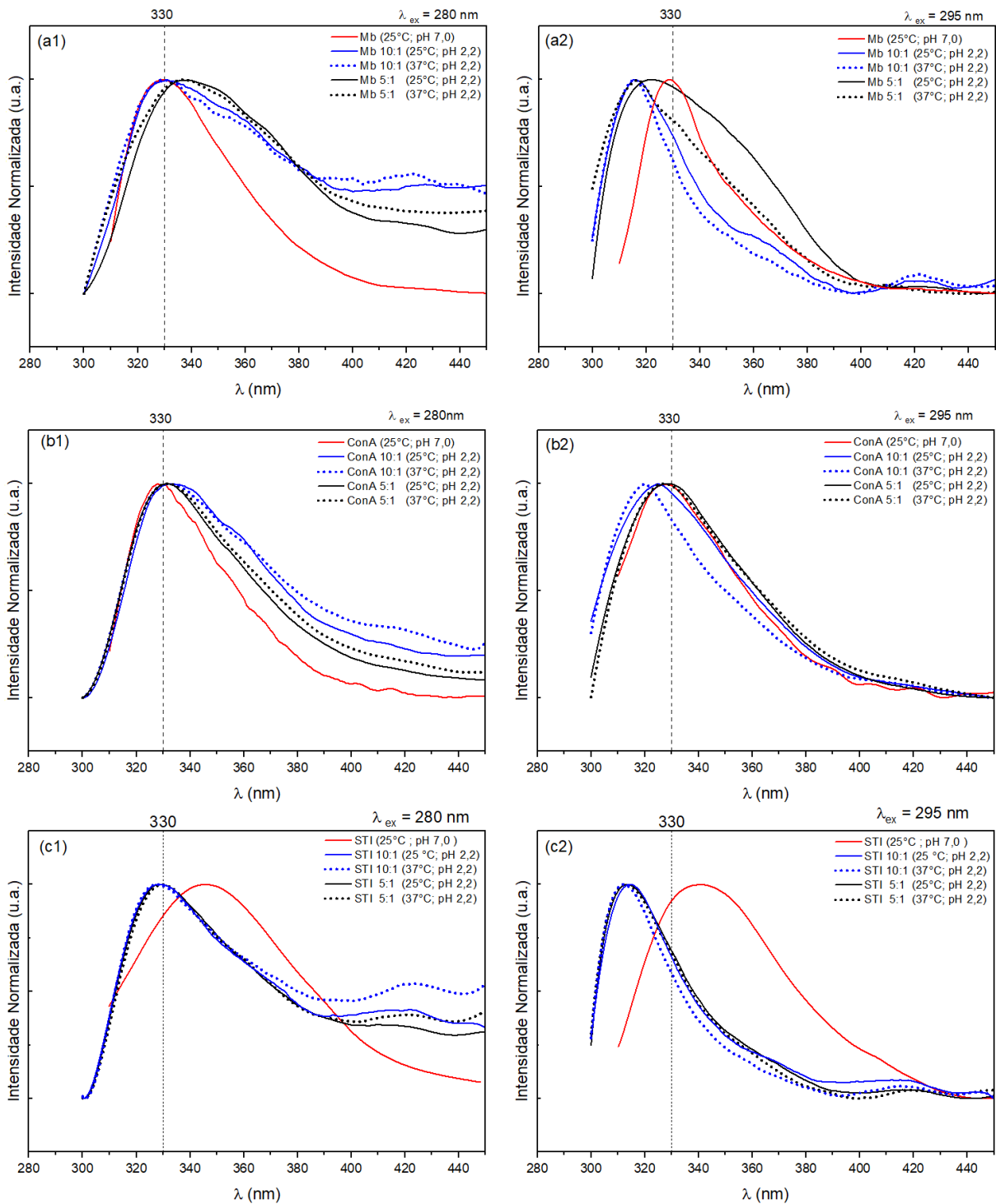
Não foram observados desvios para comprimentos de onda maiores que, a princípio, poderiam indicar que as sondas intrínsecas das proteínas incorporadas estariam mais expostas ao solvente. Este resultado sugere que os resíduos de Trp das proteínas imobilizadas SBA-15 estão ainda preservados de interações com o ambiente aquoso.

Para avaliar o efeito do pH sob os espectros de emissão, o mesmo experimento foi realizado após a suspensão dos compósitos em solução pH 2,2 a 25 °C e 37 °C. A Figura 29 mostra os espectros obtidos nestas condições em comparação com o espectro nativo de cada proteína (pH 7,0 a 25 °C).



**Figura 28: Comparativos entre espectros de fluorescência dos compósitos e proteínas em pH 7,0.** Espectros coletados a 25°C (linhas contínuas) e a 37 °C (linhas pontilhadas) para as proteínas Mb (a1 e a2); ConA (b1 e b2) e STI (c1 e c1) para excitação em 280 e 295 nm.





**Figura 29: Comparativos entre espectros de fluorescência dos compósitos em pH 2,2 e proteínas em pH 7,0.** Espectros coletados a 25°C (linhas contínuas) e a 37 °C (linhas pontilhadas) para as proteínas Mb (a1 e a2); ConA (b1 e b2) e STI (c1 e c1) para excitação em 280 e 295 nm.

Nesta nova situação (solução ácida), os máximos de emissão nos espectros dos compósitos Mb 10:1 quando excitados a 280 nm sofreram pouca variação em relação ao estado nativo, sugerindo proteção à proteína imobilizada mesmo quando exposta ao meio ácido de forma independente da temperatura. No entanto, os compósitos 5:1 apresentaram desvio (7 nm) para comprimentos de ondas maiores sugerindo maior exposição ao solvente. Este resultado pode ter relação com a sensibilidade da Mb ao meio ácido e a possibilidade de uma fração maior de proteínas nas amostras 5:1 estarem adsorvidas na superfície externa da SBA-15. Já com excitação em 295 nm, os espectros apresentaram comportamento semelhante aos apresentados em solução pH 7,0, sustentando a hipótese de que a SBA-15 ofereça um ambiente mais protegido de interações com o solvente para os resíduos de Trp.

A variação de pH para os compósitos da ConA sugere proteção estrutural a esta proteína dado que a posição dos máximos foi equivalente à conformação nativa. Com exceção dos compósitos 10:1 que, quando excitados em 295 nm, apresentaram deslocamentos para comprimentos de ondas menores. Para a proteína STI, os espectros de emissão de fluorescência apresentaram máximos centrados próximos a 330 nm para excitação em 280 nm e deslocamentos para comprimentos de onda menores com a excitação em 295 nm. Sendo este comportamento similar aos resultados em solução pH 7,0, pode-se inferir que a microvizinhança das sondas intrínsecas do modelo de estrutura desordenada sofreu alterações mais acentuadas do que as demais proteínas.

### 3.3.2 Estudos sobre a adsorção

#### 3.3.2.1 Espalhamento de raios X a baixos ângulos

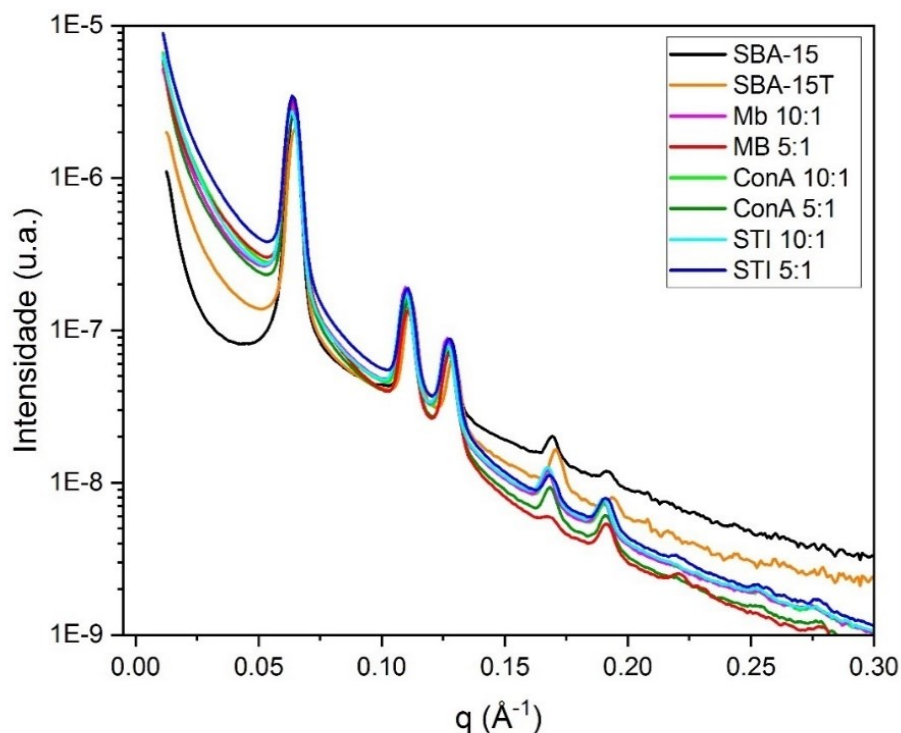
O parâmetro de rede ( $a$ ) e as distâncias interplanares ( $d$ ) são apresentados na Tabela 9 para todas as amostras que contêm SBA-15. Todos os compósitos e a amostra SBA-15T apresentaram baixa variação (< 1%) no parâmetro de rede em relação às partículas de SBA-15 sintetizadas. Este resultado indica a alta estabilidade estrutural destes materiais mesmo após os processos de suspensão em solução aquosa e de aquecimento na estufa aplicados durante a incorporação das proteínas.

**Tabela 9:** Parâmetro de rede e distâncias interplanares para todas as amostras calculados para cada pico indexado.

Amostra	(100)		(110)		(200)		(210)		(300)	
	d (nm)	a (nm)	d (nm)	a (nm)	d (nm)	a (nm)	d (nm)	a (nm)	d (nm)	a (nm)
SBA-15	9,87	11,39	5,68	11,36	4,90	11,31	3,71	11,33	3,29	11,39
SBA-15T	9,74	11,24	5,64	11,27	4,87	11,24	3,67	11,22	3,24	11,24
Mb 10:1	9,87	11,40	5,73	11,46	4,96	11,45	3,75	11,47	3,31	11,47
Mb 5:1	9,87	11,40	5,68	11,35	4,92	11,35	3,75	11,47	3,29	11,40
ConA 10:1	9,87	11,40	5,73	11,46	4,96	11,45	3,75	11,47	3,29	11,40
ConA 5:1	9,87	11,40	5,68	11,35	4,92	11,35	3,73	11,40	3,29	11,40
STI 10:1	9,87	11,40	5,73	11,46	4,96	11,45	3,75	11,47	3,31	11,46
STI 5:1	9,87	11,40	5,68	11,35	4,92	11,35	3,73	11,40	3,29	11,40

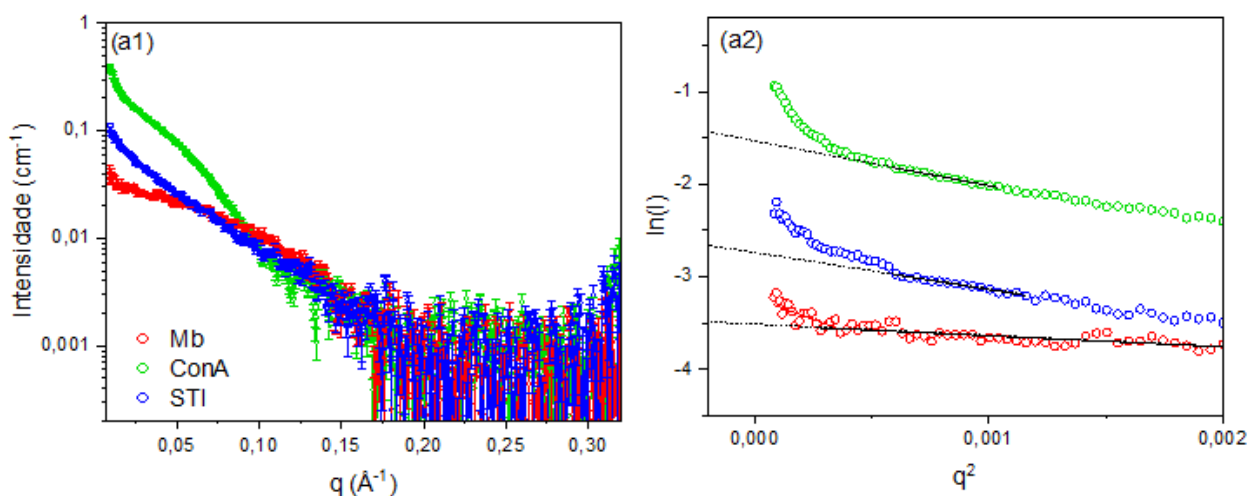
As curvas de SAXS das amostras com conteúdo proteico apresentaram aumento nas intensidades de espalhamento em relação às amostras SBA-15 e SBA-15T na região abaixo de  $0,05 \text{ \AA}^{-1}$  conforme mostrado na Figura 30. Este resultado sugere a presença de partículas maiores e pode estar relacionado a presença de estados agregados ou aglomerados proteicos nas amostras. Dessa forma, sugere-se que uma parcela das proteínas nos compósitos pode estar alocada fora da mesoporosidade da SBA-15. Diferenças sutis entre as duas proporções de incorporação (10:1 e 5:1, em massa) também foram observadas nesta mesma região das curvas de espalhamento. Nota-se que os compósitos 5:1 com cerca de 20% de proteínas em sua composição apresentam deslocamentos maiores na região inicial das curvas em relação aos compósitos 10:1 (~ 10% de proteína).

Já os deslocamentos nas curvas na região de ângulos maiores indicando a redução na intensidade de espalhamento podem ser atribuídos à adsorção de proteínas e sais nos mesoporos e ao preenchimento dos microporos pela solução tampão (GARCIA et al., 2016). Nesta região, os compósitos 5:1 apresentaram maiores deslocamentos nas curvas de espalhamento em relação à proporção 10:1, possivelmente em decorrência de uma maior fração de proteínas imobilizada nos mesoporos destas amostras.



**Figura 30:** Curvas de espalhamento de raios X a baixos ângulos para todas as amostras contendo SBA-15. Curvas geradas com as amostras na forma de pó.

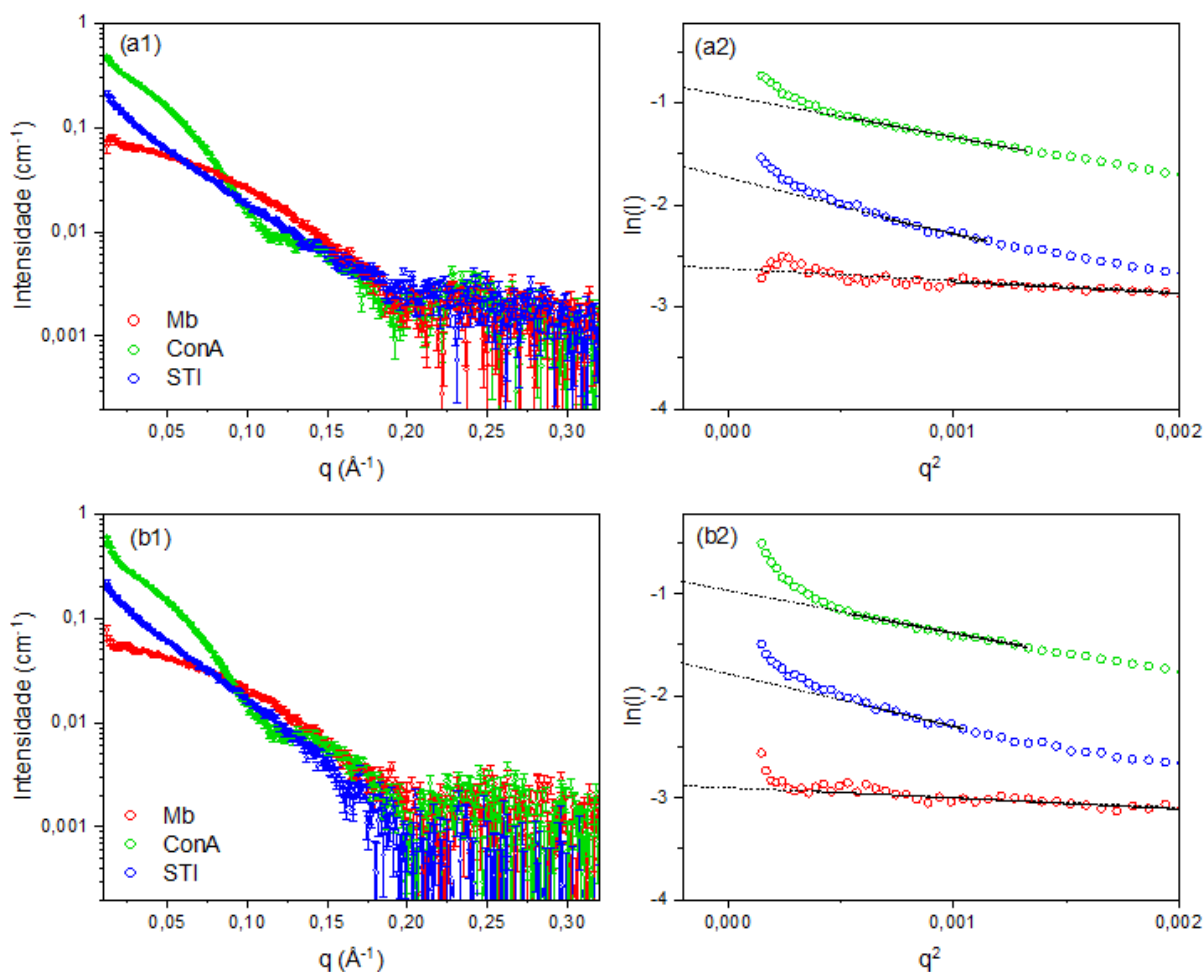
Para verificar a presença de aglomerados e/ou agregados proteicos que não decorrem necessariamente da interação com a SBA-15, foram coletadas medidas de SAXS para as três proteínas sob a mesma concentração (6 mg/mL) usada na incorporação dos compósitos 5:1. As Figuras 31 (a1 e a2) mostram, respectivamente, as curvas de SAXS para as proteínas em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0) e a análise de Guinier na região de ângulos muito pequenos. A região ascendente (afastamento da linha de tendência) na Figura 31 (a2) confirma a presença de agregados ou aglomerados (MERTENS; SVERGUN, 2010) que podem estar associados às condições das amostras, tais como a concentração de proteína, a força iônica e sais presentes no meio de incorporação (PUTNAM et al., 2007). Assim, a agregação pode, muitas vezes, ser atenuada ou eliminada a partir de alterações nas condições das amostras que reduzam as interações proteína-proteína.



**Figura 31: Curvas de SAXS para as proteínas e respectivas análises na região de Guinier.** (a1) Medidas tomadas a  $25^\circ\text{C}$  em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0) e (a2) respectivos ajustes lineares na região de Guinier. As estimativas para o  $R_G$  foram tomadas por um ajuste linear na região indicada em preto.

Para melhor avaliar a hipótese da relação entre a presença de agregados e a baixa força iônica da solução tampão usada na incorporação, foram coletadas novas medidas de SAXS após a adição de  $75 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaCl na composição da solução tampão original mantendo as demais condições da amostra. No entanto, conforme se observa na Figura 32, a adição de sal não eliminou o efeito de agregação indicando que ainda há forte interação entre as moléculas nas novas condições avaliadas. Dessa forma, a hipótese de que a agregação observada tenha relação com a concentração das proteínas usadas na incorporação é mais provável.

A Tabela 10 apresenta as estimativas para o  $R_G$  de cada proteína obtidas por ajustes lineares (em preto) na região indicada da Figura 31 (a2) e Figuras 32 (a2 e b2) em comparação com valores reportados na literatura para sistemas monodispersos. Apenas variações sutis no  $R_G$  das três proteínas foram observadas em relação às amostras em solução tampão original. Contudo, é importante ressaltar que as estimativas para o  $R_G$  são ditas superestimadas para sistemas com formação de estados agregados (MERTENS; SVERGUN, 2010).



**Figura 32:** Curvas de SAXS para as proteínas e respectivas análises na região de Guinier após aumento da força iônica da solução tampão. Medidas tomadas a 25°C em solução tampão (pH 7,0) após a adição de (a1) 75 mmol L<sup>-1</sup> e (b1) 150 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl na composição da solução tampão original e os respectivos ajustes lineares na região de Guinier (a2 e b2).

**Tabela 10:** Estimativas para o raio de giro das proteínas com a aproximação de Guinier

	$R_G^{Exp}$ (a)	$R_G^{Exp}$ (b)	$R_G^{Exp}$ (c)	$R_G$ (d)
Mb	1,89 ±0,09 nm	1,82 ±0,02 nm	1,80 ±0,03 nm	1,75 nm (KATAOKA et al., 1995)
ConA	3,80 ±0,06 nm	3,53 ±0,03 nm	3,52 ±0,05 nm	2,86 nm (PALLAROLA et al., 2010)
STI	3,48 ±0,06 nm	3,76 ±0,19 nm	3,98 ±0,20 nm	2,89 nm (LIU et al., 2016)

- (a) Medidas em solução tampão original
- (b) Medidas após a adição de 75 mmol L<sup>-1</sup>
- (c) Medidas após a adição de 150 mmol L<sup>-1</sup>
- (d) Valores reportados na literatura

## 3.3.2.2 Isotermas de adsorção de nitrogênio

As isotermas de adsorção/ dessorção e a distribuição de tamanho de poros são apresentados na Figura 33 para as amostras SBA-15 pura (SBA-15) e a amostra controle (SBA-15T). As diferenças observadas entre as curvas apresentadas decorrem da presença de sais da solução que também pode adentrar nos mesoporos da SBA-15 durante a incorporação (GARCIA et al., 2016). Este efeito pode ser verificado pela redução da área superficial específica (S) e volume de poros (V) em 36% e 13%, respectivamente, em relação aos mesmos parâmetros determinados para SBA-15 pura.

Os mesmos comparativos para as amostras com conteúdo proteico são apresentados nas Figuras 34, 35 e 36. Nota-se que as curvas não mudaram quanto à forma, isto é, o perfil de adsorção continua sendo de material mesoporoso (*loop* de histerese do tipo H1) que, junto a análises de SAXS, confirmam a integridade da mesoescala nos compostos (MARIANO-NETO et al., 2014; GARCIA et al., 2016). Dado que os sais da solução tampão também promovem a diminuição dos parâmetros texturais de interesse (S e V), a análise comparativa é melhor apresentada em relação à amostra SBA-15T.

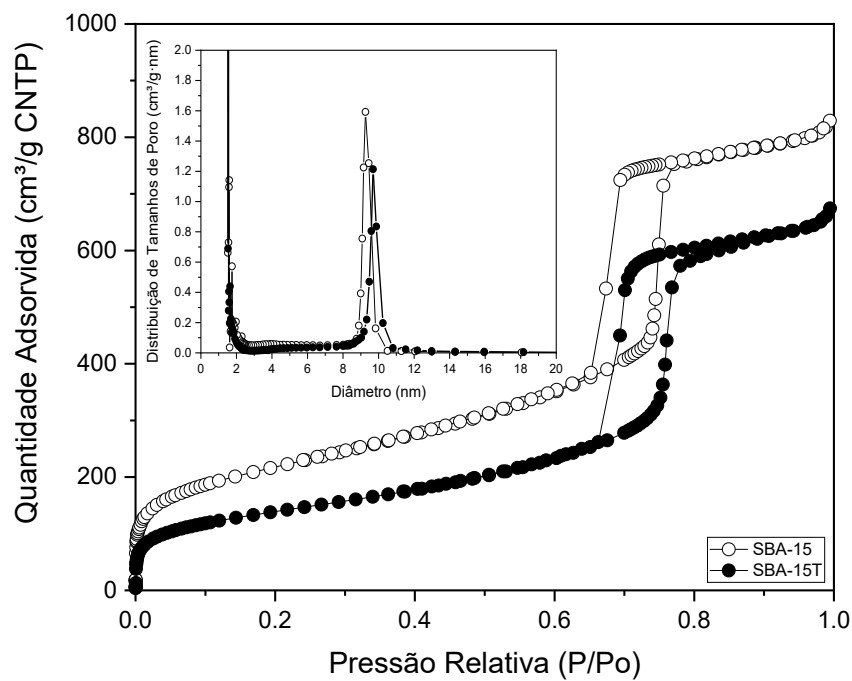


Figura 33: Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e distribuição de tamanho de poros para as amostras SBA-15 e SBA-15T.

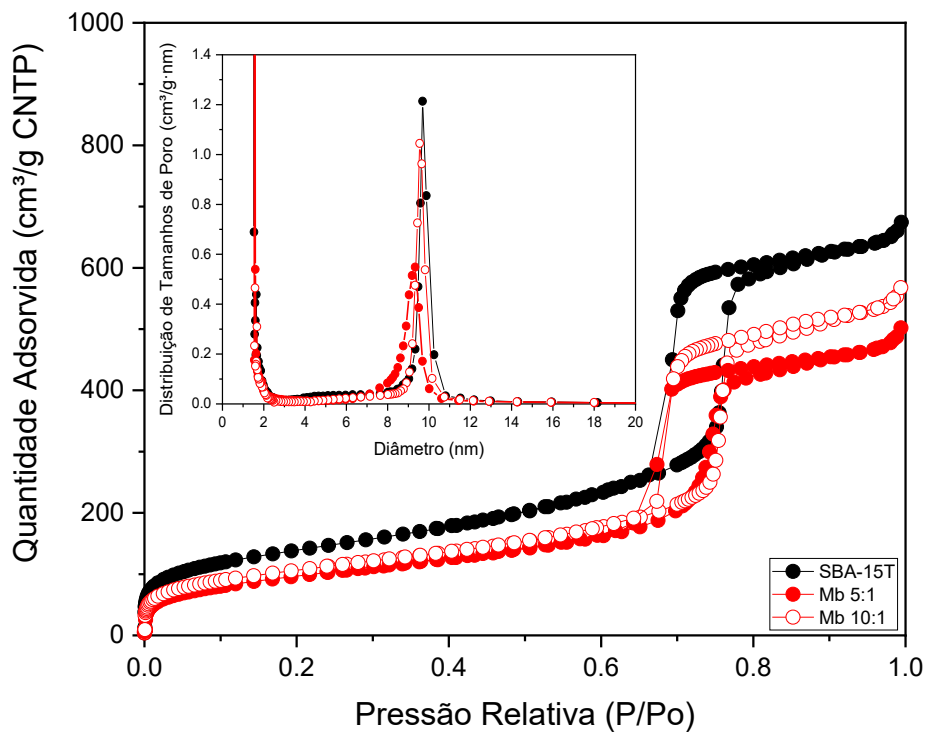


Figura 34: Isothermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e distribuição de tamanho de poros para as amostras contendo Mb.

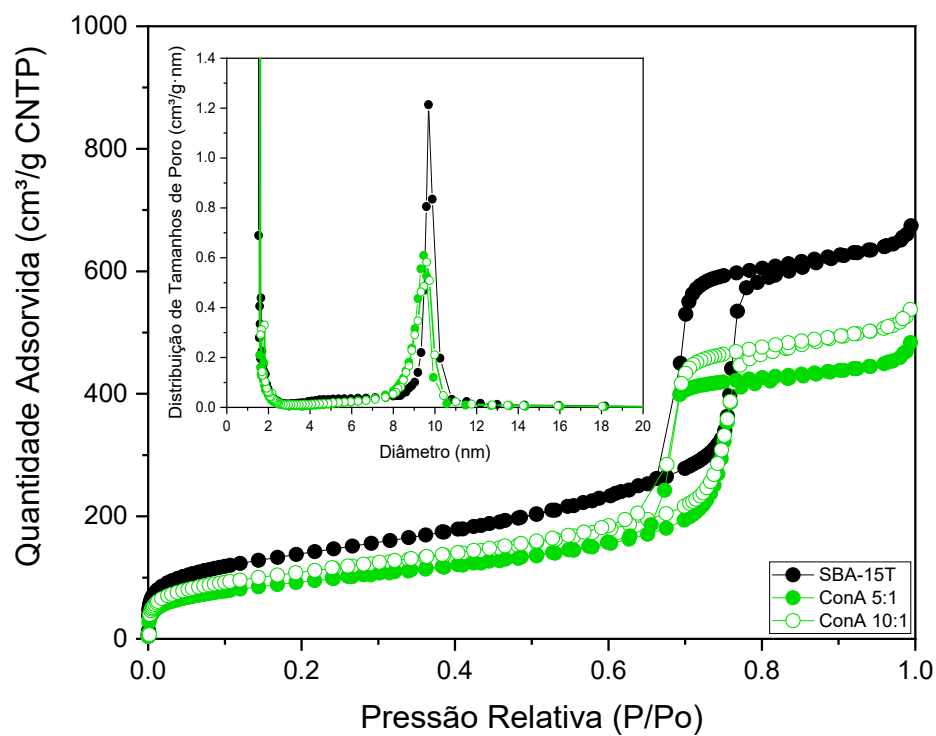
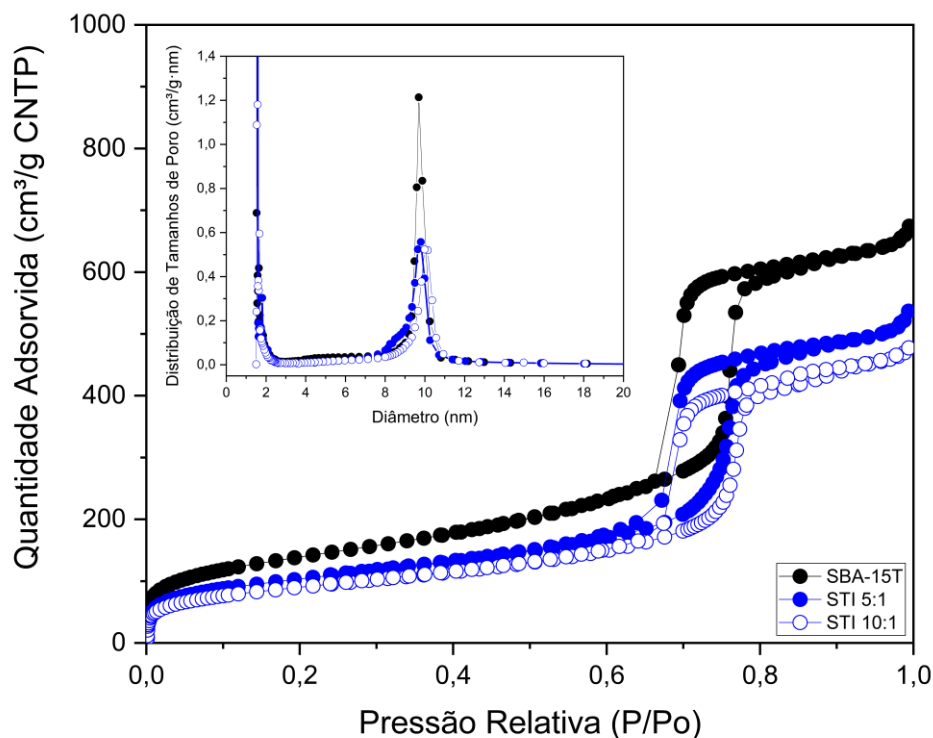


Figura 35: Isothermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e distribuição de tamanho de poros para as amostras contendo ConA





**Figura 36:** Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e distribuição de tamanho de poros para as amostras contendo STI

A Tabela 11 apresenta o conjunto de parâmetros texturais ( $S$ ,  $V$  e  $D$ ) estimados para cada amostra e as reduções percentuais da área superficial ( $\Delta S$ ) e do volume de poros ( $\Delta V$ ) calculados para cada composto em relação às amostras sem proteína (SBA-15 e SBA-15T). Variações inferiores a 6% no diâmetro médio de poros ( $D$ ) indicam novamente a estabilidade destes materiais.

Entre os compostos de uma mesma proteína, foi observada a diminuição nos parâmetros  $S$  e  $V$  conforme o aumento conteúdo proteico na amostra. As reduções percentuais nos compostos 5:1 (cerca de 20% de proteína) foram maiores em comparação com os compostos 10:1 (cerca de 10% de proteína) no caso das proteínas globulares (Mb e ConA). Já para os compostos contendo STI, foi observado uma inversão nesta tendência de redução dos parâmetros.

Em relação à amostra controle (SBA-15T), os compostos das proteínas Mb e ConA indicaram reduções na área superficial em torno de 20% e 30% para as proporções 10:1 e 5:1, respectivamente. A mesma tendência foi observada para as estimativas de variação do volume de poros. Com base nestes resultados, as incorporações na proporção 5:1 podem conter uma

quantidade maior de proteínas imobilizadas nos mesoporos, em contrapartida, há possivelmente uma fração significativa de agregados conforme observado por SAXS (Seção 3.3.2.1). Já os compósitos contendo STI, indicaram redução de 35% e 30% na área superficial para as proporções 10:1 e 5:1, respectivamente, enquanto que o volume foi reduzido em 30% e 20%, respectivamente.

**Tabela 11:** Parâmetros texturais para todas as amostras

	Área superficial (S) (m <sup>2</sup> /g)	Volume de Poros (V) (cm <sup>3</sup> /g)	Diâmetro médio de poro (D) (nm)	$\Delta S^a$ (%)	$\Delta V^a$ (%)	$\Delta S^b$ (%)	$\Delta V^b$ (%)
SBA-15	782	1,51	9,26	-	-	-	-
SBA-15T	500	1,32	9,69	-	-	-	-
Mb 10:1	383	1,09	9,55	51	28	24	17
Mb 5:1	350	0,96	9,33	55	36	30	27
ConA 10:1	393	1,08	9,60	50	29	22	18
ConA 5:1	335	0,94	9,45	57	38	33	29
STI 10:1	325	0,93	9,98	58	38	35	30
STI 5:1	373	1,05	9,80	52	31	25	20

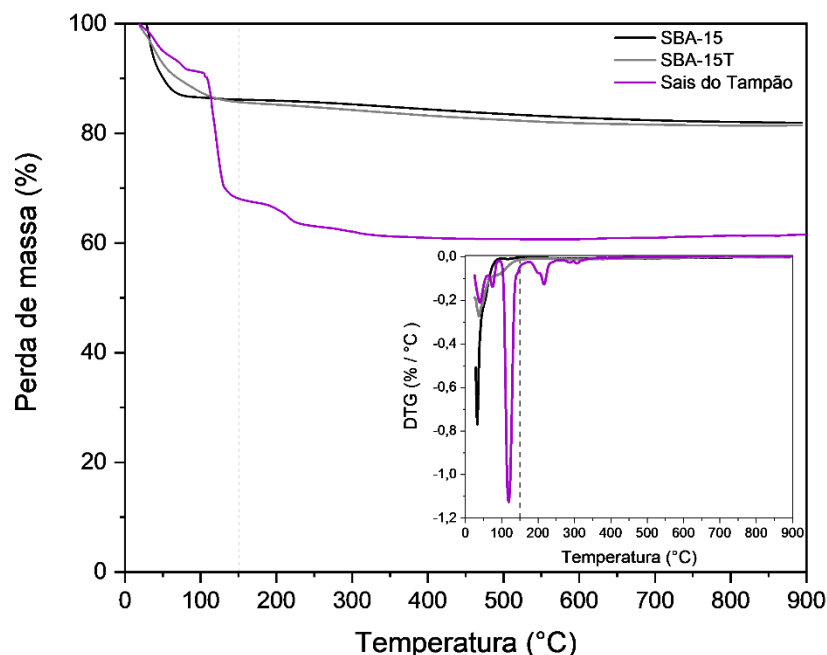
Nota: Reduções percentuais nas estimativas da área superficial ( $\Delta S$ ) e volume de poros ( $\Delta V$ ) entre cada compósito em relação às amostras (a) SBA-15 e (b) SBA-15T.

Embora as reduções nos parâmetros S e V dos compósitos em relação às amostras SBA-15 e SBA-15T seja um indicativo da presença de proteínas nos mesoporos, não é possível eliminar a possibilidade de ocorrência de empacotamento de proteínas na entrada dos mesoporos que também contribuem para a redução dos parâmetros texturais. Segundo as reduções percentuais para S e V observadas por NAI em conjunto com as análises de SAXS pode-se inferir que uma fração das biomoléculas está alocada fora dos mesoporos. Esta hipótese baseia-se na formação de estados agregados durante o processo de incorporação que poderiam ter a sua entrada nos mesoporos dificultada.

### 3.3.2.3 Análise térmica

A Figura 37 apresenta as curvas de TG/DTG para as amostras SBA-15, SBA-15T e sais da solução tampão. O perfil térmico da amostra SBA-15T foi muito similar ao da amostra SBA-15 pura (Seção 3.2.4), sendo este resultado coerente com a baixa quantidade de sais estimada para a amostra SBA-15T (amostra controle). Em ambos os casos foram observados dois eventos térmicos (~ 25 - 150 °C e 150 - 900 °C) com variações de massa equivalentes (~14% e 4%). O primeiro

evento foi atribuído à dessorção da água da superfície e, o segundo, aos grupos Si-OH e moléculas de água mais fortemente ligada à estrutura (PEDROSO et al., 2013; CHRZANOWSKA; DERYLO-MARCZEWSKA, 2019). Já os sais do tampão apresentaram cerca de seis eventos térmicos com cerca de 30,0% da massa sendo eliminada em temperaturas inferiores a 175 °C e cerca de 5,6% no intervalo de 175 a 900 °C.



**Figura 37:** Curvas de TG/DTG para as amostras SBA-15, SBA15-T e sais da solução tampão. Medidas em cadinho de platina.

Os comparativos entre cada proteína e seus respectivos compósitos são mostrados nas Figuras 38, 39 e 40 nas quais os perfis térmicos foram subdivididos em três eventos identificados como I, II e III. Para as três proteínas liofilizadas, o primeiro evento (I) ocorreu entre ~ 25 – 150 °C com redução de 12 a 17% do peso inicial da amostra. Os demais eventos (II e III) foram ambos atribuídos às etapas de degradação orgânica da proteína (CHRZANOWSKA; DERYLO-MARCZEWSKA, 2019; LOSITO et al., 2021; RASMUSSEN et al., 2021). Para a proteína Mb estes eventos ocorreram entre 150 - 390 °C e 390 - 550 °C; para a ConA 150 - 435 °C e 435 - 740 °C e STI entre 150 - 420 °C e 420 - 660 °C. A partir dos limites de temperaturas de cada caso até o fim do experimento (900 °C), não foi observado variação de massa significativa (~ 0,2%).

As variações de massa somadas que correspondem aos eventos II e III foram de 85,7%, 88,3% e 76,9% para as proteínas Mb, ConA e STI, respectivamente. No limite de temperatura (900°C), as proteínas Mb e STI apresentaram massa residual em torno de 2,6% e 6,0%, respectivamente. A complexidade dos eventos de degradação (II e III) para as proteínas puras pode ser observada nas curvas DTG. Nota-se a sobreposição de 5 a 6 etapas de degradação pouco definidas, isto é, antes que um dado processo se encerre, outra etapa de decomposição é iniciada. Diferenças no perfil de degradação das três proteínas estão relacionadas às singularidades de cada cadeia polipeptídica.

O perfil térmico dos compósitos apresentou diferenças notáveis em relação às partículas de SBA-15 pura, indicando que a presença de proteínas altera as propriedades térmicas deste material. Durante o primeiro evento térmico (~ 25 - 150 °C), foi estimada a redução de 9 a 17% do peso inicial da amostra que corresponde ao conteúdo hídrico fisicamente adsorvido na superfície em todos os casos. Por comparação entre a SBA-15 pura e as respectivas proteínas isoladas, o segundo e o terceiro evento nos compósitos correspondem à degradação das proteínas imobilizadas e dos grupos silanóis. Para os compósitos da Mb, os eventos de degradação ocorrem no intervalo de 150 – 390 °C e 390 - 900°C, para ConA de 150 – 435 °C e 435 – 900 °C e STI de 150 – 420 °C e 420 - 900 °C. As variações de massa somadas para estes dois eventos foram próximas aos valores nominais usados na incorporação (cerca de 10% e 20% de proteína para as proporções 10:1 e 5:1, respectivamente).

A Tabela 12 mostra as variações de massa ( $\Delta_m$ ) por evento e a temperatura extrapolada ( $T_{onset}$ ). Pode-se observar que a temperatura em que se inicia a degradação das proteínas puras ( $T_{onset}$  do segundo evento) é deslocado para temperaturas mais altas nos compósitos. Os compósitos da proteína STI apresentaram os maiores deslocamentos (36 °C e 32 °C para as proporções 10:1 e 5:1, respectivamente). Para os compósitos da Mb foi observado uma diferença de 31° C e 24 °C e para os compósitos da ConA de 25 °C e 20 °C para as proporções 10:1 e 5:1, respectivamente.

É importante ressaltar que o retardo na degradação da proteína imobilizada sugere um aspecto termoprotetor dos compósitos e também é um indicador das interações estabelecidas com a sílica. Nota-se também uma sutil redução na  $T_{onset}$  do segundo evento nos compósitos 5:1 em relação aos compósitos 10:1, corroborando os resultados de SAXS que indicaram que as amostras com maior conteúdo proteico contêm uma fração maior de proteínas na superfície externa ou não associadas à sílica que iniciam o processo de degradação previamente.

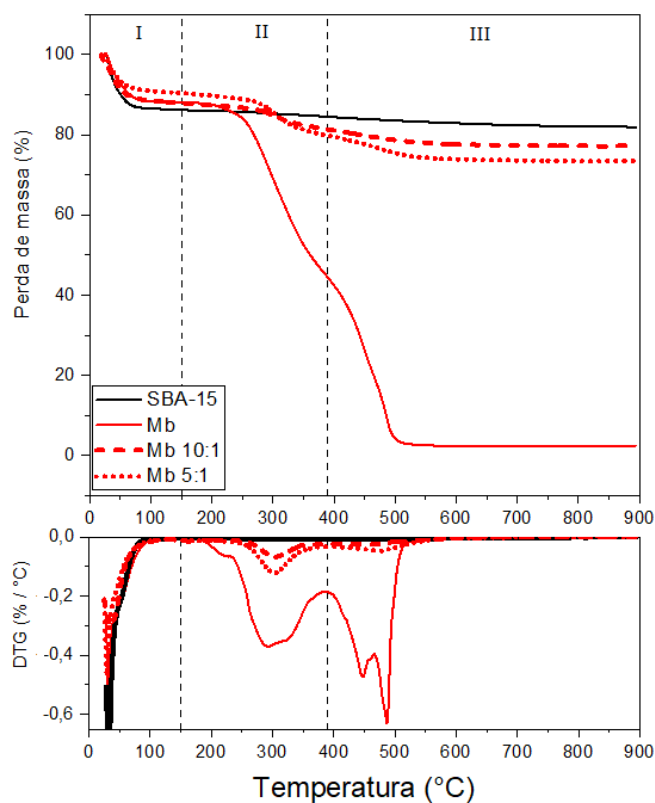


Figura 38: Comparativos entre curvas TG/DTG para amostras contendo Mb. Medidas em cadinho de platina.

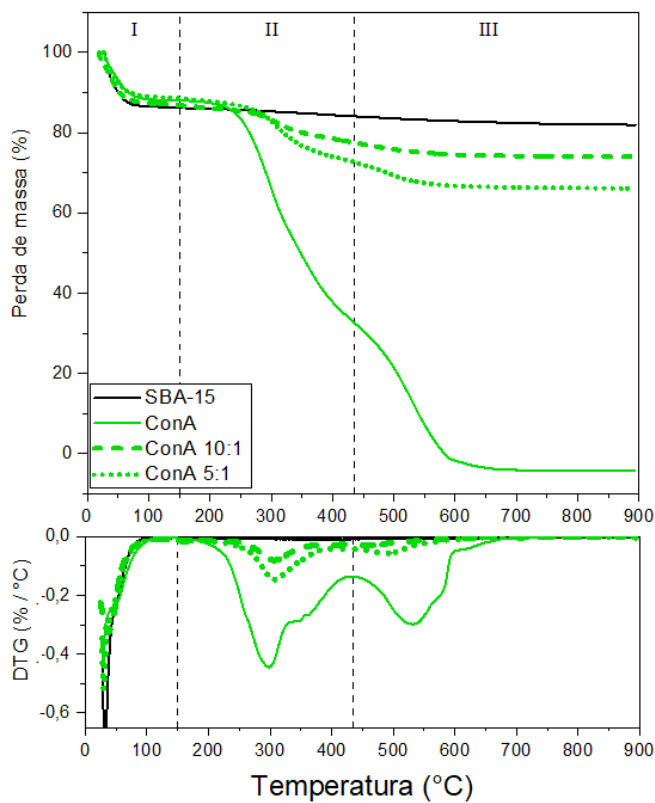


Figura 39: Comparativos entre curvas TG/DTG para amostras contendo ConA. Medidas em cadinho de platina.

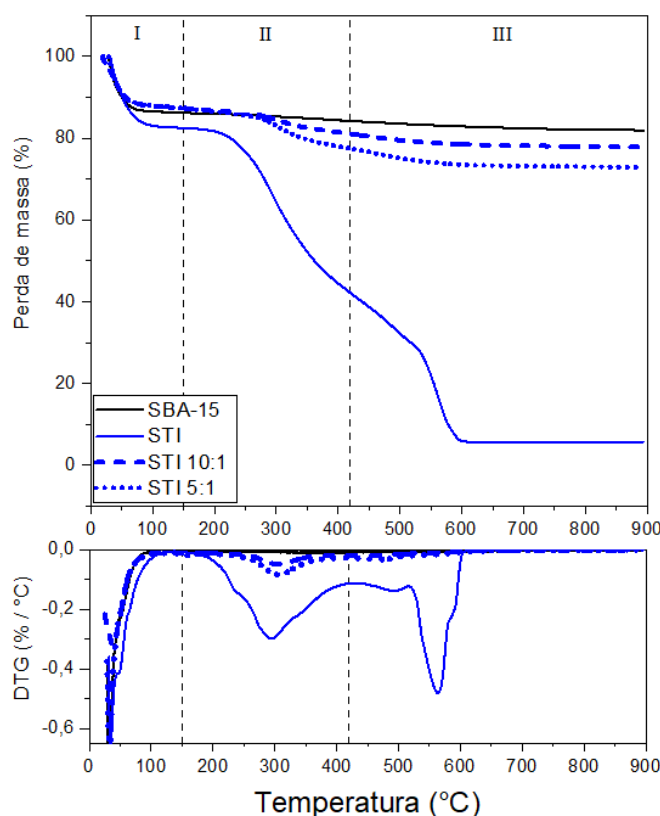


Figura 40: Comparativos entre curvas TG/DTG para amostras contendo STI. Medidas em cadinho de platina.

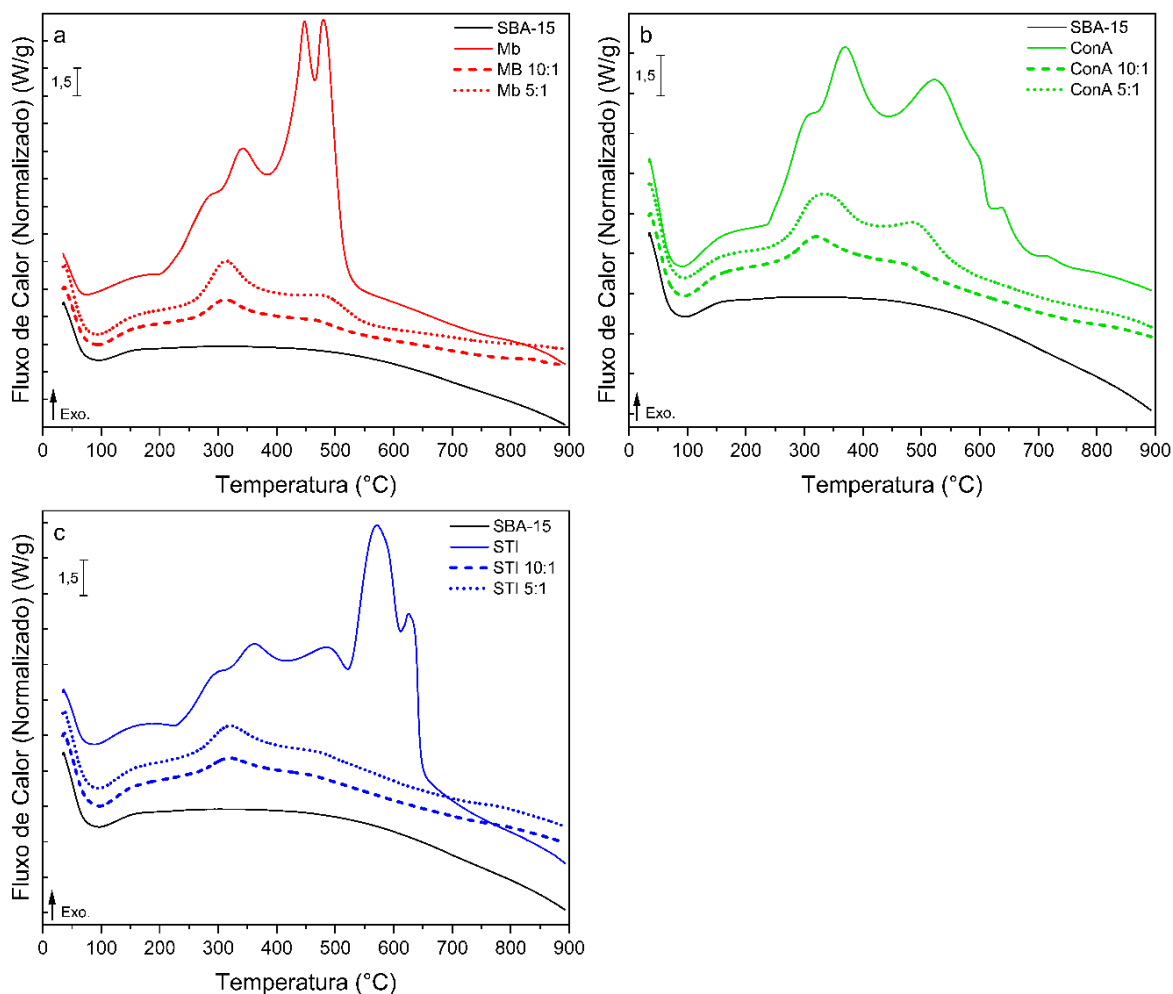
Tabela 12: Parâmetros obtidos com termogravimetria

	I		II		III	
	$\Delta m$ (%)	$T_{onset}$ (°C)	$\Delta m$ (%)	$T_{onset}$ (°C)	$\Delta m$ (%)	$T_{onset}$ (°C)
	~25 - 150 °C		150 - 900 °C			
SBA-15	13,7	31,2	4,2	260,9		
SBA-15T	14,3	31,5	4,3	252,6		
	~25 - 150 °C		150 - 390 °C		390 - 900 °C	
Mb	11,7	31,7	43,8	250,2	41,9	446,8
Mb 10:1	11,4	33,1	6,6	281,2	4,1	436,1
Mb 5:1	9,4	29,1	10,6	273,8	6,3	441,1
	~25 - 150 °C		150 - 435 °C		435 - 900 °C	
ConA	11,7	28,6	53,3	252,1	35,0	491,6
ConA 10:1	12,4	20,4	9,3	277,5	3,4	462,7
ConA 5:1	11,3	29,6	15,9	272,6	6,5	471,5
	~25 - 150 °C		150 - 420 °C		420 - 900 °C	
STI	17,1	34,5	40,4	242,3	36,5	536,0
STI 10:1	12,1	20,8	6,3	277,8	3,2	442,6
STI 5:1	12,4	32,5	9,85	274,7	4,6	453,5

Nota: Medidas em cadinho de platina.

Os comparativos entre os perfis de DSC para as proteínas e seus respectivos compósitos são apresentados na Figura 41 (a-c). Em todos os casos, foi observado um evento endotérmico no intervalo de 35 °C a 160 °C coerente com o processo de dessorção da água fisicamente adsorvida na superfície das amostras.

O processo de degradação das proteínas (puras) ocorreu a partir de 160 °C até 550 °C (Mb), 740 °C (ConA) e 660 °C (STI). Este processo, foi caracterizado pela presença de 5 a 6 picos exotérmicos em concordância com as análises de TG/DTG. Quando imobilizadas em SBA-15, o processo de degradação das proteínas foi reduzido a dois eventos exotérmicos. Nota-se que os picos observados nas curvas dos compósitos estão deslocados em relação ao perfil da respectiva proteína pura.



**Figura 41: Curvas de DSC: comparativos entre as proteínas e respectivos compósitos.** Medidas em cadinho de alumina com etapa de estabilização a 35 °C para as proteínas (a)Mb, (b)ConA e STI (c).

Conforme a Tabela 13, para os compósitos de uma mesma proteína, foi observado aumento na energia liberada em amostras com maior conteúdo proteico. Nota-se também que a variação de entalpia calculada para o terceiro evento das proteínas puras foi maior do que a calculada para o segundo evento em todos os casos. Nos compósitos, esta tendência é invertida e a posição dos picos do segundo evento são deslocadas para temperaturas maiores, indicando que a decomposição proteica ocorre de forma distinta quando na sílica em razão das novas interações com a superfície.

**Tabela 13:** Parâmetros obtidos com calorimetria diferencial de varredura

	I		II		III	
	T <sub>pico</sub> (°C)	ΔH (J/g)	T <sub>pico</sub> (°C)	ΔH (J/g)	T <sub>pico</sub> (°C)	ΔH (J/g)
	35 - 160 °C		160 - 390 °C		390 - 900 °C	
Mb	74,6	-748,9	(276,9 e 340,6)	574,6	(446,6 e 484,4)	1591,4
Mb 10:1	94,5	-923,5	311,5	443,2	470,5	107,0
Mb 5:1	93,7	-1107,5	312,3	819,9	483,5	344,6
	35 - 160 °C		160 - 435 °C		435 - 900 °C	
ConA	86,4	-593,3	(298,1 e 369,7)	833,8	(529,7; 615,2; 654,7 e 716,3)	1604,0
ConA 10:1	95,6	-909,4	319,5	417,8	472,8	94,7
ConA 5:1	95,3	-1007,0	327,5	879,1	494,7	280,3
	35 - 160 °C		160- 420 °C		420 - 900 °C	
STI	88,1	-736,4	(289,7 e 361,1)	362,3	(488,4; 568,7 e 635,4)	2262,8
STI 10:1	97,3	-883,1	317,3	415,0	469,1	70,3
STI 5:1	95,9	-944,0	319,2	617,4	476,0	128,1

Nota: Medidas em cadinho de alumina com etapa de estabilização a 35 °C.



#### **4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS**

A síntese de partículas de SBA-15 foi bem-sucedida, conforme mostram os parâmetros morfológicos, estruturais e texturais em alta conformidade com trabalhos reportados para o mesmo protocolo de síntese (OJEDA-LÓPEZ et al., 2015; CAVALCANTE; MOLINA; MARTINS, 2019).

As proteínas escolhidas, Mb, ConA e STI, mostraram-se coerentes como modelos representativos para os respectivos elementos de estrutura secundária majoritária, hélice- $\alpha$ , fitas- $\beta$  e desordenada. As três proteínas apresentaram alta estabilidade estrutural até 40 °C e são mais sensíveis à desnaturação térmica a partir de 88 °C, 59 °C e 62 °C para a Mb, ConA e STI, respectivamente. As proteínas com maior proporção de elementos ordenados (Mb e ConA) foram mais afetadas pelo aumento de temperatura, assim, sugere-se um balanceamento dos fatores tempo e temperatura de evaporação na estufa durante o processo de incorporação. A incubação em solução ácida levou à desnaturação proteica da proteína globular Mb. O modelo utilizado para representar a estrutura intrinsecamente desordenada (STI) indicou maior estabilidade estrutural diante das variações de temperatura e pH testados.

Os parâmetros estruturais da SBA-15 foram preservados após o procedimento de incorporação aplicado, sugerindo alta estabilidade hidrotérmica para as partículas sintetizadas. Conforme os resultados obtidos com a técnica de NAI, em relação à amostra SBA-15T (amostra controle), o método de incorporação usado reduziu os parâmetros texturais (área superficial e volume de poros) dos compósitos em 20 ou 30% para as proporções de sílica:proteína 10:1 e 5:1, respectivamente. O perfil térmico da SBA-15 foi alterado após a adsorção proteica conforme avaliados por TG e DSC indicando modificações nas propriedades térmicas decorrentes da interação entre sílica e proteína. O aspecto termoprotetor contra a degradação das proteínas nos compósitos foi verificado pelo deslocamento destes eventos para temperaturas mais altas (> 20°C).

Durante o procedimento de incorporação da proteína em SBA-15, notou-se a formação de agregados que podem estar relacionados à concentração proteica utilizada (6 mg/mL). A possibilidade de correlação com a baixa força iônica do tampão também foi investigada sugerindo que este efeito é apenas fracamente atenuado com aumento da força iônica após a adição de NaCl na composição do tampão original. Contudo, o tampão utilizado favorece as análises de CD

convencional e SRCD, visto que a presença de íons cloreto (contidos na composição do tampão PBS) absorvem fortemente a radiação abaixo de 200 nm.

Os resultados de CD indicaram a preservação da estrutura secundária nativa de cada uma das três proteínas quando adsorvidas em superfície sólida quimicamente similar a SBA-15, indicando que um comportamento análogo pode ocorrer nos compósitos contendo SBA-15. As alterações estruturais observadas em regiões de caráter desordenado destas proteínas, ocorrem em função do favorecimento das interações intracadeias num ambiente onde moléculas de água são escassas. Porém, como acontece nas IDPs, o caráter desordenado da proteína deve ser rapidamente restabelecido quando a proteína se encontra em soluções aquosas. Para as proteínas globulares, a imobilização nos filmes não afetou sua estrutura nativa. O ambiente químico dos resíduos aromáticos nas três proteínas também é preservado tanto em solução aquosa, como nos compósitos, em concordância a manutenção da conformação global das proteínas incorporadas em SBA-15.

Dado que as condições de pH e temperatura selecionadas neste estudo são próximas das condições gástricas e intestinais dos organismos humanos, os resultados obtidos tornam este tipo de informações importantes para a investigação da SBA-15 como veículo protetor de proteínas antigênicas nas condições encontradas em uma rota de aplicação via oral.

Em continuidade ao estudo apresentado, propõe-se investigar a influência de distintos grupos funcionais na superfície da SBA-15 durante o processo de adsorção proteica, bem como, ensaios de liberação via SAXS em meios que mimetizam o fluido gastrointestinal. Além disso, diante da possibilidade de implementação da SBA-15 como adjuvantes para vacinas orais, um aumento no diâmetro de poro pode ser implementado de modo a elevar a capacidade de adsorção proteica (GARCIA et al., 2016).

Outro ponto está relacionado a investigações mais precisas quanto à localização das proteínas (macroporosidade ou mesoporosidade). Com este objetivo, técnicas de imagem como tomografia de nêutrons mostraram-se eficazes conforme o estudo com o vírus da hepatite B (RASMUSSEN et al., 2019). Do mesmo modo, concentrações menores de proteínas para a incorporação poderão ser testadas para reduzir ou eliminar a formação de agregados não relacionados à interação da proteína com a sílica. Assim, também no futuro, deseja-se que tais estudos com proteínas-modelos representantes de diferentes classes estruturais possam também contribuir para previsibilidade das melhores condições de incorporação com proteínas antigênicas para o desenvolvimento de vacinas.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, E. et al. The minimal structural requirement of concanavalin A that retains its functional aspects. *Journal of Biochemistry*, v. 142, n. 3, p. 307–315, 2007.
- ALBERTS, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. New York: Garland Science, 2002.
- ALMEIDA, P. *Proteins Concepts in Biochemistry*. 1 ed. Garland Science, 2016.
- ALOTHMAN, Z. A. A review: Fundamental aspects of silicate mesoporous materials. *Materials*, v. 5, n. 12, p. 2874–2902, 2012.
- ANFINSEN, C. B. Principles that govern protein folding of protein chains. *Science*, v. 181, n. 4096, p. 223–230, 1973.
- ANTHIS, N. J.; CLORE, G. M. Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. *Protein Science*, v. 22, n. 6, p. 851–858, 2013.
- ARAKAKI, L. N. H.; AIROLDI, C. *O relevante papel do agente sililante na modificação de superfícies de polímeros* *Química Nova*, 1999.
- ARRONDO, J. L. R. et al. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 59, n. 1, p. 23–56, 1993.
- BANERJEE, T.; KISHORE, N. A differential scanning calorimetric study on the irreversible thermal unfolding of concanavalin A. *Thermochimica Acta*, v. 411, n. 2, p. 195–201, 2004.
- BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *Journal of the American Chemical Society*, v. 73, n. 1, p. 373–380, 1951.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, 2007.
- BARTH, A.; HARIS, P. I. *Biological and Biomedical Infrared Spectroscopy*. IOS Press, 2009.
- BHARTI, B. et al. Bridging interactions of proteins with silica nanoparticles: The influence of pH, ionic strength and protein concentration. *Soft Matter*, v. 10, n. 5, p. 718–728, 2014.
- BOS, M. A. et al. Influence of the electric potential of the interface on the adsorption of proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 3, p. 91–100, 1994.
- BRAGG, W. H.; BRAGG, W. L. The reflection of X-rays by crystals. *Proc. R. Soc. Lond. A*, v. 17, n. 88, p. 428–438, 1913.

- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, v. 60, n. 2, p. 309–319, 1938.
- BYLER, D. M.; SUSI, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, v. 25, n. 3, p. 469–487, 1986.
- CARVALHO, L. V. et al. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. *Vaccine*, v. 28, n. 50, p. 7829–7836, 2010.
- CASAL, H. L.; MANTSCH, H. H. Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *BBA - Reviews on Biomembranes*, v. 779, n. 4, p. 381–401, 1984.
- CAVALCANTE, C. T.; MOLINA, C.; MARTINS, T. S. Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica containing di-ureasil hybrid/phosphotungstic acid and Eu<sup>3+</sup>. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, v. 30, n. 18, p. 16903–16909, 2019.
- CHATTERJEE, A.; MANDAL, D. K. Denaturant-induced equilibrium unfolding of concanavalin A is expressed by a three-state mechanism and provides an estimate of its protein stability. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1648, n. 1–2, p. 174–183, 2003.
- CHATTERJEE, A.; MANDAL, D. K. Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 35, n. 1–2, p. 103–109, 2005.
- CHI, Y. et al. Facile encapsulation of monodispersed silver nanoparticles in mesoporous compounds. *Chemical Engineering Journal*, v. 195–196, p. 254–260, 2012.
- CHITI, F.; DOBSON, C. M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: A summary of progress over the last decade. *Annual Review of Biochemistry*, v. 86, p. 27–68, 2017.
- CHOMA, J.; JARONIEC, M. Applicability of classical methods of pore size analysis for MCM-41 and SBA-15 silicas. *Applied Surface Science*, v. 253, n. 13 SPEC. ISS., p. 5587–5590, 2007.
- CHOWDHURY, T. K.; WEISS, A. K. *Concanavalin A. Advances in experimental medicine and biology*. [s.l.] Springer, 1675. v. 55
- CHRZANOWSKA, A.; DERYLO-MARCZEWSKA, A. Mesoporous silica/protein biocomposites: Surface, topography, thermal properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 139, p. 531–542, 2019.
- COMPTON, L. A.; JOHNSON, W. C. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Analytical Biochemistry*, v. 155, n. 1, p. 155–167, 1986.
- CULLITY, B. D. *Elements of X-RAY Diffraction*. 2 ed. [s.l.] Addison-Wesley, 1978.
- DA VELA, S.; SVERGUN, D. I. Methods, development and applications of small-angle X-ray

- scattering to characterize biological macromolecules in solution. *Current Research in Structural Biology*, v. 2, n. July, p. 164–170, 2020.
- DE ÁVILA, S. G.; SILVA, L. C. C.; MATOS, J. R. Optimisation of SBA-15 properties using Soxhlet solvent extraction for template removal. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 234, p. 277–286, 2016.
- DILL, K. A.; MACCALLUM, J. L.; FOLDING, P. The Protein-Folding Problem , 50 Years On. *SCIENCE*, v. 338, p. 1042–1047, 2012.
- DREW, E. D.; JANES, R. W. 2StrucCompare: a webserver for visualizing small but noteworthy differences between protein tertiary structures through interrogation of the secondary structure content. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. W1, p. W477–W481, 2019.
- DREW, E. D.; JANES, R. W. PDBMD2CD: Providing predicted protein circular dichroism spectra from multiple molecular dynamics-generated protein structures. *Nucleic Acids Research*, v. 48, n. W1, p. W17–W24, 2021.
- DUNKER, A. K. et al. Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 19, n. 1, p. 26–59, 2001.
- DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 3, p. 197–208, 2005.
- FERENC, M. et al. Impact of mesoporous silica surface functionalization on human serum albumin interaction, cytotoxicity and antibacterial activity. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 231, p. 47–56, 2016.
- FLODSTRÖM, K. et al. In situ synchrotron small-angle X-ray scattering/X-ray diffraction study of the formation of SBA-15 mesoporous silica. *Langmuir*, v. 20, n. 12, p. 4885–4891, 2004.
- FULVIO, P. F.; PIKUS, S.; JARONIEC, M. Tailoring properties of SBA-15 materials by controlling conditions of hydrothermal synthesis. *Journal of Materials Chemistry*, v. 15, n. 47, p. 5049–5053, 2005.
- GARCIA, A. F. et al. Membrane interactions of S100A12 (Calgranulin C). *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, 2013.
- GARCIA, P. R. A. F. et al. Protein encapsulation in SBA-15 with expanded pores. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 235, p. 59–68, 2016.
- GLATTER, O. A new method for the evaluation of small-angle scattering data. *Journal of Applied Crystallography*, v. 10, n. 5, p. 415–421, 1977.
- GOODHEW, P. J.; HUMPHREYS, J.; BEANLAND, R. The scanning electron microscope. In: *Electron Microscopy and Analysis*. 3 ed. New York: Taylor & Francis, 2000. p. 66–122.

- GRIEBENOW, K.; KLIBANOV, A. M. Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, n. 24, p. 10969–10976, 1995.
- GUILHERME, V. A. et al. Improved efficacy of naproxen-loaded NLC for temporomandibular joint administration. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- GUINIER, A. & FOURNET, F. *Small-angle scattering of X-rays*. New York: JOHN WILEY & SONS, 1955.
- HALAMOVIĆ, D. et al. Naproxen drug delivery using periodic mesoporous silica SBA-15. *Applied Surface Science*, v. 256, n. 22, p. 6489–6494, 2010.
- HENCH, L. L.; WEST, J. O. N. K. The Sol-Gel Process. *American Chemical Society*, n. 90, p. 33–72, 1990.
- HOFFMANN, F. et al. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 45, n. 20, p. 3216–3251, 2006.
- I. J. GOLDSTEIN, C. E. HOLLERMAN, and E. E. S. Protein-Carbohydrate Interaction. II. Inhibition Studies on the Interaction of Concanavalin A with Polysaccharides. *Biochemistry*, v. 4, n. 5, p. 876–883, 1965.
- IZQUIERDO-BARBA, I. et al. In vitro stability of SBA-15 under physiological conditions. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 132, n. 3, p. 442–452, 2010.
- JAMESON, D. M. *Introduction to Fluorescence*. CRC Press, 2014.
- KABSCH W, S. C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, v. 22, n. 12, p. 2577–2637, 1983.
- KAIDEN, K.; MATSUI, T.; TANAKA, S. Study of the amide III band by FT-IR Spectroscopy of the secondary structure of albumin, myoglobin, and gamma - globulin. *Applied Spectroscopy*, v. 41, n. 2, p. 180–184, 1987.
- KANG, Y. et al. Influence of pore-diameters on the immobilization of lipase in SBA-15. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 46, n. 13, p. 4474–4479, 2007.
- KATAOKA, M. et al. Structural characterization of the molten globule and native states of apomyoglobin by solution x-ray scattering. *Journal of Molecular Biology*, v. 249, n. 1, p. 215–228, 1995.
- KAUPPINEN, J. K. et al. Fourier Self-Deconvolution: A Method for Resolving Intrinsically Overlapped Bands. *Applied Spectroscopy*, v. 35, n. 3, p. 271–276, 1981.
- KELLY, S.; PRICE, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure

- and Function. *Current Protein & Peptide Science*, v. 1, n. 4, p. 349–384, 2005.
- KENDREW, J. C. et al. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*, v. 181, n. 4610, p. 662–666, 1958.
- KRUK, M.; JARONIEC, M. Relations between pore structure parameters and their implications for characterization of MCM-41 using gas adsorption and x-ray diffraction. *Chemistry of Materials*, v. 11, n. 2, p. 492–500, 1999.
- KRUK, M.; JARONIEC, M.; SAYARI, A. Application of large pore MCM-41 molecular sieves to improve pore size analysis using nitrogen adsorption measurements. *Langmuir*, v. 13, n. 23, p. 6267–6273, 1997.
- KUBIAK-OSSOWSKA, K.; JACHIMSKA, B.; MULHERAN, P. A. How Negatively Charged Proteins Adsorb to Negatively Charged Surfaces: A Molecular Dynamics Study of BSA Adsorption on Silica. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 120, n. 40, p. 10463–10468, 2016.
- KUMAGAI, P. S.; ARAUJO, A. P. U.; LOPES, J. L. S. Going deep into protein secondary structure with synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. *Biophysical Reviews*, v. 9, n. 5, p. 517–527, 2017.
- KUMAGAI, P. S.; DEMARCO, R.; LOPES, J. L. S. Advantages of synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy to study intrinsically disordered proteins. *European Biophysics Journal*, v. 46, n. 7, p. 599–606, 2017.
- KUMOSINSKI, T. F.; FARRELL, H. M. Determination of the global secondary structure of proteins by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Trends in Food Science and Technology*, v. 4, n. 6, p. 169–175, 1993.
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *The Journal of general physiology*, v. 29, p. 149–154, 1946.
- KUPFERSCHMIDT, N. et al. Mesoporous silica particles potentiate antigen-specific T-cell responses. *Nanomedicine*, v. 9, n. 12, p. 1835–1846, 2014.
- KWON, S. et al. Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery. *Journal of Tissue Engineering*, v. 4, n. 2041731413503357, 2013.
- LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 ed. [s.l.] Springer, 2006.
- LEES, J. G. et al. CDtool - An integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. *Analytical Biochemistry*, v. 332, n. 2, p. 285–289, 2004.
- LEES, J. G. et al. A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. *Bioinformatics*, v. 22, n. 16, p. 1955–1962, 2006.
- LEES, J. G.; WALLACE, B. A. Synchrotron radiation circular dichroism and conventional circular

- dichroism spectroscopy: A comparison. *Spectroscopy*, v. 16, n. 3–4, p. 121–125, 2002.
- LIU, C. et al. Fabrication and delivery properties of soy Kunitz trypsin inhibitor nanoparticles. *RSC Advances*, v. 6, n. 88, p. 85621–85633, 2016.
- LOPES, J. L. S. et al. Folding factors and partners for the intrinsically disordered protein micro-exon gene 14 (MEG-14). *Biophysical Journal*, v. 104, n. 11, p. 2512–2520, 2013.
- LÓPEZ-JARAMILLO, F. J. et al. Structure of concanavalin A at pH 8: Bound solvent and crystal contacts. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 60, n. 6, p. 1048–1056, 2004.
- LOSITO, D. W. et al. Biocomposites based on SBA-15 and papain: Characterization, enzymatic activity and cytotoxicity evaluation. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 325, n. 111316, 2021.
- LUNDQVIST, M.; SETHSON, I.; JONSSON, B. H. Protein adsorption onto silica nanoparticles: Conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability. *Langmuir*, v. 20, n. 24, p. 10639–10647, 2004.
- LYNCH, M. M. et al. Chaperonin-Inspired pH Protection by Mesoporous Silica SBA-15 on Myoglobin and Lysozyme. *Langmuir*, v. 32, n. 37, p. 9604–9610, 2016.
- MALVI, B. et al. “clickable” SBA-15 mesoporous materials: Synthesis, characterization and their reaction with alkynes. *Journal of Materials Chemistry*, v. 19, n. 10, p. 1409–1416, 2009.
- MANET, S. et al. Structure of micelles of a nonionic block copolymer determined by SANS and SAXS. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 115, n. 39, p. 11318–11329, 2011a.
- MANET, S. et al. Kinetics of the formation of 2D-hexagonal silica nanostructured materials by nonionic block copolymer templating in solution. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 115, n. 39, p. 11330–11344, 2011b.
- MARIANO-NETO, F. et al. Physical properties of ordered mesoporous SBA-15 silica as immunological adjuvant. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 47, n. 42, 2014.
- MAURUS, R. et al. Structural and spectroscopic studies of azide complexes of horse heart myoglobin and the His-64 → Thr variant. *Biochemical Journal*, v. 332, n. 1, p. 67–74, 1998.
- MEHL, A. F.; CRAWFORD, M. A.; ZHANG, L. Determination of myoglobin stability by circular dichroism spectroscopy: Classic and modern data analysis. *Journal of Chemical Education*, v. 86, n. 5, p. 600–602, 2009.
- MERCURI, L. P. et al. Ordered mesoporous silica SBA-15: A new effective adjuvant to induce antibody response. *Small*, v. 2, n. 2, p. 254–256, 2006.
- MERTENS, H. D. T.; SVERGUN, D. I. Structural characterization of proteins and complexes



- using small-angle X-ray solution scattering. *Journal of Structural Biology*, v. 172, n. 1, p. 128–141, 2010.
- MICSONAI, A. et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 24, p. E3095–E3103, 2015.
- MILES, A. J.; RAMALLI, S. G.; WALLACE, B. A. DichroWeb, a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic data. *Protein Science*, v. 31, n. 1, p. 37–46, 2022.
- MILES, A. J.; WALLACE, B. A. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. *Chemical Society Reviews*, v. 35, n. 1, p. 39–51, 2006.
- MILES, A. J.; WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Spectral magnitude effects on the analyses of secondary structure from circular dichroism spectroscopic data. *Protein Science*, v. 14, n. 2, p. 368–374, 2005.
- MITCHELL, M. B. Fundamentals and Applications of Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) Spectroscopy. In: *Advances in Chemistry*. 236p. 351–375.
- MOERZ, S. T.; HUBER, P. Protein adsorption into mesopores: A combination of electrostatic interaction, counterion release, and van der waals forces. *Langmuir*, v. 30, n. 10, p. 2729–2737, 2014.
- MOERZ, S. T.; HUBER, P. PH-Dependent Selective Protein Adsorption into Mesoporous Silica. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 119, n. 48, p. 27072–27079, 2015.
- MOHAN, T.; VERMA, P.; NAGESWARA RAO, D. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian Journal of Medical Research*, v. 138, n. NOV, p. 779–795, 2013.
- NELSON, D. L.; COX., M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4. ed. [s.l.] W.H. Freeman, 2004.
- NGUYEN, T. P. B. et al. Synthesis of functionalized SBA-15 with ordered large pore size and its adsorption properties of BSA. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 110, n. 2–3, p. 560–569, 2008.
- NOVAK, U.; GRDADOLNIK, J. The hydration of Concanavalin A studied by infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, v. 1135, p. 138–143, 2017.
- OJEDA-LÓPEZ, R. et al. SBA-15 materials: calcination temperature influence on textural properties and total silanol ratio. *Adsorption*, v. 21, n. 8, p. 659–669, 2015.

- OLIVEIRA, C. L. P. et al. A SAXS Study of Glucagon Fibrillation. *Journal of Molecular Biology*, v. 387, n. 1, p. 147–161, 2009.
- OLIVEIRA, C. L. P. Investigating Macromolecular Complexes in Solution by Small Angle X-Ray Scattering. In: CHANDRASEKARAN, D. A. (Ed.). *Current Trends in X-Ray Crystallography*. [s.l.] InTech, 2011.
- ORDWAY, G. A.; GARRY, D. J. Myoglobin: An essential hemoprotein in striated muscle. *Journal of Experimental Biology*, v. 207, n. 20, p. 3441–3446, 2004.
- ORENGO, C. A. et al. CATH - A hierarchic classification of protein domain structures. *Structure*, v. 5, n. 8, p. 1093–1108, 1997.
- PALLAROLA, D. et al. Redox-active concanavalin a: Synthesis, characterization, and recognition-driven assembly of interfacial architectures for bioelectronic applications. *Langmuir*, v. 26, n. 16, p. 13684–13696, 2010.
- PARIS, J. L. et al. Tuning mesoporous silica dissolution in physiological environments: a review. *Journal of Materials Science*, v. 52, n. 15, p. 8761–8771, 2017.
- PEDROSO, C. C. S. et al. Preparation, characterization and electrical conduction mechanism of polyaniline/ordered mesoporous silica composites. *Synthetic Metals*, v. 170, n. 1, p. 11–18, 2013.
- PILZ, I.; GLATTER, O.; KRATKY, O. [11] *Small-angle x-ray scattering*. [s.l.] Academic Press, 1979. v. 61
- POLLARD, A. J.; BIJKER, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*, v. 21, n. 2, p. 83–100, 2021.
- POPOVA, M. D. et al. Carboxylic modified spherical mesoporous silicas s drug delivery carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 436, n. 1–2, p. 778–785, 2012.
- PROVENCHER, S. W.; GLÖCKNER, J. Estimation of Globular Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Biochemistry*, v. 20, n. 1, p. 33–37, 1981.
- PUTNAM, C. D. et al. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: Defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 40, n. 3, p. 191–285, 2007.
- RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 162, n. 1–2, p. 87–106, 2011.
- RASMUSSEN, M. K. et al. 3D visualisation of hepatitis B vaccine in the oral delivery vehicle SBA-15. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.
- RASMUSSEN, M. K. et al. Assessing the efficiency of SBA-15 as a nanocarrier for diphtheria

- anatoxin. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 312, 2021.
- REEKE, G. N.; BECKER, J. W.; EDELMAN, G. M. The covalent and three dimensional structure of concanavalin A. IV. Atomic coordinates, hydrogen bonding, and quaternary structure. *Journal of Biological Chemistry*, v. 250, n. 4, p. 1525–1547, 1975.
- ROBERT M. SILVERSTEIN; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Infrared Spectrometry. In: *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 7 ed. [s.l.] John Wiley & Sons; 7th, 2005. p. 102–126.
- ROUQUEROL, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. chapter1-Introduction. In: *Adsorption by Powders and Porous Solids. Principles, Methodology and Applications*. London: Academic Press, 1999. p. 1–26.
- SADAT, A.; JOYE, I. J. Peak fitting applied to fourier transform infrared and raman spectroscopic analysis of proteins. *Applied Sciences (Switzerland)*, v. 10, n. 17, 2020.
- SALIS, A. et al. Effect of electrolytes on proteins physisorption on ordered mesoporous silica materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 137, p. 77–90, 2016.
- SALIS, A.; BHATTACHARYYA, M. S.; MONDUZZI, M. Specific Ion Effects on Adsorption of Lysozyme on Functionalized SBA-15 Mesoporous Silica. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, n. 23, p. 7996–8001, 2010.
- SAVAGE, G. P.; MORRISON, S. C. Trypsin Inhibitors. In: CABALLERO, B. (Ed.). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2 ed. [s.l.] Academic Press, 2003. p. 5878–5884.
- SCARAMUZZI, K. et al. Nanostructured SBA-15 silica: An effective protective vehicle to oral hepatitis B vaccine immunization. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 12, n. 8, p. 2241–2250, 2016.
- SIEFKER, J.; KARANDE, P.; COPPENS, M. O. Packaging biological cargoes in mesoporous materials: Opportunities for drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 11, n. 11, p. 1781–1793, 2014.
- SING, K. S. W. Reporting physisorption data for gas/solid systems. *Pure and Applied Chemistry*, v. 54, n. 11, p. 2201–2218, 1982.
- SONG, H. K.; SUH, S. W. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: Refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. *Journal of Molecular Biology*, v. 275, n. 2, p. 347–363, 1998.
- SORRENTINO, Z. A.; GIASSON, B. I. The emerging role of  $\alpha$ -synuclein truncation in aggregation and disease. *Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 30, p. 10224–10244, 2020.
- SOUSA, V. K. et al. Effect of setting data collection parameters on the reliability of a circular

- dichroism spectrum. *European Biophysics Journal*, n. 0123456789, 2021.
- SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Analytical Biochemistry*, v. 287, n. 2, p. 243–251, 2000.
- SREERAMA, N.; WOODY, R. W. A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Analytical Biochemistry*, v. 209, n. 1, p. 32–44, 1993.
- SUNDBLUM, A. et al. Modeling in situ small-angle X-ray scattering measurements following the formation of mesostructured silica. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 113, n. 18, p. 7706–7713, 2009.
- THOMMES, M. Physical adsorption characterization of ordered and amorphous mesoporous materials. In: LU, G. Q. AND ZHAO, X. S. (Ed.). *Nanoporous Materials: Science and Engineering*. London: Imperial College Press, 2004. p. 317–364.
- THOMMES, M. et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 87, n. 9–10, p. 1051–1069, 2015.
- THUNYARATCHATANON, C. et al. Synthesis and characterization of Zr incorporation into highly ordered mesostructured SBA-15 material and its performance for CO<sub>2</sub> adsorption. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 253, p. 18–28, 2017.
- UVERSKY, V. N. Intrinsically disordered proteins and their environment: Effects of strong denaturants, temperature, pH, Counter ions, membranes, binding partners, osmolytes, and macromolecular crowding. *Protein Journal*, v. 28, n. 7–8, p. 305–325, 2009.
- VELA RAMIREZ, J. E.; SHARPE, L. A.; PEPPAS, N. A. Current state and challenges in developing oral vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 114, p. 116–131, 2017.
- VETRI, V. et al. Unlocked Concanavalin A Forms Amyloid-like Fibrils from Coagulation of Long-lived “Crinkled” Intermediates. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, 2013.
- VINU, A. et al. Adsorption of Lysozyme over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation. *Chemistry of Materials*, v. 108, n. 16, p. 7323–7330, 2004.
- W. CURTIS JOHNSON, J. SECONDARY STRUCTURE OF PROTEINS THROUGH CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, v. 17, p. 145–166, 1988.
- WALLACE, B. A. Analyses of circular dichroism spectra of membrane proteins. *Protein Science*, v. 12, n. 4, p. 875–884, 2003.
- WALLACE, B. A. *Protein characterisation by synchrotron radiation circular dichroism*

*spectroscopy*. v. 42

WALLACE, B. A.; JANES, R. william. *Modern techniques for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. Advances in Biomedical Spectroscopy*. [s.l.] IOS Press BV, 2009. v. 1

WAN, Y.; ZHAO, D. On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical Reviews*, v. 107, n. 7, p. 2821–2860, 2007.

WASHMON-KRIEL, L.; JIMENEZ, V. L.; BALKUS, K. J. Cytochrome c immobilization into mesoporous molecular sieves. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, v. 10, n. 5, p. 453–469, 2000.

WENDLANDT, W. W. *Thermal Analysis*. 3rd Editio ed. [s.l.] Wiley-Interscience, 1986.

WI, S.; PANCOSKA, P.; KEIDERLING, T. A. Predictions of protein secondary structures using factor analysis on Fourier transform infrared spectra: Effect of Fourier self-deconvolution of the amide I and amide II bands. *Biospectroscopy*, v. 4, n. 2, p. 93–106, 1998.

WITTENBERG, B. A.; WITTENBERG, J. B. Transport of oxygen in muscle. *Annual Review of Physiology*, v. 51, p. 857–878, 1989.

YANG, W. J. et al. Protein Conformation By Infrared Spectroscopy: Resolution Enhancement By Fourier Self-Deconvolution. *Applied Spectroscopy*, v. 39, n. 2, p. 282–287, 1985.

YONEDA, J. S. et al. Differential dehydration effects on globular proteins and intrinsically disordered proteins during film formation. *Protein Science*, v. 26, n. 4, p. 718–726, 2017.

ZAMAN, M. et al. Protein misfolding, aggregation and mechanism of amyloid cytotoxicity: An overview and therapeutic strategies to inhibit aggregation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 134, p. 1022–1037, 2019.

ZHANG, Y.; GLADYSHEV, V. N. High content of proteins containing 21st and 22nd amino acids, selenocysteine and pyrrolysine, in a symbiotic deltaproteobacterium of gutless worm *Olavius algarvensis*. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. 15, p. 4952–4963, 2007.

ZHAO, D. et al. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science*, v. 279, n. 5350, p. 548–552, 1998a.

ZHAO, D. et al. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *Journal of the American Chemical Society*, v. 120, n. 24, p. 6024–6036, 1998b.

ZHOLOBENKO, V. L. et al. Initial stages of SBA-15 synthesis: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 142, n. 1–2, p. 67–74, 2008.