



*Adalgisa Tavolaro
Istituto di Ricerca per la Tecnologia
delle Membrane (ITM-CNR)
Università della Calabria
Palmira Tavolaro
Dipartimento di Biologia Cellulare
Università della Calabria
a.tavolaro@itm.cnr.it*

SINTESI DI MEMBRANE ZEOLITICHE COMPOSITE

NANOMATERIALI PER L'ADSORBIMENTO DI PROTEINE

Le membrane zeolitiche inorganiche hanno peculiari proprietà ottenute dalla combinazione sinergica delle caratteristiche proprie delle zeoliti e di quelle tipiche delle membrane. L'articolo descrive l'influenza di alcuni parametri sperimentali, quali la temperatura di incubazione, la composizione dell'intelaiatura cristallina ed il pH nell'immobilizzazione di albumina di siero bovino (BSA) su nuove membrane zeolitiche composite ed evidenzia l'ampia applicabilità di materiali sintetici per l'adsorbimento di specie biologiche.

L'adsorbimento di proteine su supporti solidi offre un metodo per preparare derivati di proteine insolubili in acqua [1]. È noto che le molecole proteiche si legano selettivamente a superfici non-biologiche quali quelle di metalli, ossidi, carbonati e semiconduttori. Naturalmente, affinché i supporti inorganici siano utili, occorre che l'attività biologica proteica sia conservata con l'immobilizzazione. È infatti possibile che l'interazione della matrice con la proteina ne provochi l'innattività o il rallentamento funzionale, come conseguenza dell'indi-

sponibilità sterica del sito attivo o di variazioni strutturali o conformazionali [2]. È evidente, quindi, che un'adatta selezione delle matrici è indispensabile per ottenere specie biologiche immobilizzate ed, al tempo stesso, attive.

Lo studio della coniugazione di proteine con nanoparticelle è iniziato negli anni Settanta con lo sviluppo delle sonde immunologiche [3]. Successivamente, sono state riportate in letteratura analisi sistematiche riguardanti adsorbimento di proteine o peptidi (lisozima, catalasi, tripsina, BSA e perossidasi) su nanoparticelle inorga-

niche quali silice ed oro [4, 5]. Tali studi hanno evidenziato, nel processo di adsorbimento, l'influenza delle dimensioni delle particelle sulla struttura e sulla funzionalità biologica e la complessità delle necessarie analisi conformazionali.

Le zeoliti sono materiali inorganici, microporosi e cristallini che hanno una struttura estremamente ordinata e possono essere sintetizzate sotto forma di nanocristalli. Esse hanno una grande area superficiale, grande resistenza termica, meccanica e chimica, pertanto ben si prestano al ruolo di supporti per molecole biologiche. La natura acido/base del materiale può essere modificata cambiando il rapporto Si/Al del reticolo oppure introducendo in esso atomi metallici differenti (Me) (realizzando la cosiddetta sostituzione isomorfa) e variando, per sintesi, il rapporto Si/Me. Inoltre, è possibile modificare l'acidità delle zeoliti per scambio-ionico dei cationi (extra-framework) presenti nei canali microporosi con ioni H⁺ e zeoliti commerciali sono state così modificate e studiate per applicazioni cromatografiche [6-8]. È noto, infine, che le zeoliti sono stabili sia in condizioni umide che secche, non favoriscono lo sviluppo di microrganismi, sono compatibili con analisi di tipo biochimico e, per la loro elevata biocompatibilità, vengono oggi considerate nuovi biomateriali.

La possibilità di modulare le caratteristiche proprie delle zeoliti in una configurazione a membrane, utilizzando le membrane zeolitiche inorganiche in applicazioni biotecnologiche quali, ad esempio, separazioni molecolari, reattori enzimatici a membrana, protein-chips, drug delivery, etc. [9] è un'attraente prospettiva dalle notevoli, potenziali ricadute applicative. Naturalmente, la selezione dei materiali adeguati alle singole applicazioni non può prescindere dallo studio dell'interazione tra la specie biologica ed il supporto inorganico cristallino e quindi dalla comprensione dell'adsorbimento.

Nonostante i materiali zeolitici siano stati ben caratterizzati e largamente utilizzati in applicazioni cromatografiche, l'analisi dell'adsorbimento di proteine su cristalli zeolitici è scarsamente riportato in letteratura, mentre mancano studi riguardanti le membrane zeolitiche.

Pertanto, abbiamo sintetizzato membrane zeolitiche composte piane con strutture FAU, BEA ed MFI, caratterizzate dall'avere una cristallizzazione di tipo "ON", generata da sintesi idrotermale di supporti "inseminati" (cioè trattati preventivamente con semi zeolitici cristallini), oppure da una crescita zeolitica di tipo "IN and ON", formata per cristallizzazione in situ (Fig. 1). Le membrane ed i cristalli sono stati tutti caratterizzati per mezzo di diffrazione a raggi X su polveri, FT-IR, ICP, FESEM ed EPR, mentre la permeazione di gas puri è stata utilizzata

per verificare la buona qualità delle membrane.

La percentuale di BSA adsorbita è stata determinata per mezzo di analisi spettrofotometrica, utilizzando il metodo di Bradford [10]. Tale metodo, indiretto, permette di valutare la quantità di proteina adsorbita applicando un semplice bilancio di massa al valore dell'assorbimento della banda centrata a 595 nm, preventivamente tarata. Gli esperimenti cinetici sono stati condotti utilizzando una soluzione proteica iniziale, opportunamente tamponata, ed avente una concentrazione pari a 1 mg/ml.

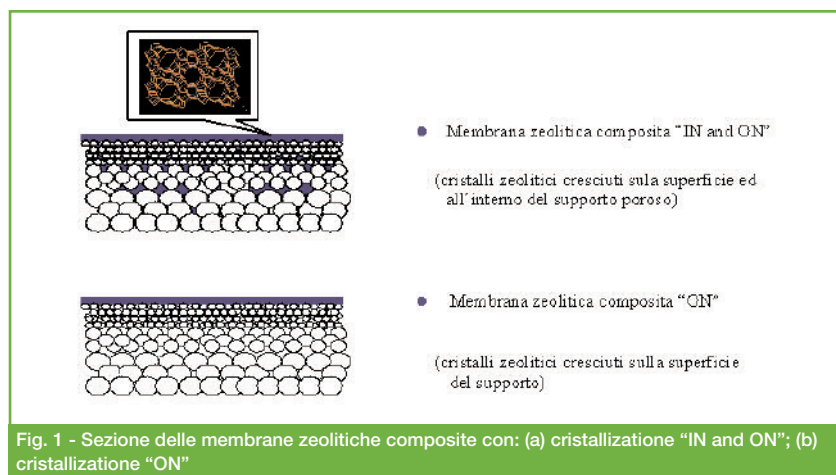
La variazione strutturale della specie biologica, conseguente all'adsorbimento, è stata valutata per mezzo di spettroscopia ATR-FTIR analizzando i cambiamenti della cosiddetta banda dell'Amide I, centrata a 1.650 cm⁻¹.

Per differenziare l'influenza della configurazione a membrana da quella dovuta alla costituzione del materiale, abbiamo collazionato le proprietà di immobilizzazione di cristalli e membrane aventi identiche caratteristiche chimiche, preparative e strutturali. La percentuale di adsorbimento è stata, inoltre, sistematicamente studiata al variare della taglia cristallina (per uguali strutture zeolitiche e composizione chimica), struttura zeolitica (per uguale taglia dei cristalli e composizione) e composizione chimica (per una stessa struttura e taglia cristallina).

Sintesi di cristalli e di membrane

La Tab. 1 riporta le composizioni chimiche utilizzate ed i materiali ottenuti. Le membrane composite sono state preparate per sintesi idrotermale in presenza di un supporto poroso di acciaio del diametro di 25 mm, ottenuto da una lamina commerciale (Type 316LSS, taglia media dei pori 0,2 μm) gentilmente fornitaci dalla Mott Corporation (USA).

Le membrane sono state preparate utilizzando miscele e con-



Tab. 1 - Composizione molare delle miscele di reazione preparate e delle strutture zeolitiche sintetizzate: 10SiO_2 ; $k\text{VOSO}_4$; $j\text{TPABr}$; $v\text{T-OH}$; $w\text{Al}(\text{NO}_3)_3$; $x\text{NH}_4\text{F}$; $y\text{NaOH}$; $z\text{H}_2\text{O}$ dove $0,1 < k < 0,2$; $1,25 < j < 2,2$; $1,2 < v < 5,5$; $0,05 < w < 5,4$; $x = 10,0$; $0,22 < y < 1,0$ e $120 < z < 570$

Campione	Struttura	k	j	v	w	x	y	z
VF-1	MFI	0,2	1,25	-	-	10,0	-	250
VAIF-1	MFI	0,1	-	-	0,7	10,0	-	250
V-1	MFI	0,1	-	1,2*	-	-	-	400
S-1	MFI	-	2,2	-	-	-	1,0	333
Na-Y	FAU	-	-	5,5^	5,4	-	0,22	570
Na-β	BEA	-	-	3,6°	0,05	-	0,28	120

* = TPAOH; ^ = TMAOH; ° = TEAOH

dizioni di reazione del tutto identiche a quelle usate per la sintesi dei cristalli (Tab. 1).

Determinazione della concentrazione proteica

La Fig. 2 mostra il diffrattogramma relativo alla membrana V-1 ed evidenzia l'avvenuta formazione di una struttura di tipo MFI pura, mentre è possibile osservare nelle Fig. 3 e 4, rispettivamente, le immagini FESEM della superficie della membrana Na-β e della membrana Na-Y, ottenute entrambe dalla crescita di nanocristalli.

Influenza della temperatura di incubazione

L'adsorbimento è il più semplice metodo per immobilizzare le proteine con il vantaggio addizionale di essere un metodo di interazione "soft" (perché può provocare le minori variazioni strutturali, rispetto agli altri metodi) ed è, allo stesso tempo, poco costoso. Tale metodo si basa sulle interazioni tra la superficie dell'adsorbente e la sfera esterna della molecola biologica. La valutazione delle possibili interazioni esistenti tra le zeoliti e le proteine, e delle loro

forze relative, è certamente un problema complesso [11].

Per quanto riguarda le membrane, possono essere individuati alcuni importanti fattori, quali la struttura della zeolite, la composizione chimica del reticolo cristallino, la morfologia e la taglia dei cristalli, l'acidità di Brönsted, il numero e la distribuzione dei difetti strutturali, nonché la presenza e distribuzione di gruppi idrossilici. Tali gruppi possono essere visualizzati come gruppi silanilici la cui acidità può essere aumentata, per interazione con specie che siano forti centri acidi di Lewis (Al^{+3}), oppure diminuita dalla presenza di ioni fluoruro interagenti con il reticolo [12].

Per comprendere l'influenza della temperatura di incubazione e, allo stesso tempo, valutare la forza dell'interazione che si instaura tra la BSA ed i materiali zeolitici, abbiamo condotto identici esperimenti di adsorbimento utilizzando tre differenti temperature di incubazione, e precisamente 4 °C, 18 °C e 30 °C.

La Fig. 5 mostra le isoterme di adsorbimento ottenute utilizzando i campioni Na-β, e V-ZSM-5 ed evidenzia l'evoluzione dinamica dell'adsorbimento proteico sui cristalli zeolitici alle tre temperature prescelte.

Questi risultati evidenziano che l'immobilizzazione è sempre favorita dall'innalzamento termico ed, in particolare, che la maggiore percentuale di proteina adsorbita è rilevata, per tutti i materiali sintetizzati, alla temperatura di 30 °C. Possiamo dedurre, inoltre, che l'adsorbimento tra le zeoliti e la BSA è di tipo chimico e quindi energeticamente più importante rispetto all'adsorbimento di tipo fisico riscontrato per i materiali mesoporosi [13].

In particolare, abbiamo osservato tre differenti tipi di comportamento di adsorbimento che possono essere correlati alla percentuale di atomi di alluminio esistente nel reticolo: quello proprio dei cristalli ad alto contenuto di alluminio, quello dei cristalli a basso contenuto di alluminio e quello delle strutture prive di alluminio. Il primo tipo di comportamento sottende alle maggiori percentuali di immobilizzazione osservate, mentre il secondo evidenzia percen-

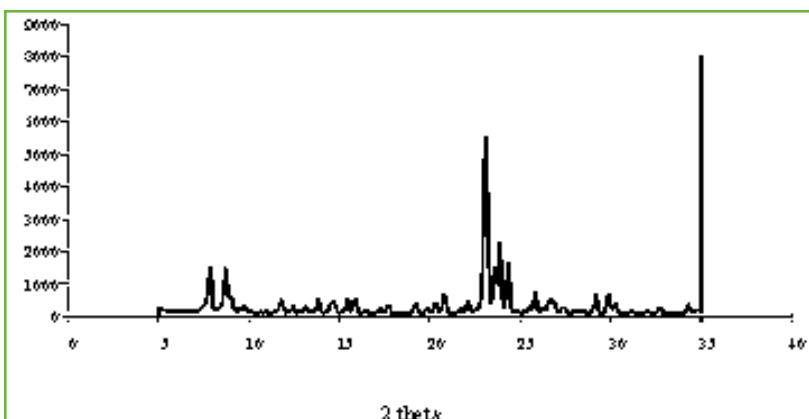


Fig. 2 - Diffrattogramma del campione cristallino V-1

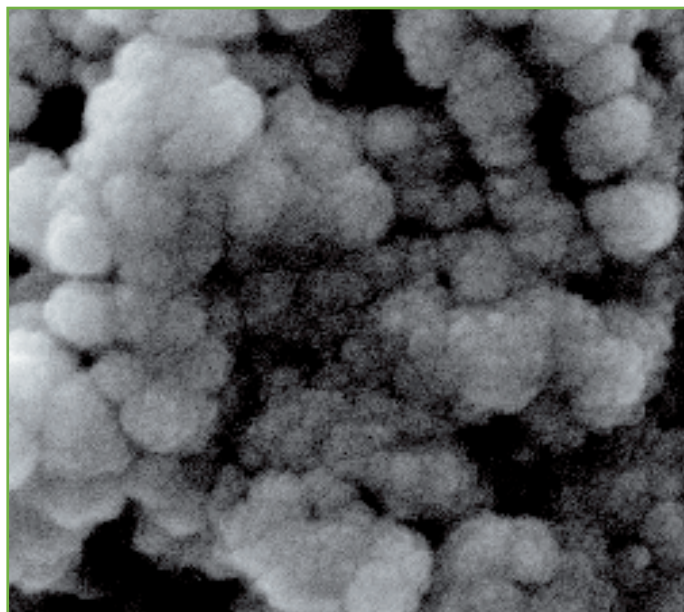


Fig. 3 - Immagine ottenuta al FESEM della superficie della membrana composita Na-β

tuali molto basse, che aumentano gradualmente con la temperatura; una caratteristica intermedia è stata da noi osservata per campioni come il VAIF-1, che mostra un basso adsorbimento proteico (<30%) fino a 18 °C che aumenta poi rapidamente fino a raggiungere quasi l'80% a 30 °C.

Influenza della composizione del reticolo cristallino

Le proprietà acido-base delle zeoliti sono di grande importanza nelle interazioni con soluzioni [14]. Una zeolite acida converte una molecola basica, adsorbita su di essa, nella forma acida coniugata in seguito all'interazione dei siti acidi della superficie cristallina (acidi di Brønsted). Pertanto, se l'immobilizzazione è un adsorbimento chimico con interazione di tipo acido-base, l'immobilizzazione dovrebbe aumentare con l'acidità di Brønsted dei cristalli, cioè con il numero e l'acidità dei gruppi silanolo superficiali (Si-OH). L'acidità di Brønsted in una zeolite può dipendere dalla struttura del suo reticolo cristallino e dalla sua composizione chimica. Così, considerando come struttura zeolitica iniziale la Silicalite-1 (struttura con Si/Al = infinito), l'acidità dei gruppi superficiali di tipo silanolo può essere aumentata leggermente con la parziale introduzione di atomi di vanadio(IV), oppure incrementata fortemente con l'aumento del cosiddetto SAR (rapporto Si/Al) [15].

Per conoscere l'influenza della suddetta acidità di Brønsted sull'adsorbimento della BSA abbiamo sintetizzato tre strutture zeolitiche: FAU, BEA ed MFI. Come già osservato in precedenti studi,

la presenza di ioni fluoruro provoca una diminuzione dell'acidità dei gruppi di tipo silanolo superficiali [12] e potrebbe indurre una riduzione dell'adsorbimento della proteina. Infatti, le zeoliti sintetizzate da miscele acide contenenti ioni fluoruro, trattengono tali ioni nei canali cristallini. Il carattere accettore di tali specie produce un indebolimento della forza del legame Si-O dal momento che i siti acidi di Brønsted agiscono come contro-ioni delle specie $[\text{SiO}_4/2\text{F}]^-$. Per valutare l'effetto della sostituzione isomorfa sull'immobilizzazione è stata preparata, per sintesi idrotermale ed utilizzando un ambiente di reazione contenente ioni fluoruro, una serie di cristalli con un contenuto di vanadio crescente.

Nella serie MFI, la progressiva introduzione dell'alluminio produce un incremento drastico dell'immobilizzazione, mentre la sostituzione isomorfa ad opera del vanadio provoca solo un moderato incremento, in buon accordo, quindi, con le considerazioni teoriche esposte.

Effetto del valore del pH

L'adsorbimento delle proteine su supporti inorganici può essere attribuita, in prima approssimazione, all'attrazione elettrostatica con la superficie [16].

Così, se la proteina ed il cristallo adsorbente hanno cariche elettriche di uguale segno, le interazioni tra loro sono minime a causa delle repulsioni di tipo coulombiano. Al contrario, se le diverse specie hanno cariche di segno opposto le molecole biologiche sono attratte dai cristalli e possono essere assorbite sulla loro

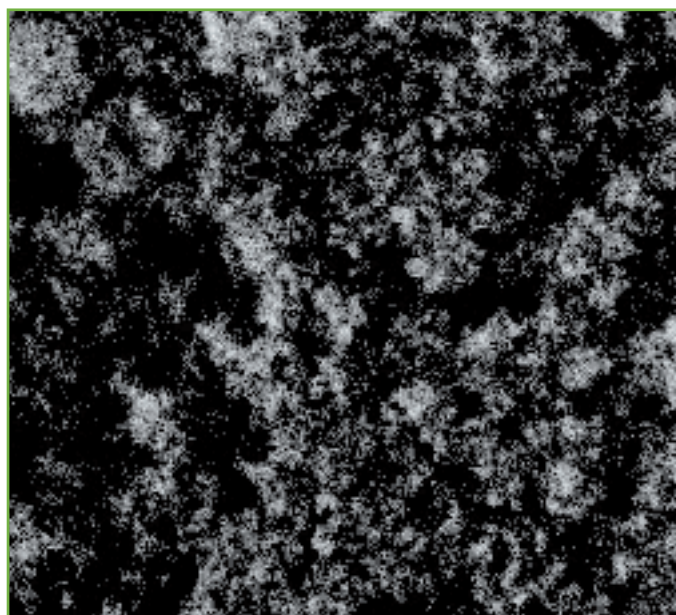


Fig. 4 - Immagine ottenuta al FESEM della superficie della membrana composita Na-Y

Tab. 2 - Percentuale di BSA adsorbita in funzione del pH

Campione	% Proteina adsorbita		
	(pH 4,8)	(pH 7,0)	(pH 8,7)
VF-1	95	90	95
VAIF-1	100	100	100
V-1	100	93	100
S-1	90	82	86
Na-Y	100	100	98
Na-β	100	100	100

superficie. Abbiamo considerato tre differenti condizioni di pH per l'adsorbimento: 4,8, 6,0 e 8,7. La Tab. 2 mostra che, per i campioni sintetizzati, la capacità di adsorbimento diminuisce all'aumentare del pH ed in particolare che il maggiore adsorbimento si osserva in corrispondenza del valore di 4,8.

Una possibile spiegazione di un tale comportamento può essere trovata nelle interazioni elettrostatiche tra la proteina, il cui punto isoelettrico (pI) è circa 4,7-4,8 [7], e la superficie cristallina dell'adsorbente sintetico. La relazione tra il pH della soluzione usata per l'adsorbimento, il pI ed il punto di carica zero (PZC) del materiale inorganico ci ha permesso di razionalizzare le percentuali di adsorbimento rilevate.

Analisi effettuate all'ATR-FTIR, ed in particolare, il confronto delle bande a 1.712 cm^{-1} e quella 1.544 cm^{-1} ci hanno permesso di valutare le variazioni conformazionali della BSA correlate alla variazione di pH.

Effetto della configurazione a membrana

Le membrane composite sono generalmente preparate per inter-crescita cristallina idrotermale. La nucleazione e la crescita zeolitica possono avvenire in un'unica reazione di sintesi (detta *in situ*), oppure in due reazioni separate (secondo la metodologia detta "inseminata"). I due procedimenti producono generalmente membrane caratterizzate da differenti sviluppi di cristalli. In particolare, il primo genera membrane (IN and ON) caratterizzate da un grande sviluppo cristallino, all'esterno ed all'interno del supporto inorganico, mentre il secondo produce membrane composite costituite da un film microporoso, generalmente sottile, accresciutosi sulla superficie non-zeolitica [17].

Abbiamo preparato, per mezzo di sintesi idrotermali, quattro membrane composite "IN and ON" ed "ON" ottenute, rispettivamente, da cristallizzazione "in situ" e per "inseminazione" (Tab. 3) e le abbiamo, successivamente, utilizzate per l'immobilizzazione di BSA da soluzioni opportunamente tamponate.

Le dimensioni relative delle specie coinvolte comportano che

l'adsorbimento si verifichi esclusivamente sulla superficie esterna cristallina. Come abbiamo evidenziato, zeoliti differenti, per struttura, composizione chimica ed ambiente di reazione, hanno percentuali di adsorbimento diverse tra loro. Così, ci si potrebbe aspettare che lo stesso comportamento relativo osservato per le varie strutture dei cristalli zeolitici, in virtù dell'interazione tra il materiale inorganico e la specie biologica, possa essere atteso per omologhi cristalli organizzati in una configurazione a membrana [11]. Le nostre osservazioni sperimentali evidenziano che tale considerazione si riferisce ad un caso ideale nel quale un film zeolitico perfetto interagisce con una soluzione di BSA. Numerosi parametri sperimentali quali, ad esempio, la procedura di preparazione, il tipo di zeolite, le condizioni di calcinazione possono influire sul numero e la taglia di regioni intercristalline, nonché sulla formazione di difetti.

Il numero e la grandezza di questi ultimi sono difficili da valutare in strutture estese. Tuttavia, i dati sperimentali ottenuti dall'adsor-

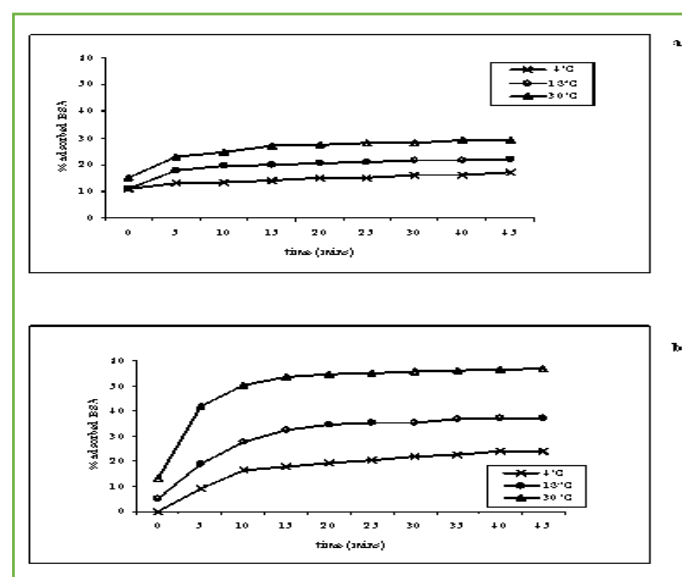


Fig. 5 - Isotherme di adsorbimento per i campioni: (a) VAIF-1 (1,0) and (b) Na-β (soluzione proteica = 90,9 μg/ml per 1 mg di cristalli zeolitici)

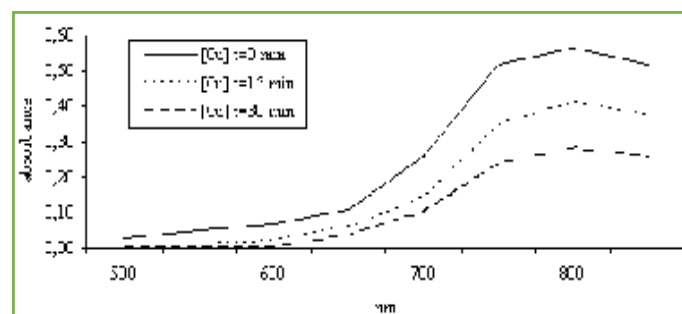


Fig. 6 - Spettri UV-vis relativi alla soluzione di Cu(II) e BSA immobilizzata su cristalli zeolitici Na-β, al variare del tempo di contatto

Tab. 3 - Caratteristiche morfologiche delle membrane zeolitiche sintetizzate e percentuale di BSA adsorbita

Membrana	Tipo di cristallizzazione	Zeolite (g)	Lunghezza dei cristalli (μm)	[BSA] _i ($\mu\text{g/ml}$)	[BSA] _f ($\mu\text{g/ml}$)	BSA adsorbita (%)
S-1	IN and ON	0,47	68	5.400	1.066,9	80,2
Na- β	IN and ON	0,50	12	6.000	678,34	88,7
Na- β	ON	0,46	nanocristalli	5.280	1.108,3	79,1
Na-Y	ON	0,11	nanocristalli	1.320	292,75	77,8

bimento su membrane composite, uguali per composizione chimica, morfologia e struttura zeolitica, mostrano che l'immobilizzazione è favorita da una configurazione di tipo "IN and ON" rispetto ad una configurazione di tipo "ON", ottenuta da cristallizzazione zeolitica per "inseminazione".

Verifica dell'attività biologica

In tutti i processi di adsorbimento, la conservazione dell'attività biologica delle proteine immobilizzate è indispensabile. Pertanto, abbiamo controllato che ciò si verificasse per tutti i materiali preparati. A tale scopo abbiamo utilizzato soluzioni di solfato di rame(II) che, come è noto, reagisce specificatamente con il residuo istidinico della BSA formando una proteina ciclo-metallata Cu-BSA ($K_f = 1,5 \times 10^{16}$) [18]. La diminuzione della banda centrata a 805 nm, tipica delle soluzioni di solfato di rame(II), permette di evidenziare la reazione. La Fig. 6 mostra gli spettri UV ottenuti nel tempo utilizzando i cristalli Na- β , come supporto.

Conclusioni

I dati riportati in questo studio evidenziano che la composizione chimica delle strutture zeolitiche sintetizzate influenza l'adsorbimento della BSA. In particolare, le maggiori percentuali di immobilizzazione della proteina sono state da noi ottenute con strutture a basso rapporto Si/Al, per una soluzione di adsorbimento caratterizzata da temperatura pari a 30 °C, con valore del pH di circa 4,8 ed una configurazione a membrana di tipo "IN and ON". L'analisi spettroscopica nella regione dell'infrarosso (non mostrata) ci ha permesso di evidenziare i cambiamenti conformazionali proteici dovuti all'adsorbimento che provoca, a pH acido una perdita della percentuale delle β -sheet ed un aumento del carattere random.

Ringraziamento: Gli autori desiderano ringraziare il Centro di Eccellenza per lo studio dei Materiali Innovativi Funzionali (CEMIF.CAL) dell'Università della Calabria per la disponibilità dell'ATR-FTIR.

Bibliografia

- [1] M. Malmsten, Protein architecture. Interfacing molecular assemblies and immobilization biotechnology, Marcel Dekker, Inc., New York, 2000, pp. 1-22.
- [2] M.H. Baron *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, **214**, 319.
- [3] W.P. Faulk, G.M. Taylor, *Immunochem.*, 1971, **8**, 1081.
- [4] A.A. Vertegel *et al.*, *Langmuir*, 2004, **20**, 6800.
- [5] C. Czeslik, C., R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2001, **3**, 235.
- [6] D. Klint *et al.*, *Protein Expression and Purification*, 1994, **5**, 569.
- [7] H. Chiku *et al.*, *Anal. Biochem.*, 2003, **318**, 80.
- [8] M. Ghazi-Khansari, *et al.*, *Clinica Chimica Acta*, 2006, **364**, 235.
- [9] A. Tavolaro, *Desalination*, 2002, **147**, 333-338.
- [10] M.M. Bradford M. M., *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248.
- [11] P. Tavolaro, A. Tavolaro, *Desalination*, 2006, **200**, 516.
- [12] B. Louis, B., L. Kiwi-Minsker, *Micr. Mes. Mat.*, 2004, **74**, 171.
- [13] A. Macario *et al.*, *Stud. Surf. Catal.*, 2002, **142**, 1561.
- [14] J.N. Kondo *et al.*, *J. Mol. Cat. A: Chem.*, 2000, **191**, 275.
- [15] A. Tavolaro *et al.*, *J. Crystal Growth*, 2006, **289**, 609.
- [16] P. Ying *et al.*, *J. Coll. Interface Sci.*, 2004, **279**, 95.
- [17] T. Peters Jr., *Adv. Protein Chem.*, 1985, **37**, 161.
- [18] A. Tavolaro, E. Drioli, *Adv. Mater.*, 1999, **11**, 975.

Synthesis of Zeolite Composite Membranes. Nanomaterials for the Protein Adsorption

The surface adsorption behavior of zeolite crystals and composite membranes was discussed in this research. The zeolite materials were synthesized by hydrothermal syntheses using different reaction gels to modulate the Brönsted acidity of the microporous structures. The percentage of adsorption increases with temperature and depends on the pH of the solution, being highest at the pI of the protein. The influence of the membrane configuration on the protein adsorption was studied using different zeolite structures and crystallization types.