



Universidade do Algarve

Síntese de Biosílica em fibras de policaprolactona,
produzidas por *electrospinning*, a partir da imobilização
de Cys-tag Silicateína- α

Margarida de Carvalho Pereira Carvalheira

Dissertação para obtenção do Grau Mestre em Engenharia Biológica

Tese orientada pelo Prof. Dr. Werner E. G. Müller e

coorientada pelo Prof. Dr. José Leitão

2014



Universidade do Algarve

Síntese de Biosílica em fibras de policaprolactona,
produzidas por *electrospinning*, a partir da imobilização
de Cys-tag Silicateína- α

Margarida de Carvalho Pereira Carvalheira

Dissertação para obtenção do Grau Mestre em Engenharia Biológica

Tese orientada pelo Prof. Dr. Werner E. G. Müller e

coorientada pelo Prof. Dr. José Leitão

2014

Síntese de Biosílica em fibras de policaprolactona, produzidas por *electrospinning*, a partir da imobilização de Cys-tag Silicateína- α

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito.

Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright © 2014, por Margarida Carvalheira

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“É erro vulgar confundir o desejar com o querer. O desejo mede os obstáculos; a vontade vence-os.”

Alexandre Herculano

Agradecimentos

Gostaria de deixar registado o meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, nomeadamente:

Ao Professor Doutor Werner Müller pela oportunidade e disponibilidade de trabalhar no seu grupo de investigação.

Ao Professor Doutor José Leitão pelo seu apoio, ensinamentos e paciência durante a orientação desta dissertação de mestrado. Agradeço também pela oportunidade e disponibilidade em realizar este estudo na Universidade de Mainz.

Ao colega e supervisor Doutor Thorben Link por toda a ajuda, ensinamentos, disponibilidade, apoio e motivação na realização deste estudo e também pela sua amizade, boa disposição e pelos bons momentos.

Aos colegas e amigos Dayane Sereno, Emad Tolba, Maria Blažina e Mirta Tankovic pela ajuda, amizade, conselhos e conhecimento transmitido.

Em especial aos meus pais e irmão por serem os melhores, sem eles nada disto seria possível. Agradeço por toda a compreensão, paciência, apoio e motivação inesgotável e pelo amor infindável. Agradeço também a todos os familiares pelo apoio e motivação ao longo de todo o percurso académico.

Ao meu amigo, colega e namorado Juaci Neto também tenho um agradecimento especial por todos estes anos de amizade, aulas, estudo, companheirismo, apoio, conselhos e motivação.

Aos colegas e amigos de sempre Ana Raquel Porfírio, Joaquim Madeira e Flávio Abreu por todos estes anos de amizade, entre-ajuda, de estudo, das brincadeiras, momentos de cibrice e todo o apoio e motivação dados ao longo do nosso percurso académico.

Na impossibilidade de agradecer individualmente a todos os meus amigos, manifesto ainda o meu agradecimento a todos eles.

Resumo

Os polímeros sintéticos têm excelente biocompatibilidade e estabilidade mecânica adequada para aplicações *in vivo*, por esta razão estes materiais têm sido muito utilizados como *scaffolds* para engenharia de tecidos. A biosílica proporciona uma superfície morfogeneticamente ativa dos *scaffolds* para o crescimento e mineralização de células do osteossarcoma humano (SaOS-2) e pode ser sintetizada pela enzima silicateína- α . Neste trabalho é apresentada uma estratégia de imobilização da enzima Cys-tag silicateína- α em fibras de policaprolactona (PCL) produzidas por *electrospinning*, para posterior síntese de biosílica.

As fibras de PCL, obtidas por *electrospinning*, foram submetidas a aminólise com fim a favorecer a imobilização da enzima. A aminólise foi comprovada por espectroscopia de infravermelho (IV) por transformada de Fourier (FTIR) com uma banda em 1567 cm^{-1} correspondente à vibração de alongamento do grupo amina. Para a imobilização, as fibras de PCL-NH₂ foram incubadas com a enzima Glu-tag silicateína- α (203 $\mu\text{g/mL}$) expressa pelo vetor pBAD/gIII A, inserido na estirpe *E. coli* TOP10, e induzida por L-arabinose (0,2%). O resultado desta imobilização, determinado por coloração de anticorpo, foi insatisfatório.

Para nova imobilização, as fibras de PCL foram revestidas com uma fina camada de ouro, através do método *sputter coating* e imobilizadas com a enzima Cys-tag silicateína- α (73 $\mu\text{g/mL}$), expressa pelo vetor pTrc-His2/2 inserido na estirpe *E. coli* BL21 e induzida por IPTG. Sendo os resultados desta imobilização, determinada por coloração de anticorpo, satisfatórios as fibras imobilizadas com Cys-tag silicateína- α foram incubadas com o substrato TEOS (250 μM). A síntese de biosílica foi confirmada através da caracterização química por MEV-EDX.

Palavras-chave: Biosílica, fibras de PCL, *Electrospinning*, Silicateína- α .

Abstract

Synthetic biopolymers have excellent biocompatibility and suitable mechanical stability for *in vivo* applications, for this reason these materials have been widely used as scaffolds for tissue engineering. Biosilica provides a morphogenetically active surface of the scaffolds for the growth and mineralization of osteoblast human cells (SaOS-2) and it can be synthesized by silicatein- α . In this study a strategy was presented to immobilize Cys-tag silicatein- α in electrospun PCL nanofibers for subsequent synthesis of biosilica.

Electrospun PCL nanofibers were aminolyzed to promote the enzyme immobilization. Aminolysis was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) with a band wavenumber at 1567 cm^{-1} due to amino group stretching vibration. For immobilization, PCL-NH₂ fibers were incubated with Glu-tag silicatein- α (203 $\mu\text{g/mL}$) expressed by pBAD/gIII A vector, inserted into *E. coli* TOP10 strain, and induced with L-arabinose (0.2%). The result of this immobilization, determined by antibody staining, was not satisfactory.

For new immobilization, PCL fibers were coated with thin films of gold, by sputter coating and immobilized with Cys-tag silicatein- α enzyme (73 $\mu\text{g/mL}$), expressed by pTrc-His2/2 vector inserted into *E. coli* BL21 and induced by IPTG. As the immobilization results determined by antibody staining were satisfactory, electrospun PCL nanofibers immobilized with Cys-tag silicatein- α were incubated with the substrate TEOS (250 μM). Biosilica synthesis was confirmed by chemical characterization SEM-EDX.

Keywords: Biosilica, Electrospun PCL nanofibers, Electrospinning, Silicatein- α .

Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VI
Abstract	VII
Índice.....	VIII
Índice de Figuras	X
Lista de Abreviaturas.....	XIII
1. Introdução.....	1
1.1 Silicateína: origem, estrutura e função	1
1.1.1 TEOS o precursor artificial de biosílica.....	3
1.1.2 Aplicações Biomédicas da biosílica	4
1.1.3 Aplicações Nanobiotecnológicas da silicateína- α	5
1.2 A técnica electrospinning	6
1.3 Policaprolactona (PCL)	8
1.3.1 Aplicações biomédicas	10
1.4 Funcionalização da superfície das nanofibras	12
Objetivos	13
2. Materiais e Métodos	14
2.1 Materiais.....	14
2.1.1 Expressão e purificação das enzimas	14
2.2 Métodos	14
2.2.1 Produção de nanofibras de Policaprolactona.....	14
2.2.2 Expressão e purificação das enzimas	16
2.2.3 Síntese de biosílica	19
3. Resultados e Discussão.....	23
3.1 Produção de nanofibras de PCL	23
3.2 Expressão e purificação das enzimas	26
3.2.1 Quantificação das enzimas	26

3.2.2 Identificação das enzimas purificadas	26
3.3 Síntese de biosilica	29
3.3.1 Imobilização das enzimas nas nanofibras de PCL.....	29
3.3.2 Síntese de biosílica	35
4. Conclusões.....	37
5. Perspetivas Futuras.....	38
Bibliografia	39

Índice de Figuras

- Figura 1.1-** Imagens de esponjas das classes Demospongiae e Hexactinellida, respetivamente. A imagem A é referente à esponja *S.domuncula* e na imagem B corresponde à esponja *H. sieboldi* (Adaptado [5]).....1
- Figura 1.2-** Modelo da estrutura 3-D da silicateína- α , onde cc representa o centro ativo da enzima que compreendem os aminoácidos Ser (Ser), Histidina (His) e Asparagina (Asn). Nesta estrutura secundária as hélices- α estão marcadas a vermelho e as folhas- β a azul (Adaptado [5]).....2
- Figura 1.3-** Representação esquemática do mecanismo de reação de síntese de biosilica utilizando a enzima silicateína alfa e TEOS como substrato. Resumindo o mecanismo proposto, inicialmente dá-se um ataque nucleofílico do oxigénio eletronegativo do aminoácido Serina (Ser) ao átomo de silício (Si), seguida de uma transferência de protão, proveniente da ligação de ponte de hidrogénio entre os aminoácidos Ser e Histidina (His), para o grupo OH da molécula de ácido silícico. Após a libertação de uma molécula de água (H₂O), dá-se outro ataque nucleofílico do átomo de oxigénio, proveniente de um dos grupos OH da molécula de ácido silícico, ao átomo de silícico de outra molécula de ácido silícico (a vermelho), seguida de uma nova transferência de protão e libertação de uma segunda molécula de H₂O. Este passo repete-se utilizando uma terceira molécula de ácido silícico (a azul) e por fim, forma-se um anel de trisiloxano que é libertado após a hidrólise da ligação Si-O-C. (Adaptado [14]).....3
- Figura 1.4-** Representação esquemática do efeito da biosilica mediada por silicateína- α nos osteoblastos, proposto por Schröder et al. 2005. A biosilica aumenta a expressão de osteoprotegerina (OPG) nos osteoblastos que neutraliza os efeitos de RANKL que induz a pré-maturação e ativação de osteoclastos (Adaptado [33]).....5
- Figura 1.5-** Representação esquemática das configurações possíveis de electrospinning sendo A a montagem típica vertical e B a montagem horizontal (Adaptado [38]).....7
- Figura 1.6-** Os diferentes polímeros utilizados no electrospinning e respetivas aplicações, sendo a Tissue engineering (engenharia de tecidos) e j Poly (ethylene oxide) (óxido de polietileno) (Adaptado [38]).....9
- Figura 1.7-** Estrutura química do polímero sintético policaprolactona (PCL) utilizado em aplicações biomédicas (Adaptado [36]).....9
- Figura 1.8-** Representação esquemática de uma estratégia para preparar *scaffolds* a partir de células retiradas da crista ilíaca (zona onde se encontra a seringa) e cultivadas em ex vivo em *scaffolds* morfogeneticamente inertes (A) ou *scaffolds* morfogeneticamente ativos (B) que foram revestidos com biosilica ou bio-poli-fosfato (bio-polyP). Em (A) as citocinas/fatores

BMP-2, ALP e PDGF foram adicionados a partir de fontes externas, enquanto que em (B) pelo menos a proteína BMP-2 e a ALP foram ativadas pelas células, resultando numa diferenciação direta para ativar os osteoblastos (Adaptado [51]).....	11
Figura 2.1- Representação esquemática dos equipamentos utilizados na produção de fibras de PCL por electrospinning (Adaptado [42]).....	16
Figura 3.1- Aspeto macroscópico da nanofibra de PCL no coletor (rede metálica), após o processo de electrospinning.....	24
Figura 3.2- Detalhe da malha fibrosa que constitui a nanofibra de PCL ainda no coletor, ampliada no microscópio digital VHX-1000 da Keyence®.....	25
Figura 3.3- Representação esquemática da reação de aminólise nas fibras de PCL. A barra cinzenta ao alto representa a fibra de PCL (Adaptado de [71]).....	25
Figura 3.4- Espectro obtido por análise de FTIR às nanofibras de PCL. (A) espectro referente ao controlo das fibras não submetidas a aminólise e (B) espectro corresponde à nanofibra de PCL submetida a aminólise, com uma banda em 1567 cm ⁻¹ correspondente à vibração de alongamento do grupo amina.....	26
Figura 3.5- Géis de poliacrilamida referentes à purificação das enzimas (a) Glu-tag silicateína- α , e (b) Cys-tag silicateína- α . M representa o marcador em kDa, E1 e E2 são referentes às frações eluato 1 e eluato 2.....	28
Figura 3.6- Caracterização das enzimas Cys-tag silicateína- α (1) e Glu-tag silicateína- α (2) analisadas por Western-Blot. (M) marcador em kDa.....	29
Figura 3.7- Imobilização da Glu-tag silicateína- α em nanofibras de PCL analisado por coloração por anticorpo. (A) é o controlo da imagem microscópica (Quanta x?) da nanofibra de PCL; (B) o mesmo campo fotografado sob luz UV. Neste ensaio, a enzima foi imobilizada em nanofibras de PCL e PCL-NH ₂ , por conseguinte, temos uma imagem microscópica (C) das nanofibras de PCL com Glu-tag silicateína- α ; (D) o mesmo campo fotografado sob luz UV; (E) a imagem microscópica da nanofibra PCL-NH ₂ com Glu-tag silicateína- α e (F) o mesmo campo fotografado sob luz UV.....	31
Figura 3.8- Imobilização da Glu-tag silicateína- α em nanofibras de PCL-NH ₂ , analisado por coloração por anticorpo. (A) é o controlo da imagem microscópica (Quanta x?) da fibra de PCL-NH ₂ ; (B) o mesmo campo fotografado sob luz UV; (C) nanofibra de PCL-NH ₂ com Glu-tag silicateína- α em sobreposição da imagem sob luz UV (D) o mesmo campo fotografado sob luz UV.....	33
Figura 3.9- Representação esquemática da imobilização dos grupos tiol da Cys-tag silicateína- α na camada de ouro que cobre a nanofibra de PCL.....	34
Figura 3.10- Nanofibras de PCL fixas na base de grafite dos pins de MEV. A nanofibra da direita apresenta uma camada fina de ouro, efetuada por sputter coating, e a nanofibra da esquerda representa o controlo.....	34

Figura 3.11- Imobilização da Cys-tag silicateína- α em fibras de PCL analisado por coloração por anticorpo. (A) é o controlo da imagem microscópica (Quantasx?) da fibra de PCL; (B) o mesmo campo fotografado sob luz UV; (C) nanofibra de PCL revestida a ouro com Cys-tag silicateína- α ; (D) o mesmo campo fotografado sob luz UV.....35

Figura 3.12- Análise por MEV-EDX, das nanofibras de PCL imobilizadas com Cys-tag silicateína- α e incubadas com solução de TEOS pré-hidrolisado, com fim a identificar a síntese de biosílica. (A), é o controlo; (B) a análise por EDX; (C) da nanofibra de PCL com Cys-tag silicateína- α imobilizada na camada de ouro e incubada com TEOS ; (D) análise por EDX.....36

Lista de Abreviaturas

ALP- Fosfatase Alcalina

Asn- Aspargina

Bio-polyP- bio-poli-fosfato

BMP-2- Proteína morfogenética do osso-2

BSA- albumina do soro bovino

cc- centro ativo

CHAPS - (3- [(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfanado

Cys- Cisteína

EDX- Espectroscopia de raios X por dispersão em energia

FDA -Food and Drug Administration

FTIR- Espectroscopia de Infravermelho (IV) por Transformada de Fourier

Glu- Glutamato

His- Histidina

IMAC- Cromatografia de afinidade com metais

IPTG- Isopropiltio- β -galactoside

LB - meio Luria-Bertani

MEV- Microscópio Eletrónico de Varrimento

MWCO- Faixa de corte de peso molecular

NTA- Ácido Nitrilotriácetico

OPG- Osteoprotegerina

PCL- policaprolactona

PCL-NH₂- Fibras de PCL que passaram por aminólise

PDGF- Factor de crescimento derivado de plaquetas

PGA- Ácido poliglicólico

PLA- Ácido polilático

RANKL- Recetor ativador do fator nuclear kappa B-ligando

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio

Ser- Serina

TEOS- Tetraetilo ortosilicato

Ti-BALDH- Dihidroxidilactatotitanato (IV) de amónio

Tris- Tris(hidroximetil)aminometano

UV- Ultra-violeta

1. Introdução

1.1 Silicateína: origem, estrutura e função

As esponjas são animais aquáticos pertencentes ao filo Porifera, e são o grupo mais antigo do reino Animalia ainda existentes na Terra. Este grupo de animais vive fixo sob o substrato onde absorve e filtra a água para seu alimento. As esponjas têm um nível de organização simples no qual existem células especializadas para diversas funções vitais, mas que não se encontram organizados em tecidos ou órgãos. Possuem também uma ‘pele’ que cobre o seu exterior bem como o seu sistema de canais internos [1].

Entre estas, as esponjas siliciosas são de grande interesse devido ao composto que constitui os seus esqueletos, o polímero silicioso ou poli-silicato, ao contrário da maioria das esponjas que possuem um esqueleto composto por biominerais baseados em cálcio [2][3][10]. As esponjas siliciosas foram divididas em duas classes *Hexactinellida* e *Demospongiae* [4] e têm esqueleto formado por espículos que consistem em filamentos axiais.

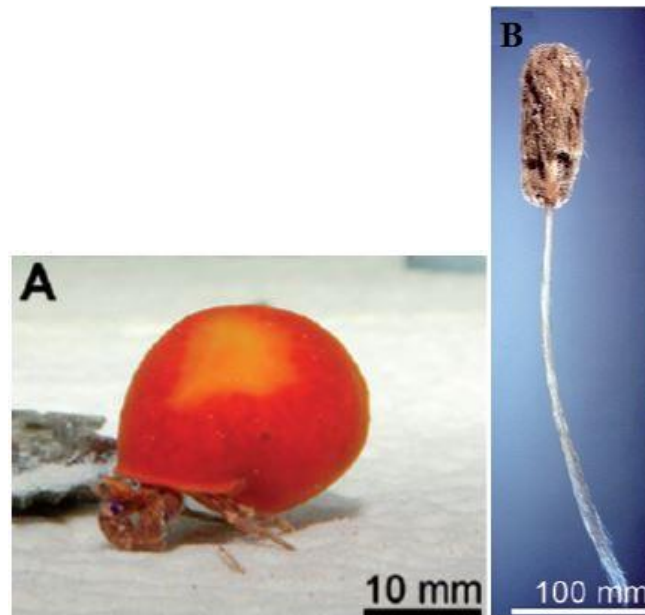


Figura 1.1- Imagens de esponjas das classes *Demospongiae* e *Hexactinellida*, respectivamente. A imagem **A** é referente à esponja *S. domuncula* e na imagem **B** corresponde à esponja *H. sieboldi* (Adaptado [5]).

O estudo da formação destes espículos levou a descoberta da enzima responsável pela síntese do polímero poli-silicato, designada de silicateína. As silicateínas foram identificadas nos filamentos axiais das demoesponja *Tethya aurantium* [4][6], a partir da análise parcial da proteína seguida de clonagem molecular. Estas proteínas pertencem à superfamília de proteases de cisteínas e estão intimamente relacionadas com as catepsinas-L [4][7]. Nas silicateínas o centro ativo é composto pelos aminoácidos Ser138 (na *S. domuncula*), His227 e Asn350, enquanto que no centro ativo das catepsinas o aminoácido Ser é substituído por Cys. Os autores Zhou *et al*, (1999) [8] evidenciaram que a interação entre os aminoácidos Ser e His é essencial para o mecanismo de policondensação catalisada pela silicateína. As silicateínas podem ser encontradas em três isoformas diferentes: silicateína- α , silicateína- β e silicateína- γ [6].



Figura 1.2- Modelo da estrutura 3-D da silicateína- α , onde **cc** representa o centro ativo da enzima que compreendem os aminoácidos Ser (**Ser**), Histidina (**His**) e Asparagina (**Asn**). Nesta estrutura secundária as hélices- α estão marcadas a vermelho e as folhas- β a azul (Adaptado [5]).

Sendo o poli-silicato catalisado pela enzima silicateína- α , este foi designado de biosílica. A síntese de biosílica nas esponjas ocorre durante o crescimento radial e axial dos espículos, no meio aquático pobre em sílica [4]. A biosílica sintetizada nas esponjas tem uma estrutura amorfa, que contrariamente à forma cristalina não provoca respostas autoimunes que podem levar a uma silicose [9]. Além disso a biosílica é diferente dos habituais compostos orgânicos siliciosos uma vez que possui ligações carbono-silício que não ocorrem naturalmente [10].

A grande vantagem da síntese de biossílica via enzimática está nas propriedades da silicateína que permite que a biossilificação ocorra a baixa temperatura e a um pH quase neutro (pH de 8). Estas propriedades são importantes no que toca ao revestimento de materiais sensíveis ao calor ou a materiais que possam ser danificados quando se encontram em condições de pH alcalino ou ácido [11].

1.1.1 TEOS o precursor artificial de biossílica

Na síntese de biossílica em sistemas *in vitro* tem sido utilizado como substrato da enzima silicateína- α o tetraetilo ortosilicato (TEOS) [12][13]. A síntese de biossílica mediada pela silicateína- α é efetuada com concentrações do precursor (em torno de 200 μM) muito inferiores às quais possa ocorrer precipitação do substrato ($\geq 1 \text{ mM}$) [4].

A reação de síntese de biossílica utilizando a enzima silicateína- α e o substrato TEOS, foi proposta pelos autores Schröder *et al.*, (2012) [13] que inclui uma suposição necessária: a implicação crucial do aminoácido Ser, do centro ativo da enzima, representada pela Figura 1.3.

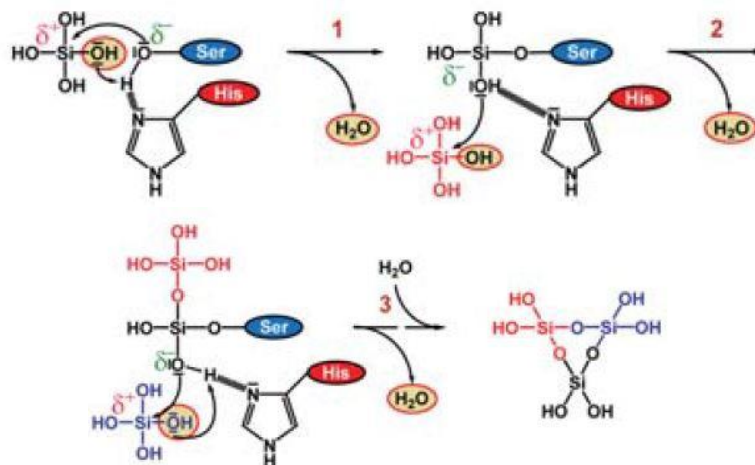


Figura 1.3- Representação esquemática do mecanismo de reação de síntese de biossílica utilizando a enzima silicateína- α e TEOS como substrato. Resumindo o mecanismo proposto, inicialmente dá-se um ataque nucleofílico do oxigênio eletronegativo do aminoácido Serina (Ser) ao átomo de silício (Si), seguida de uma transferência de próton, proveniente da ligação de ponte de hidrogênio entre os aminoácidos Ser e Histidina (His), para o grupo OH da molécula de ácido silícico. Após a libertação de uma molécula de água (H_2O), dá-se outro ataque nucleofílico do átomo de oxigênio, proveniente de um dos grupos OH da molécula de ácido silícico, ao átomo de silício de outra molécula de ácido silícico (a vermelho), seguida de uma nova transferência de próton e libertação de uma segunda molécula de H_2O . Este passo repete-se utilizando uma terceira molécula de ácido silícico (a azul) e por fim, forma-se um anel de trisiloxano que é libertado após a hidrólise da ligação Si-O-C. (Adaptado [14]).

1.1.2 Aplicações Biomédicas da biossílica

Atualmente, sendo a silicateína a única enzima conhecida que promove naturalmente a biomineralização [15][16][17], a descoberta e caracterização das biomoléculas envolvidas na biossificação das esponjas têm contribuído consideravelmente para várias abordagens que visam desenvolver materiais biomiméticos [18][19][20][21]. Para que esta enzima possa ser utilizada em estudos de biomimética foi desenvolvida, a partir de técnicas de engenharia genética, a silicateína recombinante contendo o tag de afinidade de histidinas mantendo-se biocataliticamente ativa quando imobilizada em superfícies [15].

O uso da biossílica sintetizada pela silicateína recombinante é de grande interesse para uma variedade de aplicações biomédicas, tais como engenharia de tecidos ou revestimento de implantes que promovem a regeneração óssea, não só devido à sua biocompatibilidade e durabilidade [22] mas também porque a sílica é um constituinte de vários materiais utilizados como *scaffolds* [11].

Os autores Schröder *et al*, (2005) [23] mostraram que a mineralização de células formadoras de osso humano (da linha celular de osteossarcomas humana SaOS-2) aumenta significativamente quando as células crescem em superfícies revestidas de biossílica sintetizada por via enzimática. Provando assim que a aplicação de superfícies revestidas com biossílica, mediada pela silicateína recombinante, nas áreas de engenharia de tecidos, medicina regenerativa ou restauradora é bastante promissora [24][25]. Foi igualmente comprovado que a biossílica estimula a expressão dos genes envolvidos na formação óssea e de cartilagem [26][27] e induz simultaneamente a diferenciação osteogénica e a mineralização [27][28][29][30]. Na medicina regenerativa e restauradora, a estimulação da deposição de hidroxiapatite mediada por osteoblastos é bastante desejável, por exemplo, para auxiliar a regeneração do osso e formar ligações mecanicamente estáveis entre os implantes e o tecido (osseointegração) [27][31]. Além disso, a biossílica mostrou também estar envolvida na estimulação da expressão das proteínas amelogenina e enamelinina que controlam a formação do esmalte dentário humano [27][32], indicando uma potencial aplicação na área de manutenção e regeneração dentária.

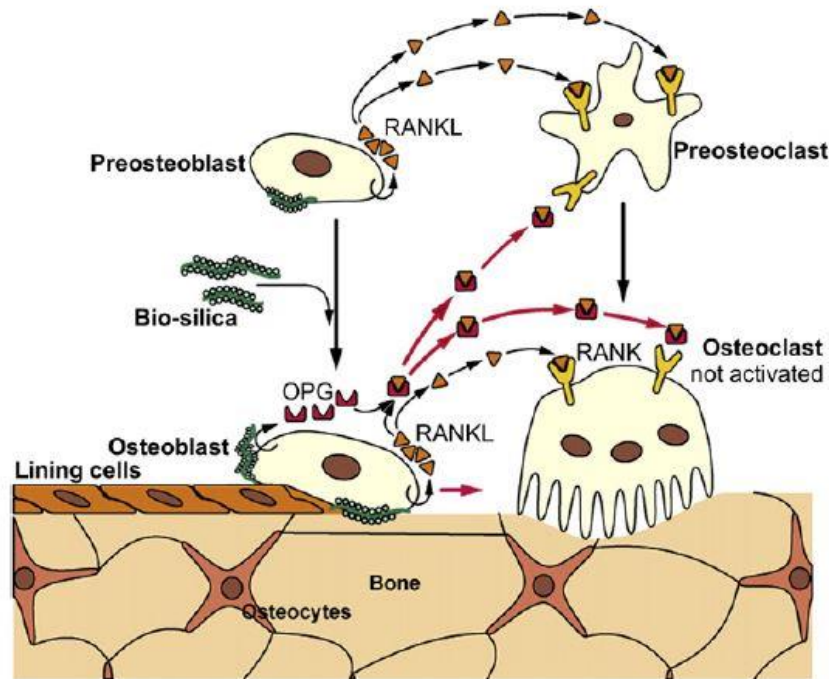


Figura 1.4- Representação esquemática do efeito da biossílica mediada por silicateína- α nos osteoblastos, proposto por Schröder et al, 2005. A biossílica aumenta a expressão de osteoprotegerina (OPG) nos osteoblastos que neutraliza os efeitos de RANKL que induz a pré-maturação e ativação de osteoclastos (Adaptado [33]).

1.1.3 Aplicações Nanobiotecnológicas da silicateína- α

A silicateína não só media a síntese de biossílica mas também a formação de metais óxidos, tais como o dióxido de titânio (TiO_2) [11][16][34] e o dióxido de zircônio (ZrO_2) [11][16][35] a partir de precursores estáveis em água à temperatura ambiente e pH neutro. Esta propriedade da silicateína abre novas áreas potenciais de aplicação desta enzima. Estes metais óxidos são conhecidos pelas suas propriedades semicondutoras, piezoelétricas, dielétricas e optoeletrônicas. O TiO_2 , um semicondutor que permite que os dispositivos operem a voltagens altas, é utilizado em optoeletrônica, células solares, e fotocatalise. Enquanto o ZrO_2 é utilizado na fabricação de materiais piezoelétricos, dielétricos e optoeletrônicos. A síntese química destes metais requer condições de pH e temperaturas extremas, no entanto a silicateína possibilita a síntese destes metais óxidos por via enzimática usando os precursores estáveis em água, dihidroxidodilactatotitanato (IV) de amônio (Ti-BALDH) e hexafluorozirconato aniônico (F_6Zr^{-2}) [11][16].

1.2 A técnica electrospinning

A combinação do uso das técnicas *electrospray* e *spinning*, originou uma técnica altamente versátil chamada *electrospinning*. Esta técnica caracteriza-se pela capacidade de produzir fibras de forma contínua ao aplicar um campo elétrico à gota de um polímero viscoso. O campo elétrico leva a deformação da gota, numa estrutura designada de cone de Taylor, e por fim à formação de um jacto estável [36].

Esta técnica foi inicialmente descrita e patenteada por Formhals num projeto de nome “Processo e aparelho para a produção de filamentos artificiais” [37]. O *electrospinning* é a única técnica que aborda o uso de forças electroestáticas para produzir fibras a partir de uma solução de polímero ou de uma massa fundida. As fibras obtidas por este processo apresentam um diâmetro mais fino (de nanómetro para micrómetro) e uma área de superfície maior, em relação às fibras produzidas pelos processos de *spinning* convencionais [38].

O *electrospinning* é realizado à temperatura ambiente e em condições atmosféricas. As suas configurações atuais desta técnica são verticais ou horizontais. Resumidamente o sistema consiste em três componentes principais: uma fonte de alimentação de alta tensão, um *spinneret* (pode ser uma ponta de pipeta ou uma agulha de seringa) e um coletor (normalmente uma rede metálica ou uma placa). A fonte de alimentação de alta tensão é utilizada para aplicar carga, de uma determinada polaridade, para uma solução de polímero ou de massa fundida que é então ejetada num jacto para o coletor de polaridade oposta [38][39][40].

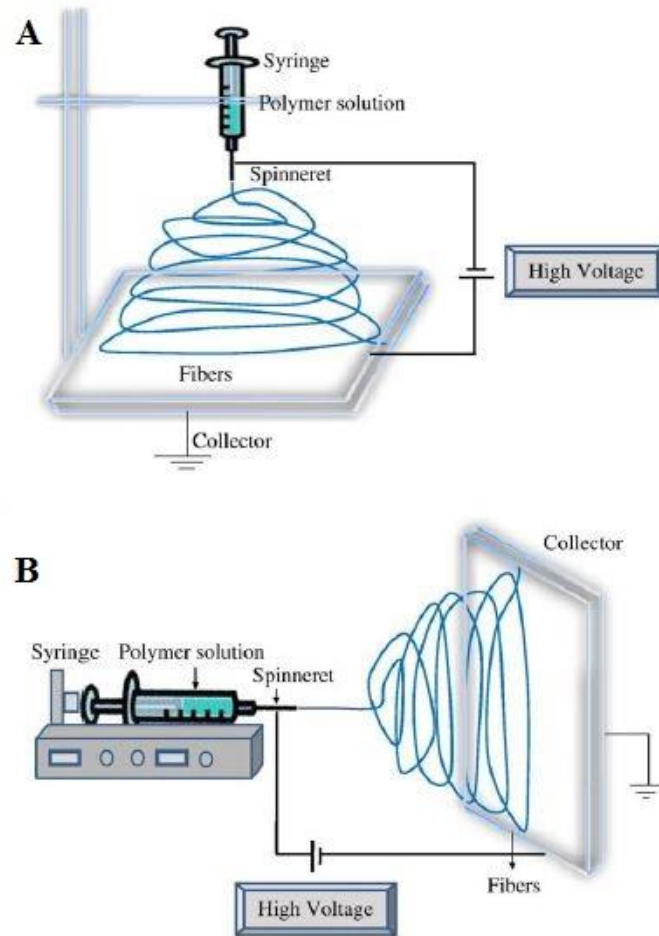


Figura 1.5- Representação esquemática das configurações possíveis de *electrospinning* sendo **A** a montagem típica vertical e **B** a montagem horizontal (Adaptado [38]).

A maioria dos polímeros utilizados no processo de *electrospinning* são previamente dissolvidos em alguns solventes, e quando se encontram completamente dissolvidos obtém-se a solução de polímero. O fluido de polímero é então introduzido no tubo capilar (normalmente uma agulha) que é submetido a um campo elétrico para iniciar o *electrospinning*. O cone de Taylor forma-se quando é atingido um equilíbrio entre a força eletrônica da superfície carregada e a superfície de tensão. Quando o campo elétrico aplicado atinge um valor crítico, as forças elétricas repulsivas superam as forças de tensão de superfície, levando ao alongamento do cone. Conseqüentemente é ejetado um jato carregado eletricamente proveniente do cone de Taylor onde ocorre um rápido e instável chicoteamento, no espaço entre a ponta do tubo capilar e o coletor, levando assim à evaporação do solvente [38][41]. O processo de *electrospinning* oferece assim uma técnica simples para a produção de fibras [38].

As fibras produzidas por *electrospinning* são mais finas em diâmetro e o seu processo de fabricação é menos complexo caso fosse realizado por automontagem, é por esta razão que pode ser utilizado para uma variedade de materiais. Esta técnica ganhou maior atenção nos últimos anos devido às suas aplicações biomédicas e industriais, pois as estruturas produzidas por *electrospinning* são comparadas com fibras naturais e são caracterizadas pelo seu elevado rácio superfície-para-volume, porosidade ajustável e elevada flexibilidade para produzir uma variedade de formas e tamanhos [43]. O *electrospinning* também oferece a capacidade de controlar a composição das nanofibras de modo a alcançar os resultados que estejam de acordo com as suas propriedades e funcionalidade [38].

A desvantagem desta técnica está relacionada com a necessidade de uma grande quantidade de fibras para diversas aplicações e o seu *scale up* não é muito viável [38].

Esta técnica tem ganho muita atenção na última década não só devido à sua versatilidade de polímeros usados na produção de fibras, mas também devido à sua capacidade de produzir fibras na gama de nanómetros de forma consistente, que é difícil de conseguir utilizando técnicas de *spinning* convencionais [38].

1.3 Policaprolactona (PCL)

Há uma vasta gama de polímeros que podem ser utilizados no *electrospinning* com a capacidade de formar nanofibras de diâmetros na ordem dos micrómetros e que possam ser utilizadas em diversas aplicações. Estas nanofibras têm sido mencionadas por provirem de polímeros sintéticos, polímeros naturais e até mesmo de uma mistura de ambos, incluindo proteínas [38][43][44], ácidos nucleicos [38][45] e também polissacáridos [38][46][47].

Polymers	Applications
Poly(glycolide) (PGA)	Nonwoven TE ^a scaffolds
Poly(lactide-co-glycolide)(PLGA)	Biomedical applications, wound healing
Poly(ε-caprolactone) (PCL)	Bone tissue engineering
Poly(l-lactide) (PLLA)	3D cell substrate
Polyurethane (PU)	Nonwoven tissue template wound healing
Poly(ethylene-co-vinyl alcohol) (PEVA)	Nonwoven tissue engineering scaffold
Polystyrene (PS)	Skin tissue engineering
Syndiotactic 1,2-polybutadiene	Tissue engineering applications
Fibrinogen	Wound healing
Poly(vinyl alcohol)/cellulose acetate (PVA/CA)	Biomaterials
Cellulose acetate	Adsorptive membranes/felts
Poly(vinyl alcohol)	Wound dressings
Silk fibroin, silk/PEO ^j	Nanofibrous TE scaffold
Silk	Biomedical Applications
Silk fibroin	Nanofibrous scaffolds for wound healing
Silk/chitosan	Wound dressings
Chitosan/PEO	TE scaffold, drug delivery, wound healing
Gelatin	Scaffold for wound healing
Hyaluronic acid, (HA)	Medical implant
Cellulose	Affinity membrane
Gelatin/polyaniline	Tissue engineering scaffolds
Collagen/chitosan	Biomaterials

Figura 1.6- Os diferentes polímeros utilizados no *electrospinning* e respectivas aplicações, sendo ^a Tissue engineering (engenharia de tecidos) e ^j Poly(ethylene oxide) (óxido de poli-etileno) (Adaptado [38]).

Entre os diferentes tipos de polímeros, tais como o ácido poliglicólico (PGA) e o ácido polilático (PLA), o policaprolactona ou poli(ε-caprolactona) (PCL) tem a vantagem de não formar isómeros e mantém inalterado a sua via de degradação biológica assim como o seu ponto de fusão. O PCL é um poliéster alifático formado a partir de polimerização em anel aberto do cíclico caprolactona ou ε-caprolactona, e é biodegradável em ambientes bióticos como o solo, a água do mar ou lamas ativas. Este polímero pode ser utilizado em múltiplos processos de produção de padrões de superfície em escala nano para aplicações biomédicas [42].

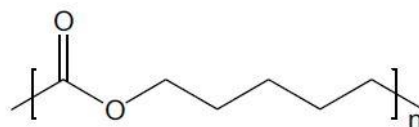


Figura 1.7- Estrutura química do polímero sintético policaprolactona (PCL) utilizado em aplicações biomédicas (Adaptado [36]).

1.3.1 Aplicações biomédicas

Polímeros sintéticos e biodegradáveis têm vindo a atrair uma considerável atenção para aplicações em dispositivos médicos e terão um papel importante no design e função destes dispositivos. Os critérios gerais para a utilização de materiais de polímeros em dispositivos médicos incluem propriedades mecânicas e tempo de degradação apropriado à finalidade médica em causa. Além disso os materiais não devem ser tóxicos nem devem ativar respostas imunológicas, estes polímeros devem ser metabolizados no corpo após o cumprimento das suas tarefas [48].

1.3.1.1 Dispositivos ortopédicos

Os dispositivos ortopédicos feitos a partir de materiais biodegradáveis têm vantagem em relação aos de metal ou aos materiais não biodegradáveis. Estes podem transferir stress ao longo do tempo para a área danificada enquanto cura, levando a uma degradação mais rápida do implante não sendo assim necessário uma segunda cirurgia para remover os dispositivos implantados [49]. O PCL sendo um polímero biodegradável tem sido amplamente utilizado para esta aplicação [50].

1.3.1.2 Dispositivos médicos descartáveis

Muitos dispositivos médicos descartáveis, tais como seringas, luvas e compressas são geralmente feitos a partir de plásticos não degradáveis, resultando em sérios problemas ambientais e económicos. Sendo o PCL um polímero biodegradável, é um material promissor para o uso de dispositivos médicos descartáveis atendendo assim aos requerimentos ambientais amigáveis [49].

1.3.1.3 Engenharia de tecidos

O objetivo principal da engenharia de tecidos é superar a falta de doadores de tecidos e as respostas imunes entre recetores e doadores. No procedimento de engenharia de tecidos, as células são cultivadas num *scaffold* para formar um tecido natural, em seguida o tecido formado é implantado nos pacientes. Em alguns casos, o *scaffold* ou o *scaffold* com células é implantado *in vivo* diretamente, e o corpo do hospedeiro trabalha como um biorreator para construir novos tecidos. Um implante de engenharia de tecidos bem-sucedido depende muito do desempenho dos *scaffolds* tridimensionais e porosos. Os *scaffolds* ideais devem ser biodegradáveis e bio-absorvíveis de modo a favorecer a substituição de novos tecidos. Além disso os *scaffolds* devem ser biocompatíveis, evitar reações inflamatórias ou imunes e devem também possuir propriedades mecânicas adequadas para permitir o crescimento dos novos tecidos [49].

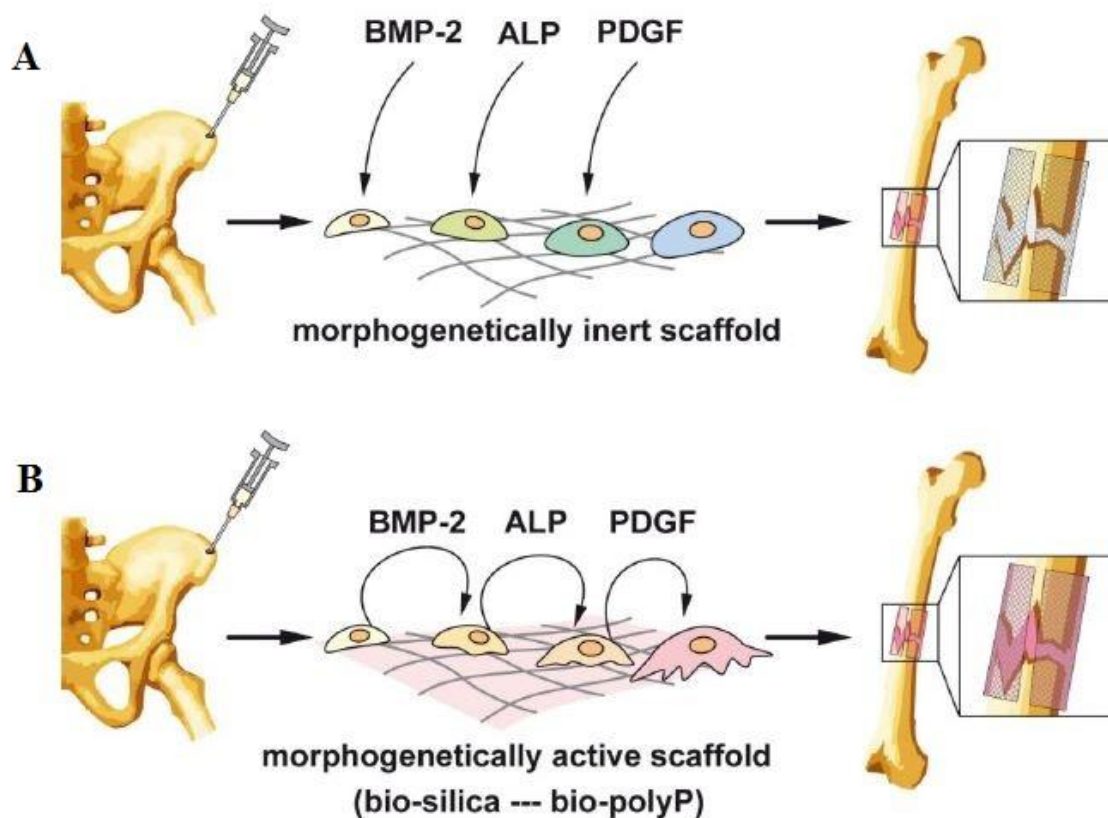


Figura 1.8- Representação esquemática de uma estratégia para preparar *scaffolds* a partir de células retiradas da crista ilíaca (zona onde se encontra a seringa) e cultivadas *ex vivo* em *scaffolds* morfogeneticamente inertes (A) ou *scaffolds* morfogeneticamente ativos (B) que foram revestidos com biosilica ou bio-poli-fosfato (**bio-polyP**). Em (A) as citocinas/fatores BMP-2, ALP e PDGF foram adicionados a partir de fontes externas, enquanto que em (B) pelo menos a proteína BMP-2 e a ALP foram ativadas pelas células, resultando numa diferenciação direta para ativar os osteoblastos (Adaptado [51]).

Os bio-polímeros sintéticos tais como o PCL e o PGA têm excelente biocompatibilidade, boas propriedades mecânicas e foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para aplicações *in vivo*, por esta razão estes materiais têm sido os mais utilizados como *scaffolds* para engenharia de tecidos [52].

O PCL tem sido utilizado para engenharia de tecido ósseo [52], engenharia de tecidos de cartilagem [53], engenharia de tecidos cardiovasculares [54], substituição arterial [55], engenharia de tecidos de válvula cardíaca [56], engenharia de tecidos de intestino delgado [57], engenharia de tecidos de regeneração de nervos [58][59][60], substitutos dérmicos para regeneração de pele [49], substituição de ligamentos [61] e engenharia de tecidos geniturinários [62].

Uma limitação destes polímeros sintéticos é o fato do material usado carecer de estímulos biológicos que podem promover a adesão celular, a proliferação e a recuperação de tecido. A fim de melhorar as bio-propriedades dos polímeros sintetizados e para melhorar as suas interações com as células, compostos de polímeros sintéticos biodegradáveis, polímeros naturais e mistura de polímeros biodegradáveis têm sido utilizados para preparar *scaffolds* para engenharia de tecidos [63][64][65].

1.4 Funcionalização da superfície das nanofibras

As fibras produzidas por *electrospinning*, têm um grande potencial para diversas aplicações por possuir uma elevada área de superfície. Também são de interesse as fibras com propriedades específicas na sua superfície, pois em muitas aplicações técnicas as características da superfície podem afetar a sua adsorção, adesão e a sua capacidade de se manter húmida. No entanto, a superfície destas fibras pode não ser a ideal para algumas aplicações.

Como tal, têm sido desenvolvidas técnicas com vista a modificar as propriedades da superfície das fibras. Dentro das técnicas existentes, o *sputter coating* ou pulverização catódica é a técnica mais promissora para tornar funcional a superfície destas fibras. O *sputter coating* é uma técnica que se baseia no bombardeamento de material condutor, na maioria dos

casos é utilizado metais como o ouro e o paládio, de forma a revestir e formar uma camada fina [66].

Para esta técnica, o ouro é frequentemente escolhido por ser de fácil obtenção, é um metal inerte que não oxida a temperaturas abaixo do seu ponto de fusão, não reage com o oxigénio atmosférico nem com a maioria dos químicos. Estas propriedades permitem trabalhar e manipular amostras sob condições atmosféricas. No entanto o ouro liga-se com grande afinidade aos grupos tiol e é compatível com células, ou seja, superfícies revestidas com ouro permitem a adesão e funcionamento das células sem evidenciar toxicidade [67]. Inclusive os autores Anselme e Biggerelle (2006) [68] comprovaram que o revestimento de ouro é uma boa maneira de melhorar a adesão celular de osteoblastos humanos e talvez a adesão de tecido. Também foi mostrado pelos autores Lin e Huang (2014) [69] que o sputter coating com ouro tem um potencial considerável para aplicações dentárias.

Objetivos

O revestimento de biosílica nas fibras de PCL poderá fornecer uma superfície estável e morfogeneticamente ativa, de modo a ser utilizado como *scaffold* na área de engenharia de tecido ósseo [70].

Este estudo teve como objetivo principal delinear uma estratégia para revestir fibras de policaprolactona com biosílica, a partir da enzima recombinante Cys-tag silicateína- α imobilizada. A síntese das fibras de policaprolactona realizou-se através da técnica *electrospinning* e de modo a imobilizar o tag de afinidade da enzima na sua superfície, recorreu-se á funcionalização das mesmas. Com a enzima imobilizada o revestimento de biosílica foi utilizado o substrato TEOS.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Expressão e purificação das enzimas

2.1.1.1 Estirpe celular e vetores de expressão

Neste trabalho foi utilizada inicialmente a enzima recombinante, Glu-tag silicateína- α , expressa pelo vetor pBAD/gIII A (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) inserido na estirpe *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) e induzida por L-arabinose (0,2%) já existente no laboratório. Em estudos posteriores foi também utilizada a enzima Cys-tag silicateína- α , expressa pelo vetor pTrc-His2/2 inserido na estirpe *E. coli* BL21 (Novagen, Alemanha) e induzida por IPTG.

2.2 Métodos

2.2.1 Produção de nanofibras de Policaprolactona

A fim de sintetizar biosílica, foram produzidas nanofibras de PCL. Para a preparação da solução do polímero dissolveu-se 1 gr de policaprolactona $[(C_6H_{10}O_2)_n]$, Sigma-Aldrich] em 10 mL de acetona (Carl Roth, Alemanha).

De modo a produzir as nanofibras de PCL por *electrospinning*, uma seringa de plástico, acoplada a uma bomba peristáltica (Bio-rad, Model EP-1 Econo Pump, Reino Unido), foi carregada com a solução do polímero (**p**) e à agulha metálica (**sn**) foi fixada uma mola crocodilo diretamente ligada ao polo positivo duma fonte de alimentação de alta

diferença de potencial (PNC3p, 30000-2; Heinzinger Electronic, Alemanha). Durante o processo de *electrospinning* as fibras do polímero (**j**) são recolhidas num coletor (rede metálica) (**c**) (10,5 cm x 10,5 cm) ligado ao polo negativo do gerador e fixo sobre um cilindro metálico giratório (**mo**). A distância entre a agulha e o coletor de fibras foi ajustada a 15 cm.

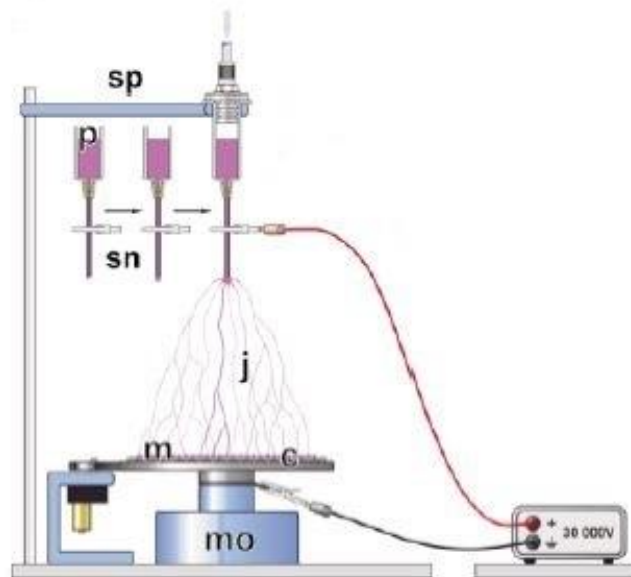


Figura 2.1- Representação esquemática dos equipamentos utilizados na produção de fibras de PCL por *electrospinning* (Adaptado [42])

Após a montagem do equipamento (Figura 2.1), é aplicado um campo elétrico de 20-30 KV e o fino polímero é ejetado da agulha (**j**), a uma taxa de fluxo de 0,1 mL/h. As nanofibras são recolhidas pelo coletor (**c**) sob a forma de um tapete de malha fibrosa (**m**) com a espessura de 1 mm. Terminado o procedimento de *electrospinning*, as nanofibras são retiradas da rede metálica e cortadas em pequenos círculos/fragmentos de modo a encaixarem em placas de 12 poços.

2.2.1.1 Fixação de um grupo amina nas nanofibras de PCL

De modo favorecer a imobilização de enzima nas nanofibras, estas foram submetidas a aminólise. Para tal as nanofibras de PCL foram incubadas a 40°C durante 1 h num tubo *Falcon* contendo uma solução de 9 mL de isopropanol (C₃H₈O da Merk) e 1 mL de etilenodiamina

[C₂H₄(NH₂)₂, Sigma-Aldrich]. Como controlo incubaram-se nanofibras de PCL em isopropanol.

Após incubação, as nanofibras foram dispostas sobre papel de filtro e colocadas a secar em estufa a 40°C durante 24h para remover o solvente.

2.2.2 Expressão e purificação das enzimas

2.2.2.1 Expressão da Glu-tag silicateína- α

Preparou-se um pré-inóculo de *E.coli* TOP 10 em 20 mL de meio LB contendo 0,1 mg/mL de ampicilina (Carl Roth, Alemanha) incubado *overnight* a 37°C sob agitação a 180 rpm (ES-20 da Biosan, Alemanha). O pré-inóculo foi adicionado a 1 L de meio LB contendo ampicilina e a cultura foi mantida nas mesmas condições até atingir uma D.O._(600 nm) de 0,4 - 0,6 (aproximadamente 4 h). Para expressar a enzima Glu-tag silicateína α adicionou-se L-arabinose a 0,2% w/v (Carl Roth, Alemanha), e a cultura foi incubada a 36°C sob agitação a 180 rpm por mais 4 h.

2.2.2.2 Expressão Cys-tag silicateína α

Na expressão da enzima Cys-tag silicateína- α foram adicionados 20 mL do pré-inóculo a 1 L de meio LB instantâneo contendo IPTG (Carl Roth, Alemanha) e 0,1 mg/mL ampicilina. A cultura foi incubada *overnight* a 37°C sob agitação a 180 rpm.

2.2.2.3 Extração e purificação das proteínas

Sendo as duas proteínas, Glu-tag silicateína- α e Cys-tag silicateína- α , de origem intracelular e insolúveis, utilizaram-se as mesmas metodologias para a rutura celular, extração e respetiva purificação.

Para tal a cultura foi centrifugada (Sorvall RC 5D da DuPont, Alemanha) durante 30 min a 10°C, a 6000 rpm o sobrenadante foi descartado e o *pellet* bacteriano congelado a -20°C para aumentar a rutura celular e posterior extração proteica. Depois de descongelados, os *pellets* foram lavados e ressuspensos duas vezes em 100 mL de tampão 25 mM Tris, pH 8, (aproximadamente 10 mL de tampão/ g de *pellet*), centrifugando a 6000 rpm durante 20 min a 10°C entre cada lavagem. Para facilitar a lise celular os *pellets* foram ressuspensos Cell Lytic B 10x da Sigma-Aldrich® diluído 1:10 em 25 mM Tris, pH 8, e centrifugados a 6000 rpm durante 20 min a 10°C. Os sobrenadantes foram descartados e efetuou-se uma nova ressuspensão em Cell Lytic B 10x, agora diluído 1:100 em 25 mM Tris, pH 8, as bactérias foram coletadas por centrifugação 6000 rpm durante 20 min a 10°C.

Em seguida os *pellets* foram ressuspensos em tampão de lise (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Ureia, 10 mM Imidazol) (aproximadamente 5 mL de tampão/ g de *pellet*) durante 1 h a temperatura ambiente. Devido às proteínas se encontrarem em corpos de inclusão foram adicionados dois ciclos de sonicação (Sonicador Branson B-12 da Heinemann, Alemanha) durante 30 s numa potência de 50%. O lisado obtido foi centrifugado a 6000 rpm a 10°C durante 30 min e o sobrenadante foi congelado até à purificação.

Após a preparação prévia de Ni-NTA agarose (QIAGEN®) efetuada de acordo com as instruções do fabricante a resina foi adicionada ao lisado (1 mL inicial de Ni-NTA agarose para 4 mL de lisado) e a mistura mantida sob agitação durante aproximadamente 60 min à temperatura ambiente.

As colunas de cromatografia foram carregadas com o lisado e Ni-NTA e a purificação efetuou-se em condições de desnaturação. A fração *flow-through* composto por material que não aderiu à matriz foi descartada e em seguida as colunas de cromatografia foram lavadas primeiro com 5 mL do tampão de lavagem 1 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Ureia, 20 mM Imidazol) e depois com 5 mL do tampão de lavagem 2 (100 mM NaH₂PO₄, 50 mM Imidazol, 4 M Ureia, 10 mM Tris-HCl). Por fim as colunas foram eluídas com 5 mL do tampão de eluição 1 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Ureia, 100 mM Imidazol) e

com 5 mL do tampão de eluição 2 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Ureia, 250 mM Imidazol). As frações de eluição foram conservadas a 4°C para posteriores análises de quantificação, eletroforese e caracterização.

2.2.2.4 Quantificação das enzimas

A quantificação das enzimas purificadas efetuou-se pelo método de *Bradford* utilizando o reagente *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Roti[®]-Quant da Carl Roth, Alemanha). A leitura da absorvância_(595nm) das amostras foi realizada por num leitor multimodo Varioskan Flash 100-240V (Thermo Scientific, Alemanha). Para estabelecer a curva padrão utilizou-se albumina do soro bovino (BSA) fração V (Thermo Scientific, Alemanha).

2.2.2.5 Identificação das proteínas purificadas

Para avaliação e identificação das proteínas de interesse, recorreu-se à eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) das frações recolhidas durante a purificação.

Às frações eluato 1 e eluato 2 retirou-se 12 µL e adicionou-se 4 µL SDS *loading buffer* (4x) (Roti Load 1 da Carl Roth). A eletroforese efetuou-se no sistema XCell SureLock[™] Mini-Cell (Novex[®], Alemanha) e como marcador de peso molecular utilizou-se 10 µL de Sharp Pre-Stained Protein Standard (Novex[®], Alemanha). A eletroforese correu a uma diferença de potencial fixa de 120 V.

Após a eletroforese, o gel foi incubado *overnight* na solução de coloração Gel Code[™] Blue Safe (Thermo Scientific) à temperatura ambiente. Por fim, a solução de coloração foi descartada e o gel foi lavado diversas vezes com água destilada.

Para identificação das proteínas recorreu-se ao método *Western-Blot*, utilizando o sistema iBlot[®] Dry Blotting (Invitrogen) com os produtos para este sistema, do mesmo fabricante. A transferência para a membrana de nitrocelulose efetuou-se a uma diferença de

potencial de 20 V durante 2 min, aumentada para 23 V nos 2 min seguintes e mantida a 25 V por mais 3 min.

Para o processo de bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* em reagente de bloqueio *Western* (10x) (Roche, Alemanha) diluído em água destilada numa proporção de 1:10 em seguida substituiu-se por tampão 25mM Tris, pH8, durante 15 min. Dado o tempo de incubação, removeu-se do tampão e a membrana foi incubada durante 10 min em 20 mL de solução de bloqueio contendo 15µL Anti-His (C-Terminal) / Fosfatase Alcalina conjugada (proveniente de rato, fornecido pela Invitrogen). Após incubação a membrana foi lavada 3 vezes com tampão 25 mM Tris, pH8.

Para a deteção das bandas proteicas, a membrana foi pré-incubada durante 10 min em tampão de NBT/BCIP (0,1 M Tris; 0,1 M NaCl; 0,005 M MgCl₃), pH 9,5. Em seguida substituído por uma solução 1:50 de NBT/BCIP (Roche, Alemanha) no mesmo tampão.

Com o aparecimento de bandas interrompeu-se a reação descartando a solução do substrato da fosfatase alcalina e lavando a membrana com água destilada.

2.2.3 Síntese de biosílica

2.2.3.1 Renaturação das enzimas

Tendo a purificação ocorrido em condições de desnaturação, as enzimas foram renaturadas para posterior uso. Para tal utilizaram-se membranas de diálise com uma faixa de corte de peso molecular (MWCO) de 4-6 kDa (ZelluTrans/Roth Dialysis Membranes T1 da Carl Roth). Para que fosse possível manusear a membrana, esta foi incubada durante aproximadamente 30 min em tampão de renaturação (0,7 M L-Arginina; 0,1% CHAPS; 1 mM Glutathione oxidada; 10 mM Glutathione reduzida), pH 8, até atingir uma textura suave. Em seguida abriu-se a membrana de modo a formar um reservatório limitado por clips onde se adicionou 15 mL do eluato 2. A membrana contendo o eluato 2 foi incubada durante 48 h a 4°C sob agitação numa proveta contendo 500 mL de tampão de renaturação. Após incubação, o tampão foi substituído por 500 mL de tampão 25 mM Tris, pH 8, e a membrana foi

novamente incubada durante 24 h, a 4°C sob agitação (MH 15 Rotilabo® da Carl Roth, Alemanha).

2.2.3.2 Imobilização das proteínas nas nanofibras de PCL

I. Imobilização de Glu-tag silicateína α

a) Imobilização *overnight*

Neste procedimento de imobilização proteica utilizaram-se nanofibras de PCL e nanofibras de PCL que passaram por aminólise (PCL-NH₂). Estas foram incubadas *overnight* a 4°C em 400 μ L de solução contendo a enzima. Como controlo incubaram-se, nas mesmas condições, nanofibras PCL e PCL-NH₂ em 400 μ L de água destilada.

Após incubação, efetuou-se um ensaio de coloração por anticorpo. Para tal lavaram-se as nanofibras duas vezes com 1 mL de tampão 25 mM Tris, pH 8, ficando em agitação durante 10 min entre cada lavagem. Depois da lavagem, as nanofibras foram pré-incubadas durante 1 h e 30 min a 4°C em 1 mL de solução de bloqueio. De seguida adicionou-se 1 μ L do primeiro anticorpo Anti-His (C-terminal) (proveniente de rato, fornecido pela Invitrogen), onde as nanofibras foram incubadas *overnight* a 4°C. Após incubação, a solução foi substituída por 1 mL da solução de bloqueio contendo 1 μ L do segundo anticorpo, Anti-Rato Cy3 (proveniente de burro, fornecido pela Dianova), onde as nanofibras ficaram a incubar durante 1 h a 4°C. Antes de serem observadas no microscópio, as nanofibras foram lavadas duas vezes com 200 μ L de tampão 25 mM Tris, pH 8. As nanofibras foram analisadas com um microscópio digital invertido de fluorescência EVOS XL (AMG, Alemanha) por emissão de fluorescência do 2º anticorpo a um comprimento de onda de 570 nm.

b) Imobilização durante 3 dias

Neste procedimento de imobilização, utilizou-se nanofibras de PCL-NH₂ que foram incubadas *overnight* a 4°C em 1 mL de solução contendo Glu-tag silicateína- α . Como controlo as nanofibras de PCL-NH₂ foram incubadas nas mesmas condições em 1 mL de água destilada. Após incubação, a solução contendo a enzima foi renovada e a amostra de controlo manteve-se sem alteração. As nanofibras de PCL-NH₂ foram incubadas nas mesmas condições, e este procedimento foi repetido mais uma vez.

Para avaliar esta metodologia foi realizado um ensaio de coloração por anticorpo. O procedimento utilizado foi o mesmo para a imobilização *overnight*.

II. Imobilização de Cys-tag silicateína α

a) *Sputter coating*

Com o objetivo de obter uma melhor imobilização da enzima nas nanofibras de PCL, estas passaram por um processo de revestimento por pulverização catódica ou *sputter coating*. Na realização deste procedimento, as nanofibras de PCL foram revestidas por uma fina camada de ouro (7-8 nm de espessura) através do sistema de pulverização MED 020 (BAL-TEC®).

b) Imobilização *overnight*

Neste procedimento as amostras foram colocadas em *pins* de MEV, para a imobilização da enzima e posterior análise. Para tal, as amostras foram lavadas duas vezes com água destilada e colocadas a secar à temperatura ambiente. Em seguida as nanofibras foram incubadas durante 1 h a 4°C em 1 mL de solução contendo Cys-tag silicateína- α . Após incubação a solução foi renovada e incubada nas mesmas condições. Este procedimento foi repetido ao longo do dia, sendo a ultima incubação *overnight*.

Para determinar a eficiência da imobilização da Cys-tag silicateína α , foi realizado um ensaio de coloração por anticorpo. O procedimento utilizado foi o mesmo das colorações realizadas com a Glu-tag silicateína- α com exceção do segundo anticorpo utilizado. Para esta

imobilização utilizou-se o Anti-Rato Cy2 (proveniente de burro, fornecido pela Dianova) analisado com um microscópio digital invertido de fluorescência EVOS XL (AMG, Alemanha) por emissão de fluorescência do 2º anticorpo a um comprimento de onda de 540 nm.

2.2.3.3 Síntese de biosílica

a) Solução de TEOS hidrolisado

Sendo o TEOS um composto hidrofóbico foi necessário proceder à sua pré-hidrólise, antes de utilizá-lo como substrato da Cys-tag silicateína- α . Para tal, 5 mL de água destilada, 25 μ L de 2 M HCl e 12 μ L de 4,48 M TEOS foram adicionados a um tubo Falcon. A solução foi mantida em agitação durante 30 min com o intuito de favorecer a reação de hidrólise. Por fim, de modo a neutralizar os átomos de cloro (Cl), foram adicionados 25 μ L de 2 M NaOH, obtendo-se uma solução de 10 mM TEOS hidrolisado com pH neutro.

b) Formação de biosílica

Neste procedimento, foram adicionados às nanofibras de PCL 100 μ L de uma solução de 10 mM TEOS diluído em água destilada (até à concentração final de 250 μ M TEOS) durante 7 dias, com intervalos de 24 h entre cada adição. Após incubação com o substrato, as nanofibras de PCL foram lavadas com água destilada e de seguida foram secas à temperatura ambiente para posterior análise de MEV/EDX.

3. Resultados e Discussão

3.1 Produção de nanofibras de PCL

O método *eletrospinning* é considerado o mais barato e simples na produção de nanofibras [42]. As nanofibras obtidas neste procedimento têm uma estrutura de malha fibrosa na escala nano e com diâmetros na ordem dos micrómetros.

Para a produção das nanofibras foi escolhido o polímero PCL por ter a vantagem de não formar isômeros e mantém inalterado o seu ponto de fusão. Este polímero é biodegradável em ambientes bióticos como o solo, a água do mar ou lamas ativas e pode ser utilizado para aplicações biomédicas [42].

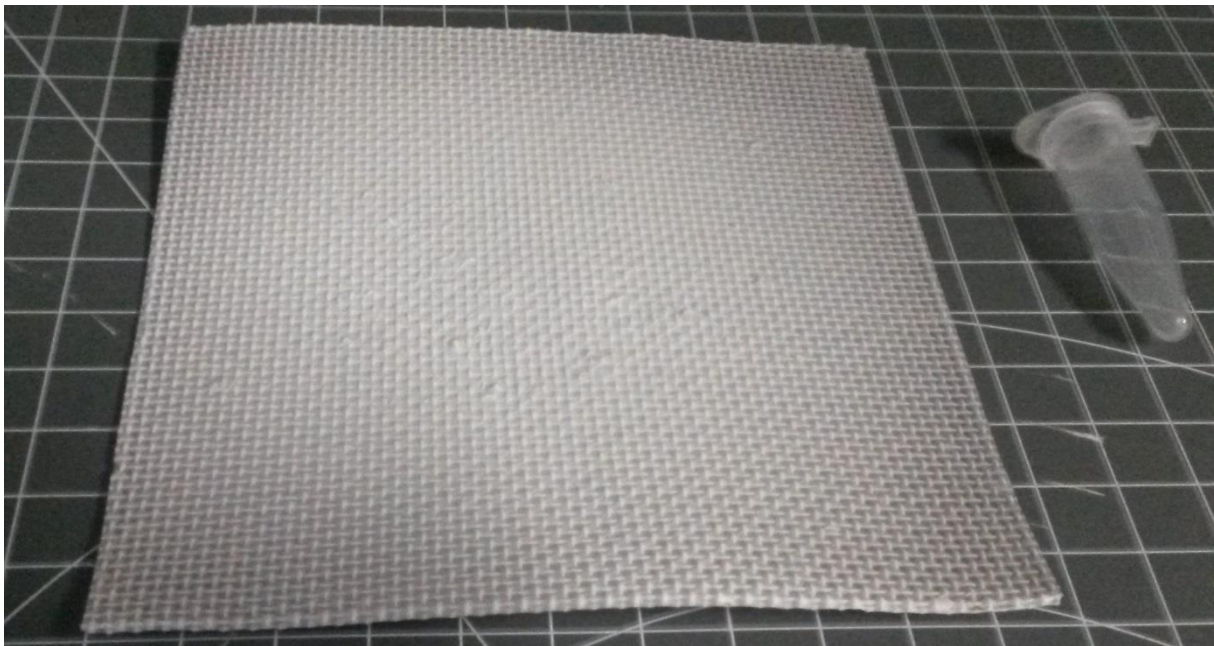


Figura 3.1- Aspeto macroscópico da nanofibra de PCL no coletor (rede metálica), após o processo de *eletrospinning*.

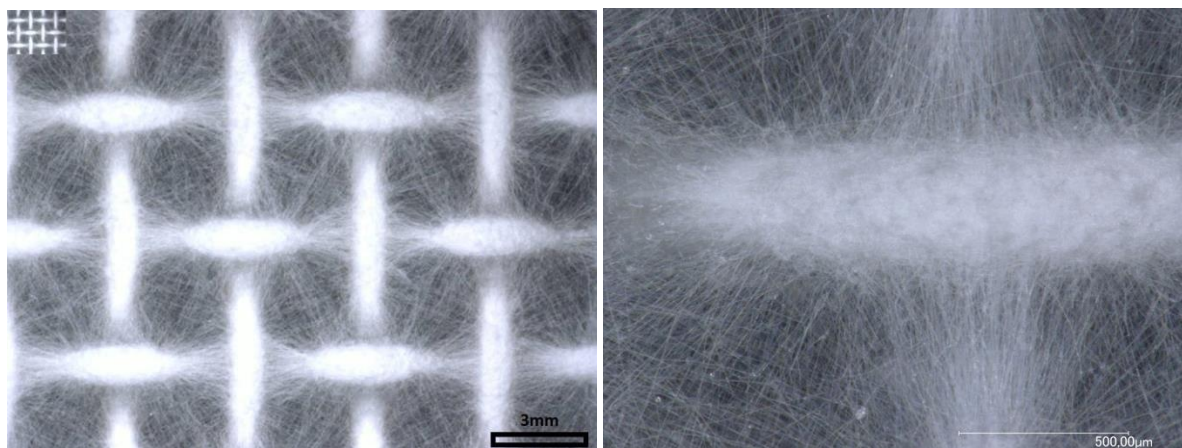


Figura 3.2- Detalhe da malha fibrosa que constitui a nanofibra de PCL ainda no coletor, ampliada no microscópio digital VHX-1000 da Keyence®.

Após a produção das nanofibras, estas foram submetidas a aminólise foi efetuada com os reagentes isopropanol e etilenodiamina, com o objetivo de imobilizar um grupo amina ($R-NH_2$) na malha fibrosa das nanofibras de PCL.

Dado existirem grupos éster ($R-COO-R$) em abundância, nas moléculas de PCL, é possível imobilizar grupos amina nas nanofibras através da aminólise com diamina. Quando um grupo amina reage com o éster para formar uma ligação covalente (CONH) o outro grupo amina não reage, como é mostrado na Figura 3.3, ficando livre para se ligar a outro grupo éster [71].

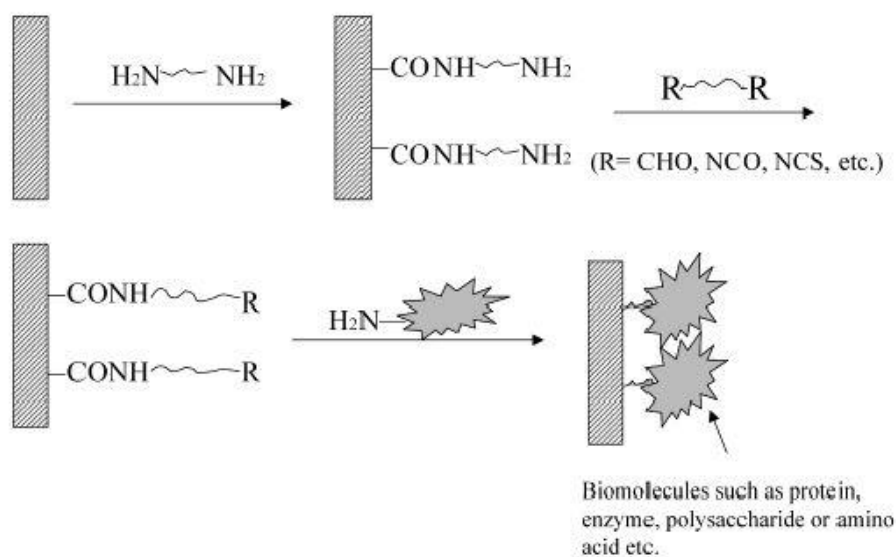


Figura 3.3- Representação esquemática da reação de aminólise nas fibras de PCL. A barra cinzenta ao alto representa a fibra de PCL (Adaptado de [71]).

Com o intuito de determinar a eficiência da aminólise nas nanofibras foi realizada uma análise de FTIR.

A análise foi efetuada no espectrofotômetro FT-IR Spectromete Varian 660-IR, onde se obtiveram os espectros, referentes as membranas de PCL (Espectro **B**) e PCL-NH₂ (Espectro **A**) (Figura 3.4).

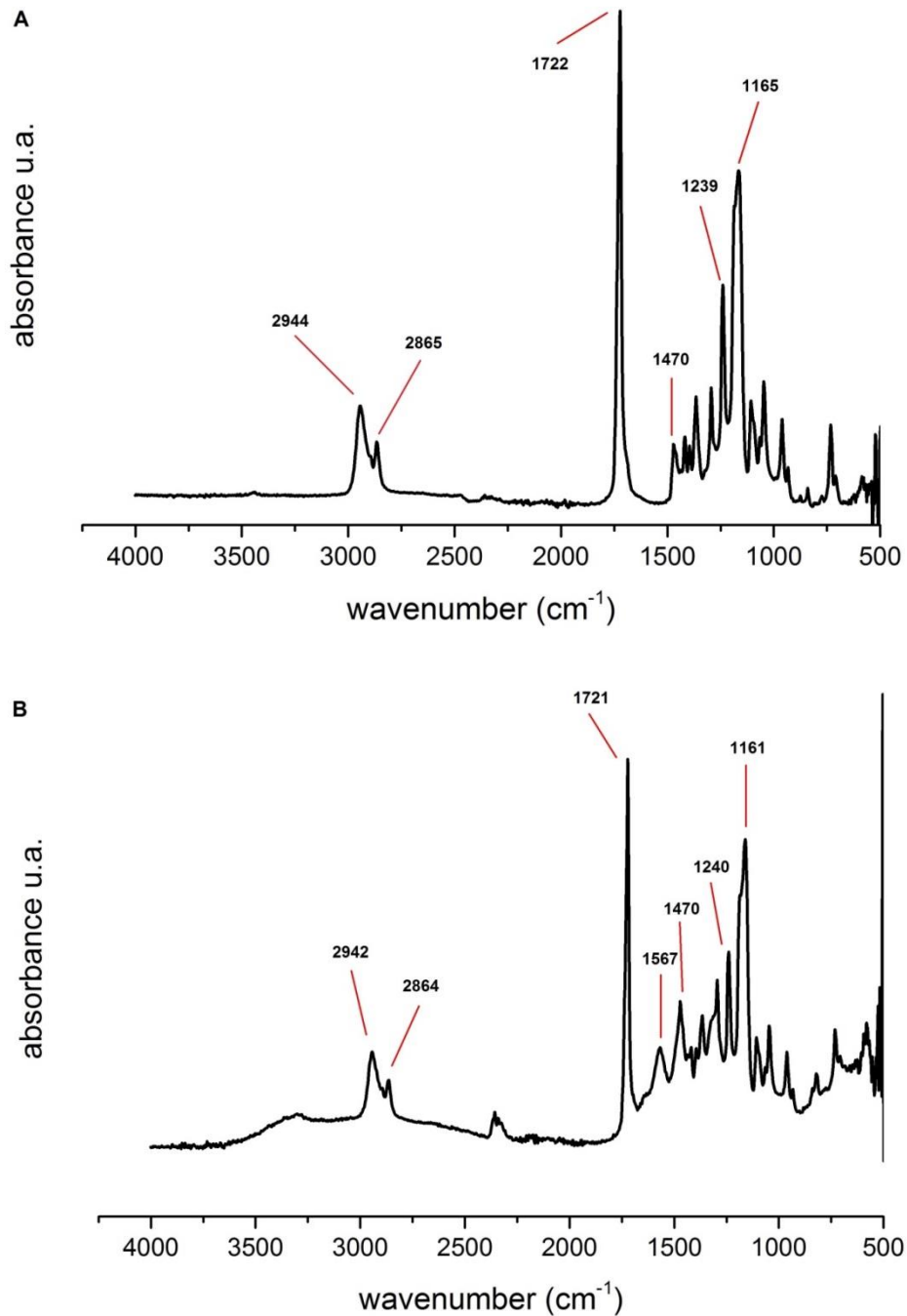


Figura 3.4- Espectro obtido por análise de FTIR às nanofibras de PCL. (A) espectro referente ao controle das fibras não submetidas a aminólise e (B) espectro corresponde à nanofibra de PCL submetida a aminólise, com uma banda em 1567 cm⁻¹ correspondente à vibração de alongamento do grupo amina.

Analisando os espectros obtidos (A) e (B) da Figura 3.4, é possível observar duas bandas entre os números de onda 2800-3000 cm^{-1} que correspondem à vibração do alongamento da ligação carbono-hidrogênio (C-H) resultantes dos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ presentes na molécula de PCL [72]. Em relação á banda com maior valor de absorvância e com um número de onda de 1722 cm^{-1} em (A) e de 1721 cm^{-1} em (B), correspondem ambos, à vibração do alongamento da ligação dupla de carbono-oxigênio (C=O), também presente na molécula de PCL [73]. Em (B), a banda com número de onda 1567 cm^{-1} corresponde à vibração do alongamento do grupo amina [74], confirmando assim o sucesso da aminólise na membrana de PCL.

3.2 Expressão e purificação das enzimas

As enzimas expressas por fermentação, em células de *E. coli*, foram purificadas através de uma cromatografia de afinidade com metais (IMAC) de acordo com manual da QIAGEN®. Utilizando o protocolo de purificação em condições de desnaturação, devido à insolubilidade das enzimas que se encontram em corpos de inclusão.

3.2.1 Quantificação das enzimas

A quantificação das enzimas purificadas, pelo método de *Bradford* apresentou um valor de 203 $\mu\text{g/mL}$ para a enzima Glu-tag silicateína- α e uma concentração menor, de 73 $\mu\text{g/mL}$ para a Cys-tag silicateína- α .

3.2.2 Identificação das enzimas purificadas

Com o objetivo de avaliar o nível de purificação e identificar as enzimas de interesse, recorreu-se à eletroforese por SDS-PAGE das frações de eluato 1 e eluato 2 (Figura 3.5).

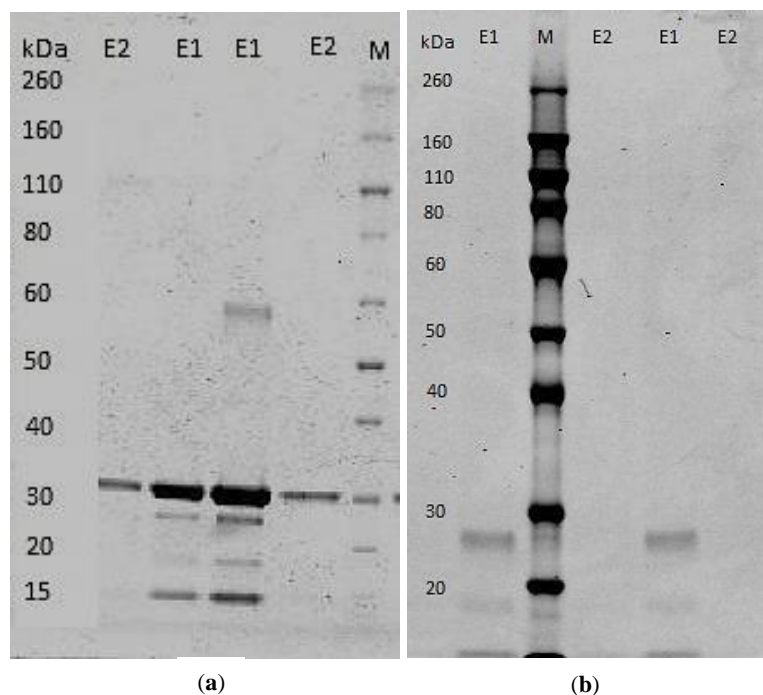


Figura 3.5- Géis de poliacrilamida referentes à purificação das enzimas **(a)** Glu-tag silicateína- α , e **(b)** Cys-tag silicateína- α . **M** representa o marcador em kDa, **E1** e **E2** são referentes às frações eluato 1 e eluato 2.

Analisando o gel **(a)**, e tendo como referência a banda de 30 kDa do marcador (**M**), confirma-se que a banda que se destaca, tanto em **E1** como em **E2**, corresponde à enzima Glu-tag silicateína- α , que possui um peso molecular de 29 kDa [27]. A existência de uma banda imediatamente abaixo dos 60 kDa (em **E1**) pode dever-se à presença de dímeros da enzima, dado corresponder esta banda o dobro do peso molecular da enzima. Embora o *loading buffer* utilizado tenha na sua constituição β -mercaptoetanol, que evita a formação de dímeros o fator que possa ter levado à presença dos mesmos no gel **(a)** pode estar relacionado com a preparação das amostras que não foram aquecidas antes de serem corridas. Relativamente às bandas entre os 20 kDa e 15 kDa, é possível que correspondam à degradação da enzima durante o processo de extração e desnaturação durante a purificação. Verifica-se também a eficácia do IMAC no processo de purificação, dado que a fração eluato 2 contém apenas uma banda e que esta corresponden à enzima de interesse.

Em relação ao gel **(b)**, as bandas obtidas são menos nítidas em relação ao gel **(a)** o que leva a concluir que houve baixa expressão da enzima de interesse. Analisando as bandas obtidas na fração eluato 1, é possível observar uma banda abaixo dos 30 kDa, que permite identificar a enzima de interesse Cys-tag silicateína- α com 27 kDa. Também é possível verificar duas bandas entre os 20 kDa e 15 kDa, que tal como na purificação da Glu-tag

silicateína- α , podem dever-se à ação proteásica como mecanismo de defesa, da própria célula.

Com o intuito de avaliar a especificidade das enzimas recorreu-se ao método de *Western-Blot*. Para tal foi utilizado o anticorpo Anti-His (C-terminal) conjugado com fosfatase alcalina, para identificação das enzimas de interesse pelo tag 6xHis no carbono terminal (Figura 3.6).

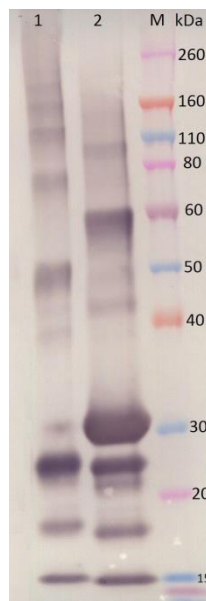


Figura 3.6- Caracterização das enzimas Cys-tag silicateína- α (1) e Glu-tag silicateína- α (2) analisadas por *Western-Blot*. (M) marcador em kDa.

Analisando o método de reconhecimento das enzimas de interesse, é possível avaliar a especificidade das mesmas com o anticorpo utilizado. Tendo como referência a banda de 30 kDa do marcador (M), na linha 1, verifica-se uma banda intensa que corresponde à enzima Cys-tag silicateína- α . No entanto, são visíveis mais bandas entre os 20 kDa e 15 kDa, que correspondem a uma degradação proteica que possa ter ocorrido durante a expressão e desnaturação, durante a purificação. Na linha 2, é visível uma banda bastante intensa de 30 kDa, tendo como base o marcador, que corresponde à enzima Glu-tag silicateína- α . Contudo, e assim como foi mencionado no gel (a), é visível uma banda de 60 kDa e também mais bandas entre 20 kDa e 15 kDa que podem corresponder a dímeros e resíduos da enzima, respetivamente, sendo que estas bandas são também específicas para o anticorpo utilizado. Verifica-se igualmente, no topo da membrana, resíduos escuros que possivelmente correspondem a um arrastamento devido à longa exposição da membrana com o substrato

NBT/BCIP, resultando em ligações não-específicas, visto que nos géis de purificação não existem quaisquer resíduos proteicos entre 260 kDa e 50 kDa. Embora sejam visíveis o aparecimento de ligações não específicas do anticorpo, é possível afirmar que o reconhecimento das enzimas foi específico, em especial para a Glu-tag silicateína- α que apresenta uma banda bastante intensa.

3.3 Síntese de biosilica

3.3.1 Imobilização das enzimas nas nanofibras de PCL

I. Imobilização da Glu-tag silicateína- α

a) Imobilização overnight

Para imobilizar a enzima nas nanofibras de PCL foi delineada uma metodologia, na qual, devido ao seu caráter hidrofóbico, a membrana foi submersa e incubada *overnight* em 400 μ L de solução contendo 203 μ g/mL de Glu-tag silicateína- α . O resultado desta imobilização foi determinado através de coloração por anticorpo (Figura 3.7).

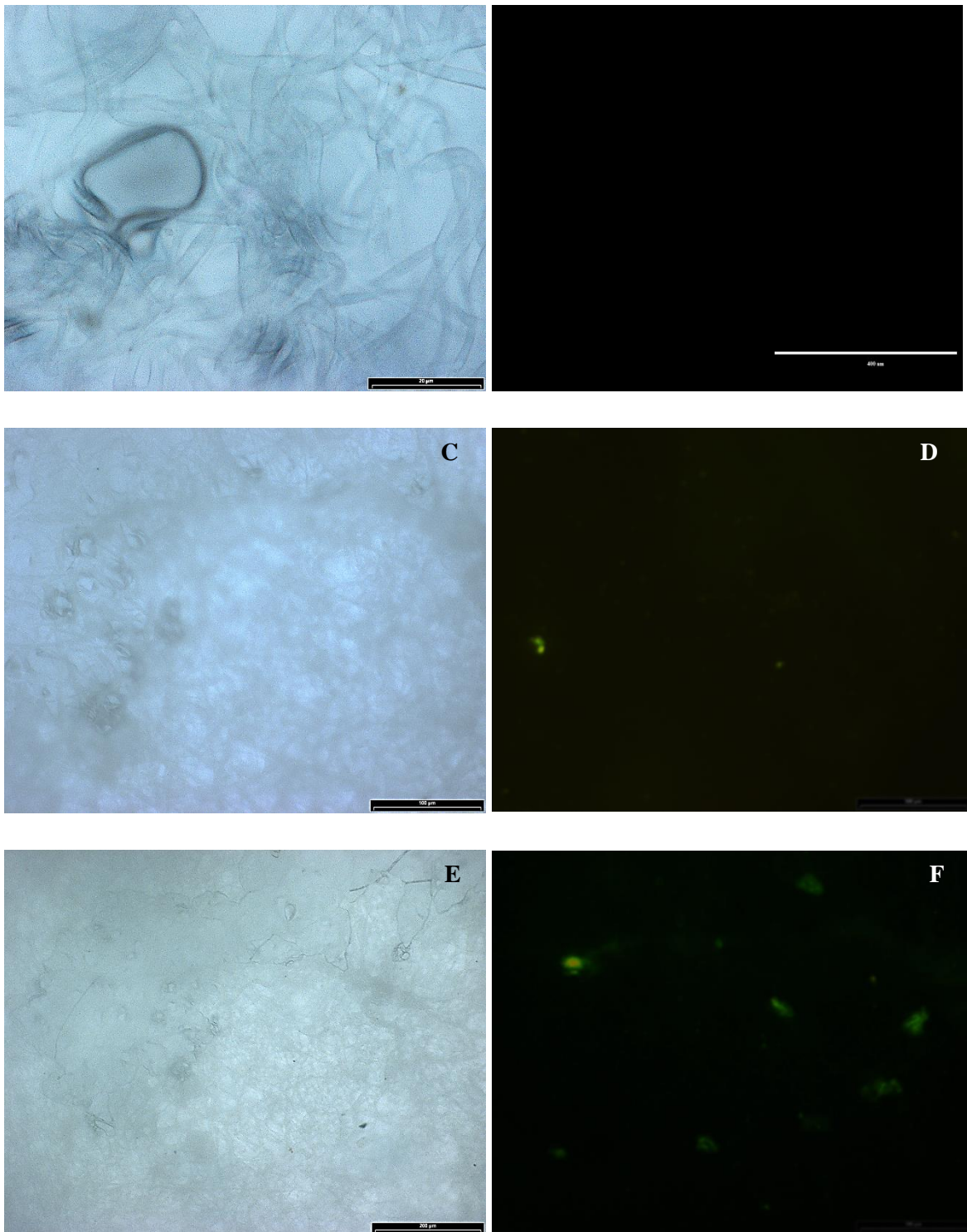


Figura 3.7- Imobilização da Glu-tag silicateína- α em nanofibras de PCL analisado por coloração por anticorpo. **(A)** é o controle da imagem microscópica da nanofibra de PCL; **(B)** o mesmo campo fotografado sob luz UV. Neste ensaio, a enzima foi imobilizada em nanofibras de PCL e PCL-NH₂, por conseguinte, temos uma imagem microscópica **(C)** das nanofibras de PCL com Glu-tag silicateína- α ; **(D)** o mesmo campo fotografado sob luz UV; **(E)** a imagem microscópica da nanofibra PCL-NH₂ com Glu-tag silicateína- α e **(F)** o mesmo campo fotografado sob luz UV.

Um dos objetivos deste ensaio, foi avaliar que tipo de nanofibra (PCL ou PCL-NH₂) oferecia maior eficiência na imobilização da Glu-tag silicateína- α . A imagem **(B)**, referente ao

controle, mostra que não há qualquer composto fluorescente constituinte das nanofibras de PCL e PCL-NH₂, como era esperado. A imobilização *overnight* da Glu-tag silicateína- α na nanofibra de PCL (**D**) mostra ser muito pouco eficiente, o que era igualmente esperado dado ao caráter hidrofóbico das nanofibras. Numa observação mais atenta da imagem (**D**) é possível observar pequenas fontes de fluorescência, que pensamos corresponder a uma imobilização muito reduzida da enzima na malha fibrosa da nanofibra. Dado que a malha fibrosa, pela qual as nanofibras são constituídas, tem diâmetros na ordem dos micrómetros é muito provável que tenha havido imobilização da enzima em fibras do interior da membrana e não só na sua superfície. No entanto, em ambos os casos a imobilização foi bastante ineficiente.

Relativamente à imobilização da enzima na nanofibra de PCL-NH₂ (**F**), verifica-se uma imobilização mais razoável comparativamente com a imagem (**D**). Dada a constituição das nanofibras não é possível focar as diferentes camadas da malha fibrosa simultaneamente. No entanto a imobilização apresenta-se claramente ineficiente e pouco satisfatória para prosseguimentos dos estudos.

b) Imobilização durante 3 dias

Com vista a melhorar os resultados anteriores, foi delineada uma metodologia na qual apenas as nanofibras de PCL-NH₂ foram incubadas durante 3 dias, com 1 mL de solução contendo a Glu-tag silicateína- α . Para determinar a eficiência da imobilização, foram realizados ensaios de coloração por anticorpo (Figura 3.8).

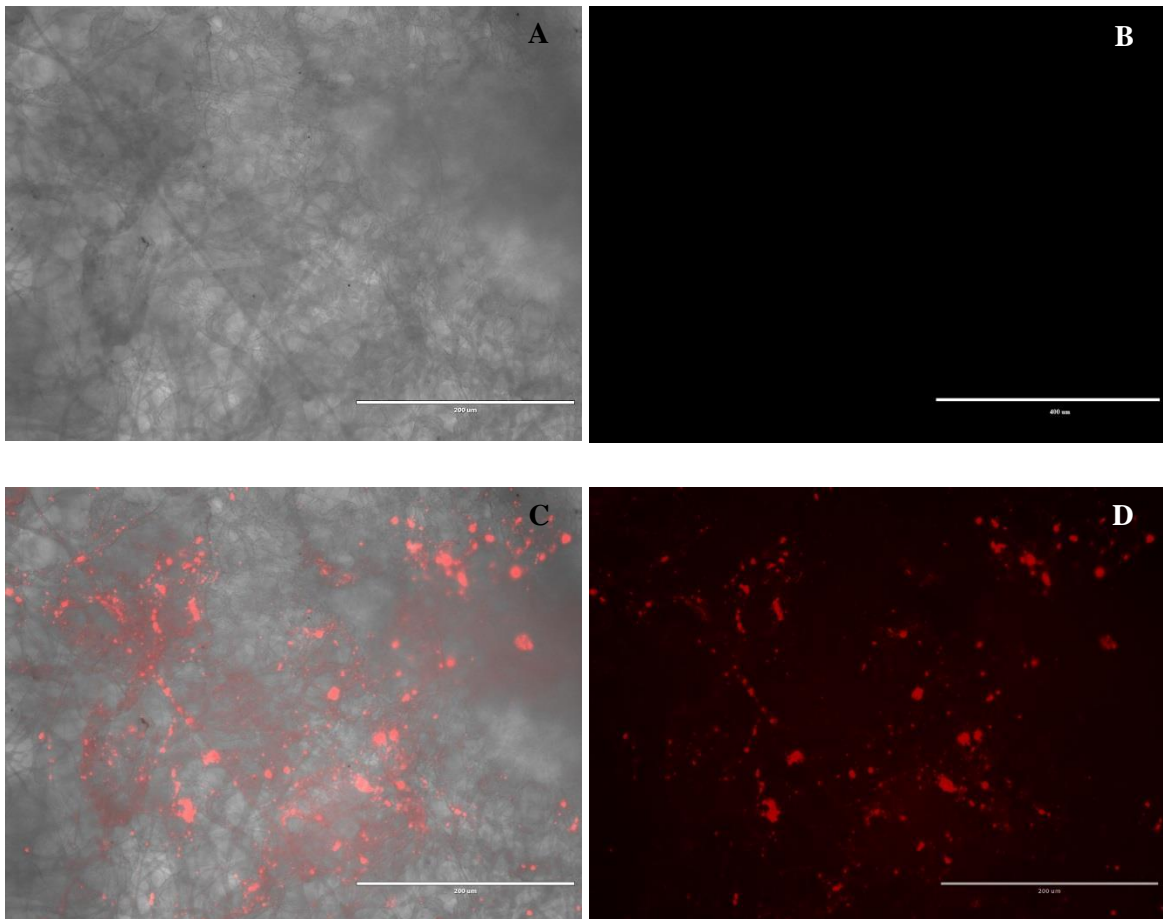


Figura 3.8- Imobilização da Glu-tag silicateína- α em nanofibras de PCL-NH₂, analisado por coloração por anticorpo. (A) é o controle da imagem microscópica da fibra de PCL-NH₂; (B) o mesmo campo fotografado sob luz UV; (C) nanofibra de PCL-NH₂ com Glu-tag silicateína- α em sobreposição da imagem sob luz UV (D) o mesmo campo fotografado sob luz UV.

Apesar deste procedimento resultar em maior eficiência na imobilização da Glu-tag silicateína- α , Fig. 3.8 (D), a necessidade de imobilização ainda mais eficiente da enzima levou a que fosse delineada uma metodologia.

II. Imobilização da Cys-tag silicateína- α

a) Sputter coating

De acordo com o autor Love *et al* (2005) [67] a elevada afinidade do grupo tiol (R-SH) na superfície de metais nobres, tais como o ouro, a prata, o paládio, a platina e o mercúrio,

permite gerar superfícies orgânicas bem definidas e funcionais na interface exposta. Desta forma, com base nos estudos de Wiens *et al* (2012) [75], foi delineada uma nova metodologia, na qual foi testada a imobilização da enzima Cys-tag silicateína- α , possuindo grupos tiol num tag 8xCys, em nanofibras revestidas com uma nano camada de ouro (Figura 3.9).

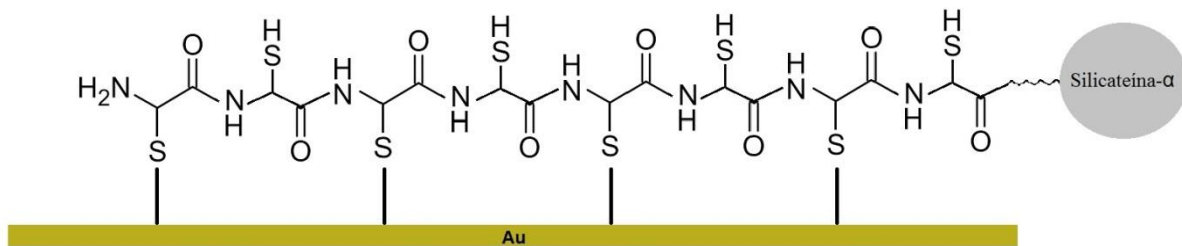


Figura 3.9- Representação esquemática da imobilização dos grupos tiol da Cys-tag silicateína- α na camada de ouro que cobre a nanofibra de PCL.

Para cobrir as membranas com uma fina camada de ouro recorreu-se ao *sputter coating*.

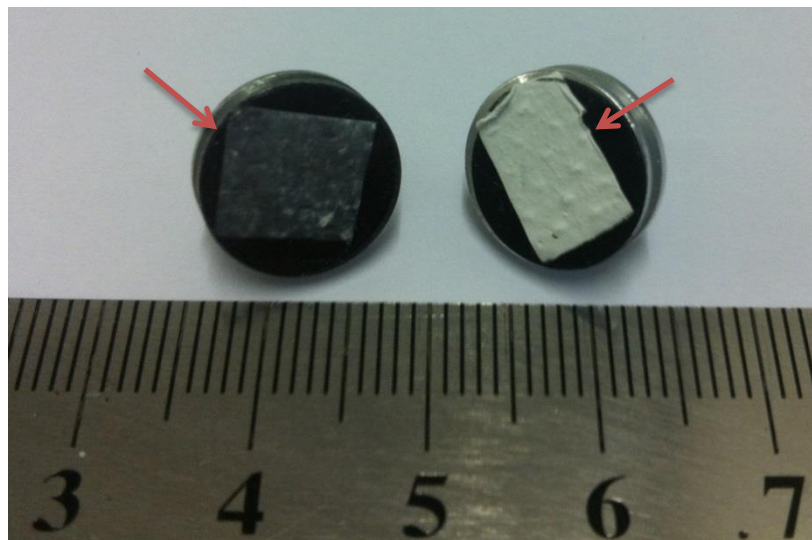


Figura 3.10- Nanofibras de PCL fixas na base de grafite dos *pins* de MEV. A nanofibra da direita apresenta uma camada fina de ouro, efetuada por *sputter coating*, e a nanofibra da esquerda representa o controlo.

Por observação da Figura 3.10 é possível determinar o sucesso do processo de revestimento por pulverização catódica com ouro na fibra de PCL.

b) Imobilização overnight

Nesta metodologia de imobilização, as nanofibras de PCL revestidas a ouro foram incubadas *overnight* com 1mL de solução contendo a Cys-tag silicateína- α . A eficiência desta imobilização foi determinada por ensaios de coloração por anticorpo (Figura 3.11).

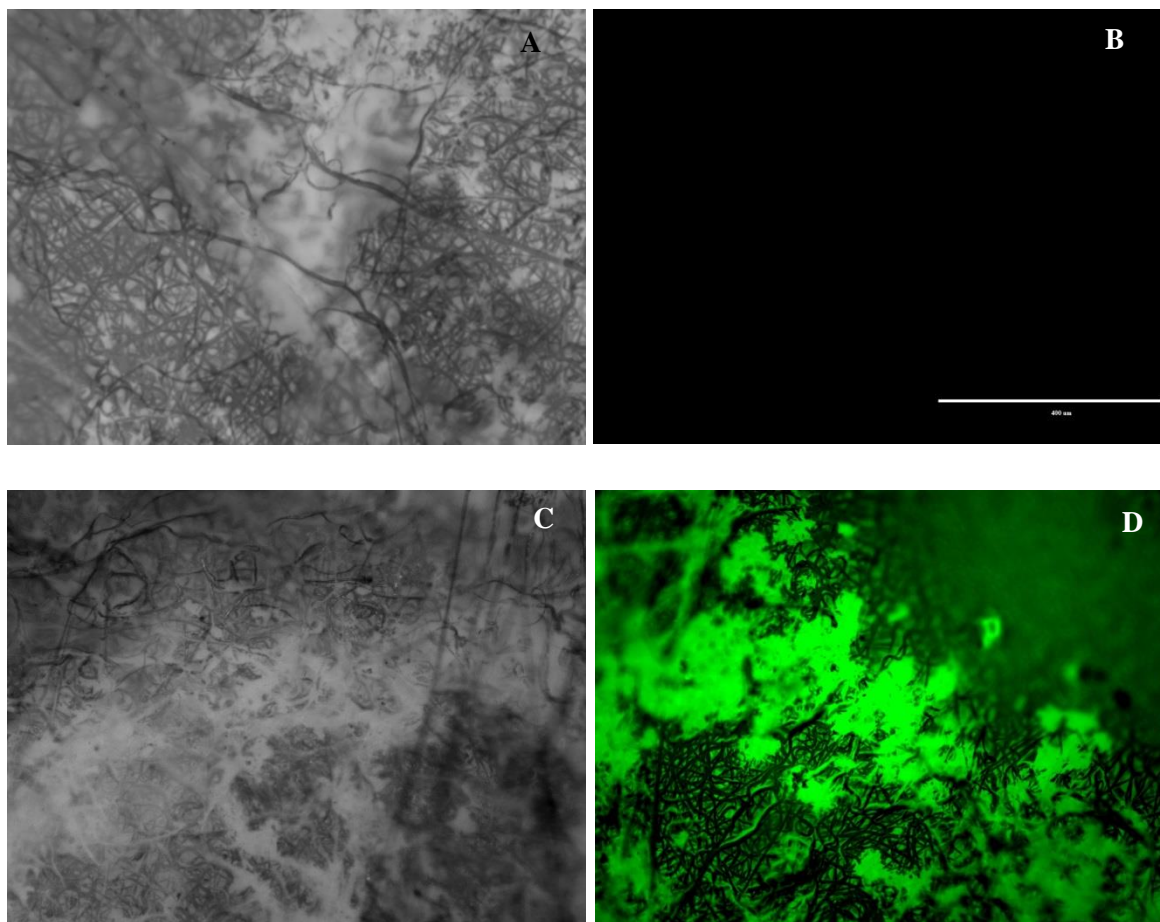


Figura 3.11- Imobilização da Cys-tag silicateína- α em fibras de PCL analisado por coloração por anticorpo. (A) é o controlo da imagem microscópica da fibra de PCL; (B) o mesmo campo fotografado sob luz UV; (C) nanofibra de PCL revestida a ouro com Cys-tag silicateína- α ; (D) o mesmo campo fotografado sob luz UV.

Analisando o ensaio de coloração por anticorpo, e tendo como base a imagem controlo (B), é possível confirmar o sucesso da imobilização da Cys-tag silicateína- α na camada de ouro das nanofibras de PCL (D). Numa observação mais atenta à imagem (D) é possível observar zonas que não foram imobilizadas com a enzima, isto pode dever-se a áreas que não foram completamente pulverizadas durante o sputter coating. Perante este resultado bastante satisfatório, o estudo prosseguiu, utilizando as fibras com Cys-tag silicateína- α imobilizada na camada de ouro.

3.3.2 Síntese de biosilica

O ácido ortossilícico ou TEOS (ortocsilicato de tetraetilo) tem sido usado como substrato/ precursor da reação enzimática de síntese de biosilica em sistemas *in vitro* [51]. Sendo este composto hidrofóbico, antes de ser adicionado às amostras, é efetuada uma pré-hidrólise para que possa ser absorvido pelas nanofibras de PCL.

Após a imobilização da Cys-tag silicateína- α na camada de ouro das nanofibras de PCL, estas foram incubadas com a solução de TEOS pré-hidrolisado, e analisadas por MEV-EDX (Figura 3.12).

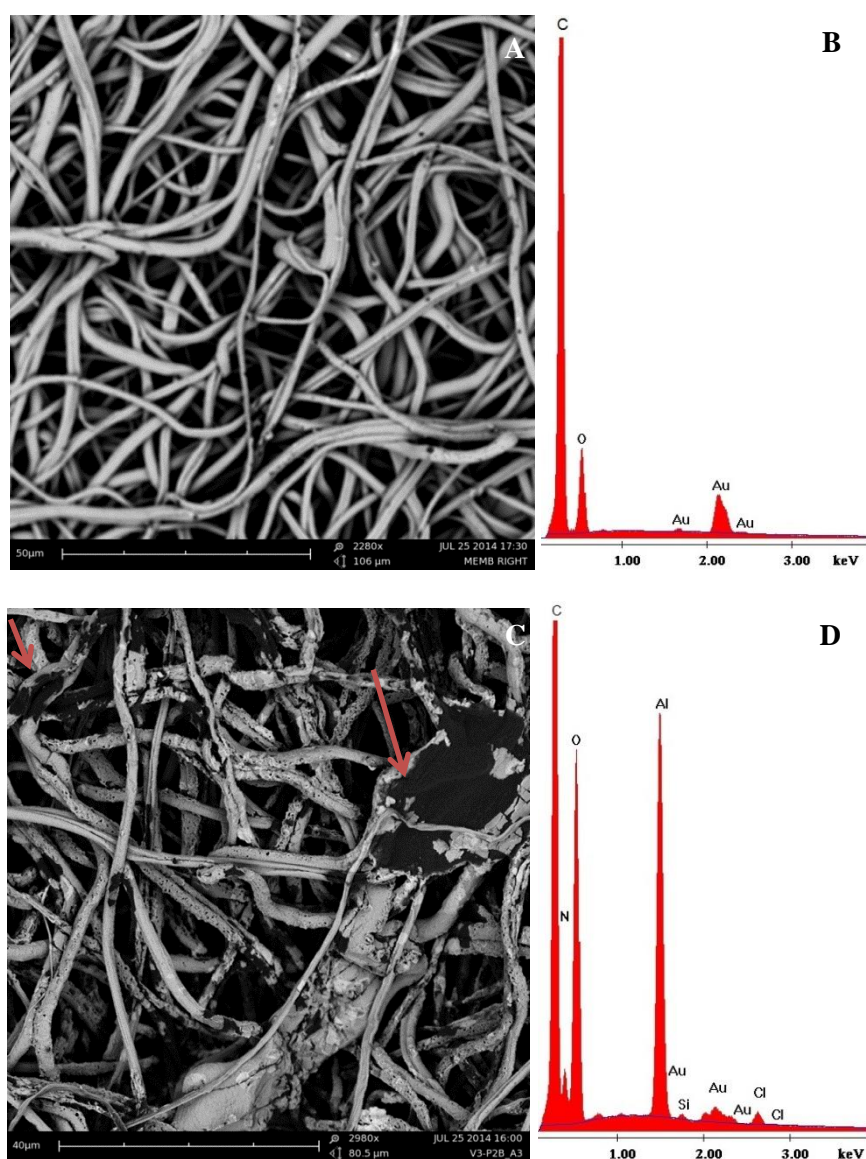


Figura 3.12- Análise por MEV-EDX, das nanofibras de PCL imobilizadas com Cys-tag silicateína- α e incubadas com solução de TEOS pré-hidrolisado, com fim a identificar a síntese de biosilica. (A), é o controlo; (B) a análise por EDX; (C) da nanofibra de PCL com Cys-tag silicateína- α imobilizada na camada de ouro e incubada com TEOS ; (D) análise por EDX.

A análise por MEV permitiu observar a estrutura fibrosa da membrana revestida a ouro, Fig.13 (A). Relativamente à análise por EDX, Fig.13 (B), foram identificados espectros com as bandas **C** e **O**, referentes aos átomos de carbono e de oxigénio respetivamente, que concernem à molécula de PCL, constituinte das fibras. Verifica-se também uma banda referente ao átomo de ouro, **Au**, que provém evidentemente da camada de ouro que reveste as fibras.

Na Fig. 13 (C), a imagem obtida por MEV das fibras de PCL, apresentam uma superfície bastante diferente da Fig. 13 (A) que se deve à imobilização da enzima e posterior síntese de biosílica. A síntese de biosílica pode ser confirmada na Fig. 13 (D), com a banda **Si** que corresponde ao átomo de silício, composto principal da biosilica. Foram também identificadas uma banda **N**, referente ao átomo de azoto proveniente da enzima, e duas bandas de cloro, **Cl**, que se deve à molécula NaCl presente na solução de TEOS pré-hidrolisado.

Por último, uma das bandas que se destaca é referente ao átomo de alumínio, **Al**, a presença deste composto deve-se à composição dos *pins* de MEV, onde as nanofibras foram fixadas. A presença de alumínio não se evidenciou no espetro do controlo (B), pois com o objetivo de encontrar uma banda referente ao silício foi necessário que o feixe de eletrões do MEV atravessasse várias camadas da malha fibrosa da membrana.

Dado este resultado é possível constatar que o objetivo deste estudo, sintetizar biosílica através da imobilização de Cys-tag silicateína- α em nanofibras de PCL, foi alcançado com sucesso.

4. Conclusões

Para a síntese de biosílica, a partir da imobilização da Cys-tag silicateína- α , em fibras de policaprolactona realizou- um amplo estudo em torno tanto da técnica de *electrospinning*, como do procedimento de incubação com a proteína. Na realização deste trabalho foi necessário ter em conta diversos fatores, tais como o polímero a ser utilizado para construir a nanofibra, e o material condutor mais adequado para ser usado no *sputter coating*.

Sendo o objetivo principal deste estudo, a síntese de biosílica em fibras produzidas por *electrospinning* a partir da enzima recombinante silicateína- α , as metodologias empregues na imobilização da enzima Glu-tag silicateína- α nas fibras de PCL não foram bem-sucedidas, como é comprovado pelas análises por coloração de anticorpo. Embora a aminólise efetuada nas fibras tenha como objetivo favorecer a imobilização da enzima, esta não teve resultados tão eficientes, apesar das análises por FTIR terem confirmado a fixação do grupo amina. Um dos obstáculos para a imobilização esta relacionada com o caráter hidrofóbico das fibras, prejudicando a imobilização da proteína.

Utilizando uma abordagem com base na afinidade do grupo tiol presente na enzima recombinante, Cys-tag silicateína- α , pelo ouro, recorreu-se ao *sputter coating*. Esta técnica permitiu um criar revestimento de ouro nas fibras, favorecendo a imobilização da Cys-tag silicateína- α , comprovada pela coloração de anticorpo.

Após imobilização, a síntese de biosílica foi realizada através da incubação das fibras com o substrato TEOS. Os resultados obtidos foram comprovados pela análise feita por MEV/EDX confirmando que a enzima imobilizada manteve a capacidade catalítica.

5. Perspetivas Futuras

Como perspetivas futuras e de forma a dar continuidade a este estudo, o próximo passo seria cultivar a linha de células SaOS-2 sob as fibras. Este ensaio teria como objetivo estudar se o revestimento de biossílica nas fibras de PCL poderia fornecer uma superfície estável e morfogeneticamente ativa, para que este possa ser utilizado como *scaffold* na área de engenharia de tecido ósseo. Também seria importante estudar o efeito citotóxico do ouro nas células.

Poderá ser realizado também um estudo paralelo de otimização da imobilização da enzima recombinante silicateína- α nas fibras de PCL em conjunto com outras enzimas, visto que existem estudos que comprovam que a utilização da silicateína- α , com a enzima silitaphin-1, aumenta a sua atividade catalítica.

A importância deste estudo seria conseguir imobilizar a enzima diretamente nas fibras a partir das ligações covalentes entre o grupo amina (proveniente da aminólise) com o grupo carboxilo do aminoácido glutamato do tag de afinidade da Glu-tag silicateína- α . Para tal podem ser estudados alguns aspetos como o processo de aminólise, juntamente com as concentrações utilizadas e o tempo de incubação nas fibras, de modo a verificar se as condições de imobilização da enzima melhoram.

Bibliografia

- [1] Soest, R., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., Voogd, N., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M., Hooper, J., Global Diversity of Sponges (Porifera). *PLoS ONE*, 7(4), 2012.
- [2] Sandford, F., Physical and Chemical Analysis of the Siliceous Skeletons in Six Sponges of Two Groups (Demospongiae and Hexactinellida). *Microscopy Research and Technique*, 62:336–355, 2003.
- [3] Uriz, M., Mineral skeletogenesis in sponges. *Can J Zool*, 84:322–356, 2006.
- [4] Wang, X., Schloßmacher, U., Wiens, M., Batel, R., Schröder, H. C., Müller, W. E. G., Silicateins, silicatein interactors and cellular interplay in sponge skeletogenesis: formation of glass fiber-like spicules. *FEBS Journal*, 279:1721-1736, 2012.
- [5] Schröder, H. C., Wang, X., Tremel, W., Ushijima, H., Müller, W. E. G., Biofabrication of biosilica-glass by living organisms. *Natural Product Reports*, 25:455-475, 2008.
- [6] Shimizu, K., Cha, J., Stucky, G., Morse, D.E., Silicatein- α : Cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6234-6238, 1998.
- [7] Müller, W. E. G., Schloßmacher, U., Wang, X., Boreiko, A., Brandt, D., Wolf, S. E., Tremel, W., Schröder, H. C., Poly(silicate)-metabolizing silicatein in siliceous spicules and silicasomes of demosponges comprises dual enzymatic activities (silica polymerase and silica esterase). *FEBS Journal*, 275:362-370, 2008.
- [8] Zhou, Y., Shimizu, K., Cha, J., Stucky, G., Morse, D.E., Efficient Catalysis of Polysiloxane Synthesis by Silicatein a Requires Specific Hydroxy and Imidazole Functionalities. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38:780-782, 1999.
- [9] Shanklin, D.R., Smalley, D.L., The immunopathology of siliconosis: history, clinical presentation, and relation to silicosis and the chemistry of silicon and silicone. *Immunologic Research*, 18:125-173, 1998.
- [10] Wiens, M., Wang, X., Schloßmacher, U., Lieberwirth, I., Glasser, G., Ushijima, H., Schröder, H. C., Müller, W. E. G., Osteogenic Potential of Biosilica on Human Osteoblast-Like (SaOS-2) Cells. *Calcif Tissue Int*, 87(6):513-24, 2010.
- [11] Schröder, H. C., Schloßmacher, U., Boreiko, A., Natalio, F., Baranowska, M., Brandt, D., Wang, X., Tremel, W., Wiens, M., Müller, W. E. G., Silicatein: Nanobiotechnological and Biomedical Applications. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Springer 47:251-273, 2009.
- [12] Cha, J., Shimizu, K., Zhou, Y., Christiansen, S.C., Chmelka, B.F., Stucky, G., Morse, D.E., Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:361-365, 1999.

- [13] Schröder, H. C., Wiens, M., Schloßmacher, U., Brandt, D., Müller, W. E. G., Silicatein-Mediated Polycondensation of Orthosilicic Acid: Modeling of a Catalytic Mechanism Involving Ring Formation. *Silicon*, Springer, 4(1):33-38, 2012.
- [14] Wang, X., Schröder, H. C., Wang, K., Kaandrop, J.A., Müller, W. E. G., Genetic, biological and structural hierarchies during sponge spicule formation: from soft sol-gels to solid 3D silica composite structures. *Soft Matter*, 8:9501-9518, 2012.
- [15] Tahir, M., Théato, P., Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Janshoff, A., Zhang, J., Huth, J., Tremel, W., Monitoring the formation of biosilica catalysed by histidine-tagged silicatein. *Chem Commun (Camb)*, 21: 2848-9, 2004.
- [16] Tahir, M., Théato, P., Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Boreiko, A., Faiß, S., Janshoff, A., Huth, J., Tremel, W., Formation of layered titania and zirconia catalysed by surface-bound silicatein. *Chem Commun (Camb)*, 28: 5533-5, 2005.
- [17] Brutchey, R.L., Yoo, E.S., Morse, D.E., Biocatalytic Synthesis of a Nanostructured and Crystalline Bimetallic Perovskite-like Barium Oxofluorotitanate at Low Temperature. *J Am Chem Soc*, 128:10288-94, 2006.
- [18] Belton, D. J., Patwardhan, S.V., Annenkov, V.V., Danilovtseva, E.N., Perry, C.C., From biosilicification to tailored materials: Optimizing hydrophobic domains and resistance to protonation of polyamines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:5963-8, 2008.
- [19] Foo, C., Patwardhan, S.V., Belton, D. J., Kitchel, B., Anastaslades, D., Huang, J., Nalk, R. R., Perry, C.C., Kaplan, D.L., Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:9428-33, 2006.
- [20] Coradin, T., Livage, J., Effect of some amino acids and peptides on silicic acid polymerization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21:329-336, 2001.
- [21] Bauer, C.A., Robinson, D.B., Simmons, B.A., Silica particle formation in confined environments via bioinspired polyamine catalysis at near-neutral pH. *Small*, 3:58-62, 2007.
- [22] Natalio, F., Mugnaioli, E., Wiens, M., Wang, X., Schröder, H. C., Tahir, M., Tremel, W., Kolb, U., Müller, W. E. G., Silicatein-mediated incorporation of titanium into spicules from the demosponge *Suberites domuncula*. *Cell Tissue Res*, 339:429-436, 2010.
- [23] Schröder, H. C., Boreiko, O., Krasko, A., Reiber, A., Schwertner, H., Müller, W. E. G., Mineralization of SaOS-2 cells on enzymatically (silicatein) modified bioactive osteoblast-stimulating surfaces. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 75B:387-392, 2005.
- [24] Verrier, S., Blaker, J.J., Maquet, V., Hench, L.L., Boccaccini, A.R., PDLA/Bioglass® composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an in vitro cell biology assessment. *Biomaterials*, 25:3013-3021, 2004.
- [25] Chen, Q.Z., Thompson, I.D., Boccaccini, A.R., 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27:2414-25, 2006.
- [26] Jell, G., Stevens, M.M., Gene activation by bioactive glasses. *J Mater Sci: Mater Med*, 17:997-1002, 2006.

- [27] Natalio, F., Link, T., Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Cui, F., Wang, X., Wiens, M., Bioengineering of the silica-polymerizing enzyme silicatein- α for a targeted application to hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*, 6:3720-3728, 2010.
- [28] Cannas, M., Bosetti, M., The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials*, 26:3873-3879, 2005.
- [29] Varanasi, V.G., Saiz, E., Loomer, P.M., Ancheta, B., Uritani, N., Ho, S.P., Tomsia, A.P., Marshall, G.W., Enhanced osteocalcin expression by osteoblast-like cells (MC3T3-E1) exposed to bioactive coating glass ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-MgO-K}_2\text{O-Na}_2\text{O}$ system) ions. *Acta Biomaterialia*, 5:3536-3547, 2009.
- [30] Vallet-Regí, M., Salinas, A.J., Arcos, D., From the bioactive glasses to the star gels. *J Mater Sci: Mater Med*, 17:1011-1017, 2006.
- [31] Kokubo, T., Kim, H., Kawashita, M., Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, 24:2161-2175, 2003.
- [32] Müller, W. E. G., Boreiko, A., Wang, X., Krasko, A., Geurtsen, W., Custódio, M., Winkler, T., Lukié-Bilela, L., Link, T., Schröder, H. C., Morphogenetic Activity of Silica and Bio-silica on the Expression of Genes Controlling Biomineralization Using SaOS-2 Cells. *Calcif Tissue Int*, 81:382-393, 2007.
- [33] Wiens, M., Wang, X., Schröder, H. C., Kolb, U., Schloßmacher, U., Ushijima, H., Müller, W. E. G., The role of biosilica in the osteoprotegerin/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Biomaterials*, 31: 7716-7725, 2010.
- [34] Sumerel, J.L., Yang, W., Kisailus, D., Weaver, J.C., Choi, J.H., Morse, D.E., Biocatalytic templated synthesis of titanium dioxide. *Chem Mater*, 15:4804-4809, 2003.
- [35] Bansal, V., Rautaray, D., Ahmad, A., Sastry, M., Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *J Mater Chem*, 14:3303-3305, 2004.
- [36] Agarwal, S., Wendorff, J.H., Greiner, A., Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, 49: 5603-5621, 2008.
- [37] Formhals, A., Process and apparatus for preparing artificial threads, 1934.
- [38] Bhardwaj, N., Kundu, S.C., Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28:325-347, 2010.
- [39] Liang, D., Hsiao, B.S., Chu, B., Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59:1392-1412, 2007.
- [40] Sill, T.J., Recum, H.A., Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29:1989-2006, 2008.
- [41] Yarin, A.L., Koombhongse, S., Reneker, D.H., Bending instability in electrospinning of nanofibers. *J Appl Phys*, 89:3018-26, 2001.
- [42] Müller, W. E. G., Tolba, E., Schröder, H. C., Diehl-Seifert, B., Link, T., Wang, X., Biosilica-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanofibers mats provide a morphogenetically active surface scaffold for the growth and mineralization of the osteoclast-related SaOS-2 cells. *Biotechnology Journal*, 9(10):1312-1321, 2014.

- [43] Ohgo, K., Zhao, C., Kobayashi, M., Asakura, T., Preparation of non- woven nanofibers for *Bombyx mori* silk, *Samia cythia ricini* silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method. *Polymer*, 44:841–6, 2003.
- [44] Wnek, G.E., Carr, M.E., Simpson, D.G., Bowlin, G.L., Electrospinning of nanofibers fibrinogen structures. *Nano Lett*,3:213–6, 2003.
- [45] Fang, X., Reneker, D.H., DNA fibers by electrospinning. *J Macromol Sci Phys B*, 36: 169–73, 1997.
- [46] Son, W.K., Youk, J.H., Park, W.H., Preparation of ultrafine oxidized cellulose mats via electrospinning. *Biomacromolecules*, 5:197–201, 2004.
- [47] Son, W.K., Youk, J.H., Lee, T.S., Park, W.H., Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fibers. *J Polym Sci, B Polym Phys*, 42:5-11, 2004.
- [48] Ikada, Y., Tsuji, H., Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromol. Rapid Commun*, 21:117-132, 2000.
- [49] Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X., Jing, X., Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science*, 37:237– 280, 2012.
- [50] Middleton, J.C., Tipton, A.J., Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, 21:2335–46, 2000.
- [51] Wang, X., Schröder, H. C., Feng, Q., Draenert, F., Müller, W. E. G., The Deep-Sea Natural Products, Biogenic Polyphosphate (Bio-PolyP) and Biogenic Silica (Bio-Silica), as Biomimetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Fabrication of a Morphogenetically-Active Polymer. *Mar. Drugs*, 11:718-746, 2013.
- [52] Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., Boccaccini A.R., Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27:3413-31, 2006.
- [53] Lee, S.H., Kim, B.S., Kim, S.H., Kang, S.W., Kim, Y.H., Thermally produced biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Macromol Biosci*, 4:802-10, 2004.
- [54] Venkatraman, S., Boey, F., Lao, L.L., Implanted cardiovascular polymers: natural, synthetic and bio-inspired. *Prog. Polym Sci*, 33:853-74, 2008.
- [55] Isenberg, B.C., Williams, C., Tranquillo, R.T. Small- diameter artificial arteries engineered *in vitro*. *Circ Res*, 98:25-35, 2006.
- [56] Neuenschwander, S., Hoerstrup, S.P. Heart valve tissue engineering. *Transplant Immunol*, 12:359-65, 2004.
- [57] Gupta, A., Dixit, A., Sales, K.M., Winslet M.C., Seifalian, A.M., Tissue engineering of small intestines—current status. *Biomacromolecules*, 7:2701-9, 2006.
- [58] Ciardelli, G., Chiono, V., Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromol Biosci*, 6:13-26, 2006.

- [59] Bini, T.B., Gao, S.J., Wang, S., Ramakrishna, S., Development of fibrous biodegradable polymer conduits for guided nerve regeneration. *J Mater Sci Mater Med*, 16:367-75, 2005.
- [60] Yang, F., Murugan, R., Ramakrishna, S., Wang, X., Ma, Y.X., Wang, S., Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials*, 25:1891-900, 2004.
- [61] Cooper, J.A., Lu, H.H., Ko, F.K., Freeman, J.W., Laurencin, C.T., Fiberbased tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation. *Biomaterials*, 26:1523-32, 2005.
- [62] Atala, A., Tissue engineering for the replacement of organ function in the genitourinary system. *Am J Transplant*, 4:58-73, 2004.
- [63] Rowlands, A.S., Lim, S.A., Martin, D., Cooper-White, J.J., Polyurethane/poly(lactic-co-glycolic) acid composite scaffolds fabricated by thermally induced phase separation. *Biomaterials*, 28:2109-21, 2007.
- [64] Yoo, H.S., Lee, E.A., Yoon, J.J., Park, T.G., Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 26:1925-33, 2005.
- [65] Sarazin, P., Roy, X., Favis, B.D., Controlled preparation and properties of porous poly(l-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers. *Biomaterials*, 25:5965-78, 2004.
- [66] Wei, Q.F., Ye, H., Hou, D.Y., Wang, H.B., Gao, W.D., Surface Functionalization of Polymer Nanofibers by Silver Sputter Coating. *Journal of Applied Polymer Science*, 99:2384-2388, 2005.
- [67] Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G., Whitesides, G.M., Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.*, 105:1103-1169, 2005.
- [68] Alseme, B., and Bigerelle, M., Effect of a gold-palladium coating on the long-term adhesion of human osteoblasts on biocompatible metallic materials. *Surface & Coatings Technology*, 200:6325-6330, 2006.
- [69] Lin, M., and Huang, H., Improvement in Dental Porcelain Bonding to Milled, Noncast Titanium Surfaces by Gold Sputter Coating. *Journal of Prosthodontics*, 23:540-548, 2014.
- [70] Wang, S., Wang, X., Draenert, F., Albert, O., Schröder, H.C., Mailänder, V., Mitov, G., Müller, W.E.G., Bioactive and Biodegradable Silica Biomaterial for Bone Regeneration. *Bone*, 67:292-304, 2014.
- [71] Zhu, Y., Gao, C., Liu, X., Shen, J., Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Biomacromolecule Immobilization for Promoting Cytocompatibility of Human Endothelial Cells. *Biomacromolecules*, 3: 1312-1319, 2002.
- [72] Liau, C.P., Ahmad, M.B., Shameli, K., Y, W., Ibrahim, N., Zainuddin, N., Then, Y.Y., Preparation and Characterization of Polyhydroxybutyrate/Polycaprolactone Nanocomposites. *The Scientific World Journal*, 2014:1- 9, 2014.

[73] Yao, Q., Noeaid, P., Detsch, R., Roether, J.A., Dong, Y., Goudouri, O., Schubert, D.W., Boccaccini, A.R., Bioglass[®]/chitosan–polycaprolactone bilayered composite scaffolds intended for osteochondral tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 102(12):4510-4518, 2014.

[74] Pawlak, A., Mucha, M., Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica Acta*, 396:153–166, 2003.

[75] Wiens, M., Link, T., Elkhooly, T.A., Isbert, S., Müller, W.E.G., Formation of a micropatterned titania photocatalyst by microcontact printed silicatein on gold surface. *Chem. Commun.*, 48:11331–11333, 2012.