

ADRIANA FREIRE LUBAMBO

ARRANJOS AUTO-ORGANIZADOS
DA PROTEÍNA GlnB de *Herbaspirillum seropedicae*
EM SILÍCIO

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor: Curso de Pós-
graduação em Física, Setor de Ciências
Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador:
Prof. Dr. Paulo César de Camargo.

CURITIBA

2005

Dedico este trabalho à memória de meu pai-avô Henrique Freire de Barros,

Ao meu filho Gabriel (luz da minha vida), ao meu marido Jean ,

A minha mãe Lúcia e meu irmão Manoel,

e a uma “pessoinha” chamada *Herbaspirillum Seropedicae*.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a várias pessoas com as quais eu tive a sorte e a honra de ter convivido durante o meu doutorado e também as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram ao longo da minha vida na realização do meu sonho em “aprender” a Física.

Ao meu orientador Paulo César de Camargo pela proposta deste tema de trabalho. Sua visão inovadora me abriu um mundo de perspectivas novas e estimulantes. Obrigada pela sorte que eu tive de um dia ter te cruzado nos corredores da física e de ter recebido este maravilhoso convite.

A Elaine Benelli que me faz ter esperanças na pesquisa, pelos seus conhecimentos de Bioquímica e por ter me iniciado nesse “mundo novo” que é a cristalografia de proteínas, pelo amor que ela dedica a suas proteínas e pela grande amizade demonstrada durante as horas de incerteza.

Ao Marcelo Honnicke e ao Edson Kakuno pela grande aventura que foi ter convivido com vocês dois durante os meus anos de Raios-X, obrigada por ter me ensinado tudo o que eu sei de Raios-X e por ter demonstrado o valor da amizade.

Ao Fabiano Yokaichyia, pela amizade, pela ajuda, pela grande contribuição ao trabalho devido a sua visão global, não só na área de Raios-X, pelo seu amor ao que faz e a física.

Ao Professor Edílson, pelo apoio e desprendimento, sempre disposto a me escutar e ajudar, pelo o que aprendi com ele sobre infravermelho e pelas horas que passamos divertidas durante as medições no LACTEC.

Ao Prof. Mazzaro, pela amizade, por acreditar no meu trabalho, pela dedicação ao ensino da física .

Ao Günther Kelermann pela colaboração e ajuda na XRD2.

Ao “Seu Rubens”, pelo apoio, pela amizade, pela disposição de sempre me ajudar e pela generosidade demonstrada não só comigo, mas por todas as pessoas ao seu redor.

Ao Douglas e ao Ilton pelo trabalho e dedicação na confecção das minhas peças sempre em “caráter de urgência”.

Ao Prof. Carlos Giles pela colaboração.

Ao Prof. César Cusatis, pelo generoso apoio me deixando usar as instalações e o material do LORXI (me fazendo sentir como se estivesse na minha casa), pelo início do aprendizado de Raios-X, me confiando o monocromador de quatro-cristais sem piscar, e pelo aprendizado da autonomia.

Ao Lactec e Ricardo Ferracin ao por me deixar utilizar o espectrômetro Bomem.

Ao LSI e ao Prof. Wido Schreiner pela utilização do espectrômetro ESCA e também ao Jorge Klein pelo apoio nas medidas.

Ao Prof. Gerad Krill por ter me dado a oportunidade de estudar em Paris 11 e a Annie Pape, uma grande pessoa.

A Anaides, a última pessoa da lista, mas não a menos importante, pela amizade, pelo apoio e por ter me escutado e me compreendido.

Sumário

Introdução.....	1
Organização da Tese.....	5
Capítulo1	8
Proteínas.....	8
1.1 Introdução.....	8
α -Hélice.....	9
Folha β	10
1.2 A proteína GlnB-Hs.....	11
1.3 Descrição da superfície de Silício.....	15
1.4 Correlação do estado de carga superficiais da proteína GlnB-Hs e o estado de hidrofobicidade da superfície do silício	17
Capítulo2	18
Adsorção de proteínas em superfícies sólidas	18
2.1 Introdução.....	18
2.2 Visão geral das interações que promovem a adsorção em meio líquido.....	19
Interação proteína-superfície	19
Proteínas lábeis	20
Proteínas rígidas	20
Interação proteína-solvente	20
Interação proteína-proteína	21
2.3 Estabilidade conformacional da proteína.....	21
2.4 Estrutura da camada adsorvida	21
Proteínas flexíveis do tipo polímero	21
Proteínas com comportamento de partículas coloidais	22
Proteínas de lábeis	22
2.5. Formação da camada adsorvida.....	23
2.6 Formação do filme de proteína durante a deposição por "spin-coating"	23
2.7 Simulação para proteína GlnB-Hs	30
Conclusão do capítulo 2	38
Capítulo 3	39
Microscopia de Força Atômica da Proteína GlnB-Hs sobre Silício	39
3.1 Introdução à técnica.....	39
Modo contato.....	41
Modo dinâmico.....	41
Imagem de Fase	41
3.2 Preparação das amostras biológicas.....	42
3.3 Resultados Experimentais.....	43
3.4 Protocolo de Limpeza de Pontas de AFM	43
3.5 Deposição da proteína GlnB-HS em substrato de silício	46
Primeira Fase	47
Si (111)- 100 pMol, hidrofílico, 30 segundos de incubação.....	48
Si (111)-100 pMol, hidrofílico, 1 minuto de incubação	49
Si (111)-100 pMol, hidrofílico, 5 minutos de incubação.....	51
Si (111)-100 pMol, hidrofílico, 10 minutos de incubação.....	53
Si (111)-10 nMol, hidrofílico, 30 minutos de incubação.....	55
Si (100)-100 pMol, hidrofílico, 10 minutos de incubação.....	57
Vidro-100 pMol, hidrofílico, 10 minutos de incubação	59
Proteína desnaturada 100 pmol sobre Si (111) hidrofílico, 10 minutos de incubação.....	62
Segunda Fase	64
Velocidade de 500rpm, substrato hidrofílico.....	65
Velocidade 1000rpm, substrato hidrofílico	66
Velocidade 1500rpm, substrato hidrofílico	69
Velocidade 2500rpm, substrato hidrofílico	70
Velocidade 2500 rpm, substrato hidrofóbico.....	71
Conclusão do capítulo 3	74
Capítulo4	76
Espectroscopia de Fotoelétrons (XPS) da Proteína GlnB-Hs sobre Silício	76
4.1 Introdução à técnica.....	76
4.2 Descrição de um experimento básico	78

4.3 Instrumentação	78
Fator de instrumentação F_3	79
Seção de choque diferencial de fotoionização F_2	80
Características da amostra F_1	81
Livre caminho médio do fotoelétron	82
Intensidade de uma linha do espectro de XPS	83
4.4 Resultados experimentais	86
Protocolo de adsorção da proteína GlnB-Hs no substrato de silício	86
Procedimento de medidas	87
Comparação e discussão de resultados	90
a. Primeira série	90
b. Segunda série	91
4.5 Programa de simulação da espessura de camada em função da fração de cobertura do substrato	99
Conclusão do capítulo 4	101
Capítulo 5	102
Espectroscopia de Infravermelho da Proteína GlnB-Hs sobre Silício	102
5.1 Introdução à técnica	102
Infravermelho em atenuação total	103
Distância de penetração	104
Ângulo de incidência efetivo	106
Número de reflexões efetuadas dentro do cristal analisador	106
5.2 Análise da conformação estrutural da proteína através do infravermelho	106
Amida I	107
Amida II e Amida III	108
Amida III	108
5.3 Resultados experimentais	109
Procedimento de medidas	109
5.3 Protocolo de adsorção da proteína GlnB-Hs e da solução tampão no substrato de silício	110
Protocolo de deposição da proteína GlnB-Hs	110
Protocolo de desnaturação da proteína	110
Protocolo de deposição do tampão da proteína GlnB-Hs	111
5.5 Espectro de Absorção do Silício Puro	111
5.6 Espectros do infravermelho obtidos para Si (111) com a proteína adsorvida	112
Região da Amida III (1000 cm^{-1} a 1450 cm^{-1})	114
Região da amida II (1450 cm^{-1} - 1600 cm^{-1})	114
Região da amida I (1600 cm^{-1} - 1700 cm^{-1})	115
5.7 Espectros do infravermelho obtidos para Si (100) com a proteína adsorvida	116
Região da amida III (1000 cm^{-1} a 1450 cm^{-1})	117
Região da amida II (1450 cm^{-1} - 1600 cm^{-1})	118
Região da amida I (1600 cm^{-1} - 1700 cm^{-1})	118
5.8 Comparação entre espectros de substratos com orientação cristalina diferentes	119
Si (100) hidrofílico e Si (111) hidrofílico	119
Si (100) hidrofóbico e Si (111) hidrofóbico	120
Conclusão do capítulo 5	122
Capítulo 6	123
Raios-X em incidência rasante da Proteína GlnB-Hs sobre Silício	123
6.1 Introdução à técnica	123
A difração de Raios-X em incidência rasante	124
6.2 Resultados experimentais	127
Protocolo de adsorção da proteína GlnB-Hs no substrato de silício	129
Parâmetros da coleta de dados	130
Perfis de refletividade do silício(100) e de silício(111) usados como referência	131
Tratamento dos dados	131
Resultados	131
Perfis de refletividade da proteína GlnB-Hs sobre Si(111) hidrofílico	132
Perfis de Refletividade da proteína GlnB-Hs sobre Si(100) hidrofílico	133
Perfis de refletividade do tampão, Tris-HCl e EDTA sobre Si(100) hidrofílico	135
Conclusão do capítulo 6	144
Capítulo 7	146
Conclusão final e Trabalhos Futuros	146

Referências	151
A1. Apêndice do capítulo 1	162
A2. Apêndice do capítulo 2	163
Programa para a simulação do potencial de interação (DLVO)	163
A4. Apêndice do capítulo 4	164
Silício 111 Padrão:	164
Amostra 1	166
Amostra 2	168
Amostra 3	170
Amostra 4	172
Amostra 5	174
Programa escrito para simular a equação $f(Y,t) = N/Si$	176
A6. Apêndice capítulo 6	177

Sumário de Figuras

Figura 1.1: Unidade básica da proteína formando a estrutura primária. Esta unidade se repete ao longo da cadeia primária. R é o símbolo para radical (Branden, et al., 1998).....	9
Figura 1.2. Estrutura da proteína GlnB-Hs, folhas β em amarelo e α -hélices em púrpura (RASMOL).....	10
Figura 1.3: Diagrama da proteína GlnB-Hs.....	12
Figura 1.4: Estado de cargas e potencial eletrostático da proteína GlnB-Hs respectivamente. (a). e (d). Face inferior, (b). e (e). Face Lateral. (c). e (f). Face superior. (Imagem e convenção de cores (RASMOL).	13
Figura 1.5: Aminoácidos hidrofóbicos. (a). Face inferior (b). Face lateral (c). Face superior.	14
Figura 1.6: Aminoácidos polares superficiais: (a). Face inferior (b). Lateral (c). Face superior.	15
Figura 1.7: Modelo clássico estrutural proposto para a camada formada de SiO_2 no silício (111). (Hirose et al., 1991).....	16
Figura 2.1: Diagrama do processo de “spin-coating” mostrando o perfil da velocidade radial e da concentração durante a fase 2 (Lawrence, 1988).....	24
Figura 2.2: Características principais do potencial de interação total $V(x)$ expresso em $(0,62V(x) \text{ eV})$ da partícula coloidal carregada (proteína GlnB-Hs) em função da distância a superfície do substrato x expressa em nm. 1.Barreira de potencial que as partículas devem vencer para atingir o equilíbrio termodinâmico mais estável em 3. mínimo primário, se não, elas poderão permanecer no 2. mínimo secundário (mais instável), ou se dispersar na solução. Simulação para o caso de $\text{pH}=11$ e carga superficial da proteína de $-30,11 \times 10^{-19} \text{ C}$	28
Figura 2.3: Diagrama de formação do filme secundário (virtual) de altura h_n . O tempo de vida deste filme virtual estaria relacionado com arranjos 2D ordenados de proteínas (Adachi et al., 1997).	29
Figura 2.4: Carga superficial da proteína em função do pH da solução tampão, ponto isoelétrico correspondendo ao $\text{pH} = 5.9$	30
Figura 2.5: Diagrama esquemático mostrando a geometria do filme fino depositado e os parâmetros principais da simulação. (Adachi, et al., 1997).	31
Figura 2.6: (a). Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62 V(x) \text{ eV})$ contra a distância expressa em nm para a interação DLVO no caso da deposição usual utilizada no trabalho, a densidade de íons inicial é de $I=0,05\text{n}$, estimando uma camada de filme eletrolítico de 100 nm. (b). Força de interação eletrostática expressa em $(10^{-10} F(x) \text{ N})$ correspondente.	32
Figura 2.7.: Caso (A):(a'). Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62 V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que a densidade de íons é de $I=0,01\text{n}$, camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. (b'). Força de interação eletrostática expressa em $(10^{-10} F(x) \text{ N})$ correspondente....	33
Figura 2.8: Caso (B): (a'). Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que a densidade de íons é de $I=0,02\text{n}$, com uma camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. (b'). Força de interação eletrostática expressa em $(F(x)10^{-10} \text{ N})$ correspondente.....	33
Figura 2.9: Caso (C): (a'). Gráfico do potencial de interação em $(0,62 V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,03\text{n}$, camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. (b'). Força de interação eletrostática em $(F(x)10^{-10} \text{ N})$ correspondente.	34
Figura 2.10: Casos (D, E) respectivamente: (a'). Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62 V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,04\text{n}$, camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. (b'). Força de interação eletrostática expressa em $(F(x)10^{-10} \text{ N})$ correspondente. (c'). Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62V(x) \text{ eV})$ contra distância nm no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,05\text{n}$. (d'). Força de interação eletrostática expressa em $(F(x)10^{-10} \text{ N})$ correspondente.	34
Figura 2.11: Caso (A): (a'). Gráfico do potencial de interação x expressa em $(0,62 V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que densidade de íons é de $I = 0,01\text{n}$, carga superficial da proteína - $30,11 \times 10^{-19} \text{ C}$, camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. (b'). Força de interação eletrostática expressa em $(F(x) 10^{-10} \text{ N})$ correspondente.....	35
Figura 2.12: Casos (B, C) respectivamente: (a'). Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62 V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,05\text{n}$, carga superficial da proteína igual $-30,11 \times 10^{-19} \text{ C}$, camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. (b'). Força de interação eletrostática expressa em $(F(x) 10^{-10} \text{ N})$ correspondente (c'). Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62V(x) \text{ eV})$ contra distância no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,2\text{n}$. (d'). Força de interação eletrostática expressa em $(F(x)10^{-10} \text{ N})$ correspondente.	36
Figura 2.13: Casos (D, F) respectivamente: (a'). Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,3\text{n}$, carga superficial da proteína igual a $-30,11 \times 10^{-19} \text{ C}$, camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. (b'). Força de interação eletrostática expressa em $(F(x) 10^{-10} \text{ N})$ correspondente (c'). Gráfico do potencial de interação	

expresso em $(0,62V(x) \text{ eV})$ contra distância nm no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,5n$. (d') .	
Força de interação eletrostática correspondente expressa em $(F(x) 10^{-10} \text{ N})$	37
Figura 3.1: Força de interação de Van der Waals entre os átomos da amostra e da ponta de prova.	40
Figura 3.2: Imagem AFM, modo contato(a, b, c, d), dimensões $25 \mu\text{m}^2$. (a) . Imagem adquirida com a ponta nova. (b) . Imagem adquirida com a ponta contaminada. (c) . Imagem adquirida com a ponta limpa com o polímero. (d) . Imagem adquirida com a ponta limpa com a celulose. Imagem AFM modo dinâmico, (e, f, g, h), dimensões $25 \mu\text{m}^2$. (e) . Imagem adquirida com a ponta nova. (f) . Imagem adquirida com a ponta contaminada. (g) . Imagem.....	45
adquirida com a ponta limpa com o polímero. (h) . Imagem adquirida com a ponta limpa com a celulose.	45
Figura 3.3: Imagem AFM modo contato, dimensões $25 \mu\text{m}^2$ (a) . Imagem com a ponta suja. (b) . Imagem com a ponta limpa com polímero e curvas de força. (c) . Imagem com a ponta limpa com polímero, álcool e curvas de força. (d) . Imagem com a ponta limpa com polímero, álcool, curvas de força e U.V.	46
Figura 3.4: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (111). Incubação de 30s. (a) . Imagem de dimensões $(3,75 \times 3,75) \mu\text{m}$. (b) . Imagem de fase da imagem a. (c) . Zoom da imagem a, dimensões de $(938, 00 \times 938, 00) \text{ nm}$ (d) . Imagem de fase da imagem c.....	48
Figura 3.5: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (111). Incubação de 1 minuto. (a) . Imagem de dimensões $(3,75 \times 3,75) \mu\text{m}$. (b) . Imagem de fase da imagem a. (c) . Zoom da imagem a, dimensões de $(938, 00 \times 938, 00) \text{ nm}$ (d) . Imagem de fase da imagem c.	49
Figura 3.6: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.5. Imagem de dimensões $(1,87 \times 1,87) \mu\text{m}$. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.	50
Figura 3.7: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (111). Incubação de 5 minutos. (a) . Imagem de dimensões $(1,25 \times 1,25) \mu\text{m}$. (b) . Imagem de fase da imagem a. (c) . Zoom da imagem a, de dimensões $(625, 0 \times 625, 00) \text{ nm}$. (d) . Imagem de fase da imagem c.	51
Figura 3.8: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.7a., Imagem de dimensões $(1,25 \times 1,25) \mu\text{m}$. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.	52
Figura 3.9: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (111). Incubação de 10 minutos. (a) . Imagem de dimensões $(7,50 \times 7,50) \mu\text{m}$. (b) . Imagem de fase da imagem a. (c) . Zoom da imagem a, de dimensões $(938, 00 \times 938, 00) \text{ nm}$ (d) . Imagem de fase da imagem c.	53
Figura 3.10: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.9 (c). Imagem de dimensões $(938, 00 \times 938, 00) \text{ nm}$. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.	54
Figura 3.11: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (111). Incubação de 10 minutos, concentração 10 nMol. (a) . Imagem de dimensões $(3,75 \times 3,75) \mu\text{m}$. (b) . Imagem de fase da imagem a. (c) . Zoom da imagem a, de dimensões $(1,87 \times 1,87) \mu\text{m}$. (d) . Imagem de fase da imagem c.....	55
Figura 3.12: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.11(c). Imagem de dimensões $(1,87 \times 1,87) \mu\text{m}$. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.	56
Figura 3.13: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (100). Incubação de 10 minutos. (a) . Imagem de dimensões $(3,75 \times 3,75) \mu\text{m}$. (b) . Imagem de fase da imagem a. (c) . Zoom da imagem a, de dimensões $(938, 00 \times 938, 00) \text{ nm}$. (d) . Imagem de fase da imagem c.	57
Figura 3.14: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.13©. Imagem de dimensões $(938, 00 \times 938, 00) \text{ nm}$. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.	58
Figura 3.15: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de vidro. Incubação de 10 minutos. (a) . Imagem de dimensões $(938, 00 \times 938, 00) \text{ nm}$. (b) . Imagem de fase da imagem a. (c) . Zoom da imagem a, de dimensões $(234, 00 \times 234, 00) \text{ nm}$. (d) . Imagem de fase da imagem b. (e) . Zoom da imagem c, de dimensões $(117, 00 \times 117, 00) \text{ nm}$. (f) . Imagem de fase da imagem e.	60
Figura 3.16: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.15(a). Imagem de dimensões $(938, 00 \times 938, 00) \text{ nm}$. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.	61
Figura 3.17: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.15. Imagem de dimensões $(234,00 \times 234,00) \text{ nm}$. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.	61
Figura 3.18: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (111). Incubação de 10 minutos. (a) . Imagem de dimensões $(2,50 \times 2,50) \mu\text{m}$. (b) . Imagem de fase da imagem a. (c) . Zoom da imagem a, de dimensões $(1,25 \times 1,25) \mu\text{m}$ (d) . Imagem de fase da imagem c.	62
Figura 3.19: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.18. Imagem de dimensões $(1,25 \times 1,25) \mu\text{m}$. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.	63
Figura 3.20: Imagem de AFM, modo dinâmico, da amostra de proteína em silício (111) hidrofílico a 500rpm. A adsorção ocorreu nas bordas e região central, mas é visível a superfície do substrato. (a) . Imagem de dimensões $(1,00 \times 1,00) \mu\text{m}$ da região central da amostra. (b) . Imagem de fase da fig.a (c) . Imagem de dimensões $(2,00 \times 2,00) \mu\text{m}$ da borda (d) . Imagem de fase da figura c.....	65
Figura 3.21: Imagem de AFM, modo dinâmico, da amostra de proteína em silício (111) hidrofílico a 1000rpm. A adsorção ocorreu regularmente na região central e bordas (a) . Imagem de dimensões $(1,00 \times 1,00) \mu\text{m}$ da	

região central da amostra. (b) . Imagem de fase da fig.a. (c) . Imagem de dimensões (1, 00 x 1, 00) μm da borda (d) . Imagem de fase da figura c.	66
Figura 3.22: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.21(a). Imagem de dimensões (1, 00 x 1, 00) μm . A altura é relativa à camada inferior de proteínas.	67
Figura 3.23: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.21. Imagem de dimensões (500, 00 x 500, 00) nm. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.	68
Figura 3.24: Imagem de AFM, modo dinâmico, da amostra de proteína em silício (111) hidrofílico a 1500rpm. A adsorção ocorreu nos centros e quase pouco nas bordas do substrato (a) . Imagem de dimensões (2,00 x 2, 00) μm da região central da amostra. (b) . Imagem de fase da fig.a (c) . Imagem de dimensões (1,00 x 1,00) μm da borda (d) . Imagem de fase da figura c.	69
Figura 3.25: Imagem de AFM, modo dinâmico, da amostra de proteína em silício (111) hidrofílico a 2500rpm. Absorção nas bordas não ocorreu homogeneamente (a) . Imagem de dimensões (1, 00 x 1, 00) μm da região central da amostra. (b) . Imagem de fase da fig.a (c) . Imagem de dimensões (1, 00 x 1, 00) μm da borda (d) . Imagem de fase da figura c.	70
Figura 3.26: Imagem de AFM modo dinâmico da amostra de proteína em silício (111) hidrofóbico. Os fios são formados com a configuração face-lateral. (a) . Imagem de dimensões (4,00 x 4, 00) μm , da borda da amostra. (b) . Imagem de fase da fig.a (c) . Imagem de dimensões (2,00 x 2, 00) μm , de outra região da borda (d) . Imagem de fase da figura c.	71
Figura 3.27: Imagem de AFM modo dinâmico da amostra de proteína em silício (111) hidrofóbico. Os fios são formados com a configuração face-lateral (a) . Imagem de dimensões (2,00 x 2, 00) μm . (b) . Imagem de fase da fig.a (c) . Imagem de dimensões (1, 00 x 1, 00) μm zoom da fig.a. (d) . Imagem de fase da figura c. (e) . Imagem de dimensões (500, 00 x 500, 00) nm zoom da fig.c. (f) . Imagem de fase da fig.e.	72
Figura 3.28: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.27©. Imagem de dimensões (1,00 x 1, 00) μm . A altura é relativa a camada inferior de proteínas.	73
A região central do silício hidrofóbico adsorveu poucas proteínas como pode ser visto pela figura 3.29 abaixo:	73
Figura 3.29: Imagem AFM, modo dinâmico, (a) . Região central do substrato de silício hidrofóbico (111), imagem de dimensões (2, 00 x 2, 00) μm . (b) . Imagem de fase da fig.a, mesmas dimensões.	73
Figura 4.1: Diagrama da interação do fóton de energia $h\nu$ com a matéria criando um fotoelétron de energia cinética $E_k = h\nu - E_b$ (Andrade, 1985).	77
Figura 4.2: Desenho esquemático mostrando os principais parâmetros da geometria de um espectrômetro XPS (Nefedov, 1988).	79
Figura 4.3: (a) . Panorama da amostra 1 (500 rpm), mostrando os principais picos analisados e silício (111) padrão. (b) . Espectro dos fotoelétrons característicos do Si 2p e Si 2p -SiO ₂ da amostra 1 na primeira varredura e após 40 minutos, para investigação da estabilidade da amostra. (c) . Panorama correspondente ao caso b.	88
Figura 4.4: Espectro dos fotoelétrons provenientes do substrato de Si (111) Si2p e da camada de óxido Si 2p-SiO ₂ para as concentrações de 10 pMol, 100 pMol, 1000 pMol.	90
Figura 4.5: Imagens topográficas de AFM em modo dinâmico da amostra de 1000 rpm (melhor fração de recobrimento): (a) . Centro da amostra. (b) . Borda da amostra. Imagens de dimensões (2,00 x 2, 00) μm	94
Figura 4.6: Imagens topográficas de AFM em modo dinâmico da amostra de 1000 rpm (melhor fração de recobrimento): Zoom da imagem 4.3b, dimensões (500, 00 x 500, 00) nm.	94
Figura 4.7: (a) . Espectro normalizado de fotoelétrons Si2p Si (111) e da camada de óxido Si 2p-SiO ₂ de todas as amostras reunidas. (b) . Espectro normalizado no caso anterior exceto para as amostras 4 e 5.	95
Figura 4.8: Imagens topográficas de AFM em modo dinâmico da amostra de Si (100) hidrofóbico, 2500 rpm (a) . Borda da amostra, imagem de dimensões (4, 00 x 4, 00) μm . (b) . Borda da amostra, outra região diferente do caso a. Dimensões da imagem de (1, 00 x 1,00) μm	96
Figura 4.9: Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes da emissão Si2p-Si e da camada de óxido Si2p-SiO ₂ das amostras com proteína em substrato hidrofílico e substrato hidrofóbico a 2500 rpm.	97
Figura 4.10: (a) . Espectro normalizado de fotoelétrons N1s de proteínas depositadas no substrato hidrofílico e hidrofóbico de Si (111). O sinal de N1s protonado é mais intenso para a amostra com substrato hidrofóbico. (b) . Espectro normalizado de fotoelétrons N1s da série de substratos hidrofílicos: amostra 2 (1000 rpm, maior cobertura) possui o sinal mais atenuado de N1s protonado.	98
Figura 5.1: Simulação da profundidade de penetração expressa em micrômetros da onda eletromagnética em um cristal de ZnSe com uma camada de proteína de índice de refração de 1,5 em função do número de onda expresso cm^{-1}	105
Figura 5.2: Diagrama das reflexões múltiplas dentro do cristal analisador da onda eletromagnética, onde β é o ângulo das faces do cristal, ϕ é o ângulo de incidência óptico e θ o ângulo de incidência efetivo.	106
Figura 5.3: Diagrama simplificado dos modos de vibração da trans-amida. No caso da amida I, existirá deformação axial na ligação carbono-oxigênio e deformação angular no plano do radical N-H.	107

Figura 5.4: Diagrama simplificado dos modos de vibração da trans-amida. No caso da amida II, existirá deformação axial na ligação carbono= oxigênio-nitrogênio e deformação angular no plano do radical N-H.	108
Figura 5.5: Diagrama simplificado dos modos de vibração da trans-amida. No caso da amida III, existirá deformação axial na ligação carbono= oxigênio-nitrogênio e deformação angular no plano do radical N-H. Além de contribuições de C-C e C-N.	108
Figura 5.6: Detalhe da célula de medida em ATR do espectrômetro Bomem DA8 FT com o cristal analisador ZnSe no centro da célula.	109
Figura 5.7: Gráfico dos espectros de absorvância do Si (111) e Si (100), apresentando as principais bandas características dos dois substratos. O silício apresenta uma janela de absorção entre 1500 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}	112
Figura 5.8: Gráfico do espectro de absorvância da proteína GlnB-Hs sobre silício (111), hidrofóbico e hidrofílico, apresentando as principais bandas características nos dois casos. O espectro do silício limpo pode ser utilizado para comparações.	113
Figura 5.9: Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (111) na região de absorção da banda da amida III (1100 cm^{-1} a 1200 cm^{-1}). (a). Silício hidrofílico. (b). Silício hidrofóbico.	114
Figura 5.10: Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (111) na região de absorção da banda da amida II (1450 cm^{-1} a 1600 cm^{-1}). (a). Silício hidrofílico. (b). Silício hidrofóbico.	115
Figura 5.11: Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (111) na região de absorção da banda da amida I (1600 cm^{-1} a 1700 cm^{-1}). (a). Silício hidrofílico. (b). Silício hidrofóbico.	116
Figura 5.12: Gráfico do espectro de absorvância da proteína GlnB-Hs sobre Si (100), hidrofóbico e hidrofílico, apresentando as principais bandas características nos dois casos.	116
Figura 5.13: Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (100) na região de absorção da banda da amida III (1000 cm^{-1} a 1450 cm^{-1}). (a). Silício hidrofílico.(b). Silício hidrofóbico.	118
Figura 5.14: Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (100) na região de absorção da banda da amida II (1450 cm^{-1} a 1600 cm^{-1}). (a). Silício hidrofílico. (b). Silício hidrofóbico.	118
Figura 5.15: Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (100) na região de absorção da banda da amida I (1600 cm^{-1} a 1700 cm^{-1}). (a). Silício hidrofílico. (b). Silício hidrofóbico.	119
Figura 5.16: (a). Vista geral do espectro de absorção do silício (100) e silício (111) hidrofílico, ambos apresentando características semelhantes. (b). Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (100) e silício (111) hidrofílicos na região de absorção da banda da amida I (1600 cm^{-1} a 1700 cm^{-1}).	120
Figura 5.17: Gráfico do espectro de absorvância da proteína GlnB-Hs sobre Si (111) e Si (100) hidrofóbicos, apresentando as principais bandas características nos dois casos.	121
Figura 6.1: Geometria 1, mostrando os vetores de incidência e espalhamento ($\alpha_i = \alpha_r = \alpha$ e $2\theta_{xy} = 0$), (Jensen et al., 2001).	126
Figura 6.2: Geometria 2, mostrando os vetores de incidência e espalhamento formando o triângulo de espalhamento no espaço recíproco, ($2\theta_{xy} \neq 0$) e $\alpha_i \geq 0$ (Jensen et al., 2001).	127
Figura 6.3: Desenho esquemático do raio de exclusão efetuado pela proteína devido ao fenômeno de exclusão estérica.	128
Figura 6.4: Perfis de refletividade (a). silício (100) de referência. (b). Si (111) de referência. Notar a ausência de ombros.	131
Figura 6.5 (a). Imagem AFM em modo dinâmico da Proteína GlnB-Hs (10 nMol), depositada a 1000 rpm, lavada 3x com Tris/Hcl a 2500 rpm. (b). imagem de fase da figura a. (c). Solução tampão (50 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl, 0,1 mMol EDTA e 10% glicerol) depositado em Si (100). (d). Imagem de fase da figura c. Dimensões das imagens (4,00 x 4,00) μm , a e b; (1,00 x 1,00) μm c e d.	132
Figura 6.6: Perfis de Refletividade (a). Si (111) em função da deposição e Si (111) de referência. (b). Si (111) L, apresentando um pico de difração em 0,194 \AA^{-1} , $d = 32 \text{\AA}$, provavelmente está relacionado com a proteína GlnB-Hs.	133
Figura 6.7: Perfis de refletividade (a). Silício (100) em função da deposição e Si (100) de referência. (b). Si (100) amostra 1, apresentando um pico de difração a 0,157 \AA^{-1} , $d = 39,97 \text{\AA}$, Ele está relacionado com a proteína GlnB-Hs.	134
Figura 6.8: (a). Perfil de refletividade de 50 mMol Tris-HCl sobre Si(100),(preto) e Si(111),(vermelho)com analisador de grafite (002). (b). Perfil de refletividade da solução tampão sobre Si (100) com analisador de grafite (002). (c). Perfil de refletividade de 0,1mMol de EDTA sobre Si (100) com analisador de grafite (002). (d). Perfil de refletividade da Proteína GlnB-Hs sobre Si (100), (vermelho) e de Si(100), (preto) de referência.	138
Figura 6.9: Imagem por microscopia ótica da deposição de Tris-HCl 50 mMol sobre silício. As dentritas características de cristalização são visíveis ao centro da imagem.	138

Figura 6.10: (a). Perfil de refletividade para a amostra Si (111)b e a mesma varredura efetuada pela segunda vez.	
(b) Perfil de refletividade para a amostra Si(100) 3 e varredura correspondente efetuada pela segunda vez.	
.....	139
Figura 6.11: (a). Varredura inicial ($\phi=0^\circ$) e final ($\phi=360^\circ$) do pico de difração situado a $q = 0, 31 \text{ \AA}^{-1}$.(b).	
Posição angular de todas as varreduras azimutais. (c). Área integrada relacionada com as varreduras	
azimutais. (d). Largura a meia altura correspondentes a c.	140
Figura 6.12: Simulação do programa Casino da trajetória de um fotoelétron dentro de um cristal de proteína	
GlnB-HS com duas dimensões (a). Dimensões de (24,6 x 24,6) nm (b). Dimensões de (1,00 x 1,00) μm .	
(c). Energia transmitida (KeV)do fotoelétron para caso a. (d). Energia transmitida (KeV) do fotoelétron para	
caso b.....	143
A1.Diagrama esquemático da cascata de detecção e controle de nitrogênio na bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .	
.....	162
Figura A4.1 : Imagem AFM em modo dinâmico do centro e bordas do silício (111) padrão. a. Centro da mostra.	
b. Imagem de fase da imagem a. Dimensões: $1\mu\text{m}^2$. c. Borda da amostra. d. Imagem de fase da borda da	
amostra 1. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$	164
Figura A4.2: a. Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes Si2p Si (111) e da camada de óxido Si2p-	
SiO ₂ para o silício (111) padrão. b. Panorama do espectro de fotoelétrons do Si (111) padrão.	165
Figura A4.3: 500 rpm. Imagem AFM em modo dinâmico do centro e bordas da amostra 1. a. Centro da mostra.	
b. Imagem de fase da imagem a. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$. c. Borda da amostra. d. Imagem de fase da borda da	
amostra 1. Dimensões: $1\mu\text{m}^2$	166
Figura A.4.4: a. Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes Si2p Si (111) e da camada de óxido Si 2p-	
SiO ₂ para a amostra 1. b. Espectro de fotoelétrons do N 1s para a amostra 1.	167
Figura A4.5: 1000 rpm. Imagem AFM em modo dinâmico do centro e bordas da amostra 2. a. Centro da mostra.	
b. Imagem de fase da imagem a. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$. c. Borda da amostra. d. Imagem de fase da borda da	
amostra 1. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$	168
Figura A4.6: a. Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes Si2p Si (111) e da camada de óxido Si2p-	
SiO ₂ para a amostra 2. b. Espectro de fotoelétrons do N 1s para a amostra 2.	169
Figura A4.7: 1500 rpm. Imagem AFM em modo dinâmico do centro e bordas da amostra 3. a. Centro da mostra.	
b. Imagem de fase. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$. c. Borda da amostra. d. Imagem de fase da borda da amostra 1.	
Dimensões: $4\mu\text{m}^2$	170
Figura A4.8: 1500 rpm. a. Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes Si2p Si (111) e da camada de	
óxido Si2p- SiO ₂ para a amostra 3. b. Espectro de fotoelétrons do N 1s para a amostra 3.	171
Figura A4.9: 2500 rpm. Imagem AFM em modo dinâmico do centro e bordas da amostra 4. a. Centro da mostra.	
b. Imagem de fase da imagem a. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$. c. Borda da amostra. d. Imagem de fase da borda da	
amostra 1. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$	172
Figura A4.10: a. Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes Si2p Si (111) e da camada de óxido Si 2p-	
SiO ₂ para a amostra 4. b. Espectro de fotoelétrons do N 1s para a amostra 4.....	173
Figura A4.11 : Imagem AFM em modo dinâmico do centro e bordas da amostra 5. a. Borda da mostra. b.	
Imagem de fase da imagem a. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$. c. Centro da amostra. d. Imagem de fase do centro da	
amostra 5. Dimensões: $1\mu\text{m}^2$	174
Saída do programa Estar: cálculo do "collision stopping power" em função da energia incidente para a proteína	
GlnB-Hs.	177

Sumário de Tabelas

Tabela 3.1: Resultados do programa IQM do protocolo de limpeza de pontas para imagens em modo dinâmico e contato. Se $IQ_{\text{razão}} > 1$ imagem A possui melhor qualidade que imagem B. Se $IQ_{\text{razão}} < 1$ imagem B possui qualidade melhor que a imagem A.....	45
Tabela 3.2: Resultados do programa IQM para imagens em modo contato durante as diversas etapas do protocolo de limpeza de pontas.	46
Tabela 3.3: Resumo dos tipos de deposição da proteína GlnB-HS sobre substrato sólido em função da orientação do substrato, tempo de incubação, concentração e do tipo de substrato.	47
Tabela 3.4: Resumo dos tipos de deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de Si(111) em função da rotação do "spin-coater".	64
Tabela 4.1: (a). Primeira série: variação de concentração de proteína em função da velocidade do "spin-coater" fixa. (b). Segunda série: variação da velocidade de deposição em função concentração de proteína fixa.	87
Tabela 4.2: Linhas de emissão do espectro de XPS analisadas contra energias de ligação correspondentes.	89
Tabela 4.3: Indica a espessura limite mínima calculada pelo modelo 2 e a fração de cobertura superficial calculada pelo modelo 1 considerando 3nm de espessura (monocamada).	93
Tabela 4.4: Energia de ligação dos fotoelétrons emitidos pelas amostras para C1s, N1s, O1s . Informação extraída dos espectros experimentais. (ver apêndice).	99
Tabela 5.1 Resumo das principais bandas de absorção da proteína GlnB-Hs, por categoria de absorção da amida para silício (111) hidrofílico e hidrofóbico.	113
Tabela 5.2: Resumo das principais bandas de absorção da Proteína GlnB-Hs por categoria de absorção de amida para o substrato de silício (100) hidrofílico e hidrofóbico.	117
Tabela 6.1: Tipos de depósitos efetuados	129
Tabela 6.2. Lista da posição dos picos de difração e os parâmetros de rede correspondentes.	134
Tabela 6.3: Tabela de depósitos efetuados para tris-HCl, EDTA, solução tampão e proteína sobre Si(100) para controle.	135
Tabela A4.1: Resumo dos resultados experimentais (energias de ligação características) extraídos dos espectros da amostra de Silício (111) padrão.	165
Tabela A4.2: Resumo dos resultados experimentais (energias de ligação características) extraídos dos espectros da amostra 1.....	167
Tabela A4.3: Resumo dos resultados experimentais (energias de ligação características) extraídos dos espectros da amostra 2.....	169
Tabela A4.4: Resumo dos resultados experimentais (energias de ligação características) extraídos dos espectros da amostra 3.....	171
Tabela A4.5: Resumo dos resultados experimentais (energias de ligação características) extraídos dos espectros da amostra 4.....	173
Tabela A4.6: Resumo dos resultados experimentais (energias de ligação características) extraídos dos espectros da amostra 5.....	175

Resumo

Adsorção de proteínas em suportes sólidos é um tema importante para uma grande gama de domínios. Proteínas, além de possuírem dimensões nanométricas, são capazes de se auto-arranjarem formando arquiteturas supra-moleculares espacialmente e funcionalmente controláveis. Estas propriedades podem ser exploradas para diversas aplicações que incluem biocompatibilidade, biosensores, nanofilmes para cristalização de proteínas e nanofios. Por estas razões, a qualidade do filme fino, tais como homogeneidade e ordenamento, formado durante o processo de adsorção, deve ser monitorada por experimentos sensíveis à estrutura.

Este trabalho investiga a agregação da proteína globular GlnB-Hs de *Herbaspirillum seropedicae* em suportes sólidos de silício. Esta proteína foi purificada no departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e participa da cadeia complexa de fixação, controle e detecção de nitrogênio.

Além das implicações agrotécnicas, o estudo da adsorção dessa proteína tem como o objetivo a investigação da conformação estrutural dos arranjos 2D auto-organizados, formados durante a deposição do filme fino de proteína por "spin-coating". Devido à complexidade das proteínas e do processo de adsorção, este estudo necessitou de várias técnicas para investigação: microscopia de força atômica, XPS, Infravermelho e Raios-X. A técnica de AFM permitiu a determinação da geometria dos arranjos adsorvidos auto-organizados. A adsorção preferencial em silício hidrofílico leva à formação de arranjos do tipo rosquinha, com a proteína com face para cima. Para o Si (111) hidrofóbico observa-se a formação de filamentos que podem alcançar comprimentos micrométricos, com evidências que neste caso a proteína é adsorvida lateralmente.

Os resultados de XPS permitiram a determinação da melhor condição de deposição do filme e uma estimativa da espessura destes, além de fornecer informações sobre a relação de nitrogênios protonados e desprotonados. Apresenta-se uma interpretação para formação destes arranjos auto-organizados com base nas polaridades superficiais proteína-silício e na desprotonação de resíduos superficiais carregados da proteína. Os filmes finos depositados no silício hidrofóbico apresentam espectro de absorção no infravermelho substancialmente diferente quando se compara a superfície Si (100) e Si (111). A técnica de Raios-X fornecem indicações de ordenamento na direção vertical fora do plano do filme fino, apontando para domínios ordenados de alguns ângstrons, estáveis sob o feixe de Raios-X.

Abstract

The investigation of self-assembled protein adsorption on solid surfaces is relevant for both, understanding protein properties and its applications. In addition to the nanometric dimensions, proteins naturally self-assemble building functional and spatially controllable supramolecular architectures. These aspects have been explored for applications such as biocompatibility, biosensor design, nanobiofilm templates for protein crystallization and also nanowire formation, however, for these developments the quality of the thin film has to be monitored by nanometric sensitive experiments.

This work consists on the investigation of the adsorption of globular protein GlnB-Hs of *Herbaspirillum seropedicae* on silicon. GlnB-Hs is a signal transduction protein involved in the nitrogen detection and fixation control, and was purified at the department of Biochemistry and Molecular Biology of "Universidade Federal do Paraná".

Despite of the technological possibilities for applications on agriculture, this study examines the structural conformation of the 2D protein thin film self-assembled deposited by "spin-coating".

Protein adsorption is a complex phenomenon and no single experimental or theoretical approach is enough to depict an overview of this area of interest. This study combined various techniques to draw from experimental methods a picture of GlnB-Hs adsorption on silicon using atomic force microscopy, XPS, FTIR-IR and X-Ray grazing incidence. AFM technique showed the geometry and topography of self-organized aggregates. The adsorption on hydrophilic substrates led to the formation of donuts shapes, with evidences of face-up protein adsorption. In the case of hydrophobic Si (111), one can find micrometric long filaments which are likely to be formed of proteins on side-on adsorption. XPS results allowed an estimation of film thickness and contain information on the ratio between protonated and unprotonated nitrogen. It is proposed a mechanism for the self-assembly of the protein, based on protein-silicon surface polarity and on the de-protonation of nitrogen from the charged surface residues of the protein.

Thin films deposited on hydrophobic silicon present an infrared adsorption spectra that is quite different when Si(100) is compared to Si(111) which is expected, due to the exposure of the bare silicon surface. X-ray technique provides information on ordering along out of plane vertical direction, pointing to ordered domains with dimensions of a few angstroms that are stable under irradiation.

Introdução

Proteínas estão na base da vida. O corpo humano é formado por 80% de proteínas, sem considerarmos o volume de água (Nagayama, 1996). Existe uma enorme variedade de proteínas diferentes na natureza, e cada uma delas possui a habilidade de executar uma tarefa altamente específica (Larserricsdotter, 2004). Este material inovador, disponível em grande escala na natureza, tem a vantagem de ter evoluído durante bilhões de anos. A desvantagem de deteriorar-se facilmente e os grandes custos de produção vêm sendo suplantados pela infinidade de aplicações potenciais e pelo desenvolvimento da biotecnologia.

Proteínas possuem a propriedade de se acumular nas interfaces (Hlady, et al., 1996) e a adsorção em superfícies sólidas é muito importante para uma grande gama de domínios: Esta propriedade pode ser explorada de uma forma positiva para o desenvolvimento de biosensores (Gray, 2004), implantes (Hlady, et al., 1996), determinação de estruturas de proteínas (Li, et al., 1999), membranas para filtração (Sleytr, et al., 2003), formação de nanofios (Scheibel, et al., 2003), (Lowe, 2000), moldes para cristalização de proteínas (Pechkova, et al., 2004), testes imunológicos, sistemas de transporte de drogas (Hlady, 1996), “microarrays” (Mirzabekov, et al., 2001).

Em adição a suas dimensões nanométricas, proteínas possuem a grande vantagem de se auto-associarem e este processo é importante durante a adsorção. Ele permite a criação e a concepção de arquiteturas supramoleculares controláveis tanto funcionalmente como espacialmente (Yates, et al., 2002), (Padilla, et al., 2001).

A adsorção em suportes sólidos pode também ter um papel significativo no processo de cristalização e na determinação da estrutura de proteínas (Li, et al., 1999). O conhecimento da estrutura 3-D da proteína é essencial para o entendimento dos mecanismos moleculares que levam a conseqüente criação de novas drogas, a um melhor entendimento de novas doenças emergentes, assim como o conhecimento de seus mecanismos de ação. No

entanto, este campo é dominado por protocolos empíricos onde, até agora, a cristalização de proteínas é uma tarefa difícil e laboriosa que depende de encontrar a composição ideal da solução que permitirá a cristalização. Os resultados são sempre imprevisíveis e às vezes irreprodutíveis. A formação e o crescimento do cristal é um processo longo e frágil, devido às interações fracas entre as moléculas de proteínas na malha cristalina, que devem manter-se embebidas em solução para evitar a fissura do cristal (Giegè, et al., 1995), (McPherson, et al., 1995). Além do mais, existem proteínas que são relutantes em cristalizar. Por exemplo, é bem conhecida a dificuldade de preparar cristais 3-D de proteínas de membranas (Jap, et al., 1992). Portanto, o rápido desenvolvimento da biologia estrutural e da cristalografia de proteínas (Pechkova, et al., 2005) esbarra na necessidade de novas metodologias e protocolos sofisticados para cristalização e preparação de amostras de qualidade envolvendo o crescimento de cristais com dimensões micrométricas. Recentemente, encontrou-se boa correlação entre estudos estruturais de cristais de membrana investigados de duas formas: estudos de filmes depositados em substratos sólidos e secos em condições normais atmosféricas de um lado e, do outro, dados coletados de estruturas de cristais por Raios-X obtidos por métodos convencionais (Kim, et al., 2000).

O processo de adsorção de proteínas em interfaces sólidas tem mostrado sua grande importância estratégica na formação de moldes para cristalização de proteínas. A deposição de um filme fino de proteína em um suporte sólido como vidro siliconado antes de proceder-se o método da “gota pendurada” clássico de cristalização, induz o crescimento rápido de cristais (Pechkova, et al., 2001) e pode ajudar na cristalização e determinação de estruturas de proteínas que nunca foram cristalizadas (Pechkova, et al., 2004). Uma possível razão para este fenômeno é a criação de ilhas (2D) de filmes nanométricos ordenados de proteína no substrato que agiriam como centros de nucleação (Pechkova, et al., 2005). O cristal formado por “nanomolde” é mais estável a danos causados por radiação (Pechkova, 2005), e o

empacotamento cristalino é bem maior quando comparado com cristais crescidos pelo método clássico produzindo também, um cristal de melhor qualidade (Pechkova, et al., 2005).

Este trabalho se propõe a estudar a agregação da proteína GlnB-Hs, uma proteína globular, em suportes sólidos de silício. Esta proteína, proveniente da bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, é encontrada em caules de abacaxi, arroz, feijão, etc., e foi purificada no departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. Esta proteína participa da cadeia complexa de fixação, controle e detecção de nitrogênio.

Além das aplicações agrotécnicas, o estudo da adsorção dessa proteína em substratos sólidos tem como objetivo a investigação da conformação estrutural do arranjo 2D auto-organizado, formado durante a deposição do filme fino de proteína. O ordenamento de proteínas em um suporte sólido tem o imenso potencial de poder ser usado como um novo tipo de material, onde será possível aproveitar as funções individuais de cada proteína em novas funções globais devido ao ordenamento. A criação de dispositivos nanoeletrônicos baseados na auto-agregação de metalo-proteínas demonstra que a corrente elétrica através do dispositivo é 10 vezes maior quando existe uma camada ordenada (Rinaldi, et al., 2004).

Assim, nas décadas de 90, trabalhos de engenharia de arranjos de proteínas começaram a se desenvolver. Primeiro estudos de agregação de filmes finos de partículas coloidais micrométricas de látex em substrato de vidro foram realizados (Denkov, et al., 1992). Neste trabalho evidenciou-se que as principais forças governando o arranjo ordenado seriam as forças atrativas de capilaridade e o transporte convectivo de partículas em direção à região ordenada. Em seguida, dentro do projeto ERATO ("Protein Array Project" 1990-1995), (Nagayama, 1996), realizaram-se experimentos de ordenamento de proteínas em filmes líquidos de glucose, mercúrio e água (Adachi, et al., 1997). Ainda dentro deste mesmo projeto, foram utilizados substratos sólidos (Adachi, 1996) para a determinação do

mecanismo principal de formação de arranjos ordenados, relacionando-os com o tempo de formação e duração de um filme virtual secundário e com as forças de capilaridade.

Neste trabalho o substrato escolhido foi o silício comercial monocristalino nas orientações cristalográficas (111) e (100), com polimento de qualidade ótica e planicidade ótimas. As razões principais desta escolha foram: a possibilidade de investigar influência da orientação cristalina do substrato nos arranjos protéicos de filmes finos (Haggerty, 1991), já que a simetria e orientação cristalina do suporte podem influenciar na auto-organização da proteína; baixo custo e disponibilidade de silício de excelente qualidade (Nagayama, 1996), pois é um material de amplo uso na indústria eletrônica, além de ter uma superfície bem caracterizada e de possuir uma planicidade a nível atômico. Por outro lado, o silício tem afinidade suficiente para permitir a adsorção e formação de um filme fino da molécula a ser estudada mantendo-as, no mínimo, parcialmente funcionais (Santos, et al., 2004). A facilidade em eliminar-se a camada de óxido de silício, modificando-se sua superfície de hidrofílica para hidrofóbica, é um fator determinante para a escolha deste material como substrato. De fato, durante a adsorção, a imobilização da proteína é um fator relevante para a sua estrutura. Dependendo da natureza da proteína e da força de interação com o substrato sólido, a imobilização pode causar mudanças na estrutura e, conseqüentemente, na funcionalidade da molécula. Por esta razão, a qualidade do filme fino formado durante a adsorção deve ser monitorado por experimentos sensíveis à estrutura (Lösche, 1997).

Dada a complexidade das proteínas, nenhuma técnica ou aproximação teórica possui respostas exaustivas para as questões relativas à auto-organização da proteína adsorvida em substratos sólidos, pois o processo de adsorção de proteínas depende de muitas variáveis. Assim, faz-se necessário combinar resultados e conclusões extraídas de várias técnicas. Cada método experimental fornece informações sobre diferentes aspectos do estado

da proteína adsorvida, lembrando-se que estamos tratando de poucas camadas atômicas e que as técnicas de investigação são aquelas adaptadas para filmes finos e superfícies.

A microscopia de força atômica (Atomic Force Microscopy-AFM) é especialmente útil na identificação dos arranjos preferenciais de agregados em função das características do substrato, fornecendo informação da organização no plano e da topografia dos agregados. A homogeneidade e porcentagem de cobertura do substrato podem ser determinadas pelas imagens de AFM e são complementadas com informações de espectroscopia de fotoelétrons (X-Ray Photoelectron Spectroscopy-XPS).

As técnicas de difração a baixo ângulo e refletometria de Raios-X fornecem informação da organização estrutural, regularidade e espessura dos filmes de proteína. A interação com radiação infravermelha fornece informações sobre a estabilidade da proteína GlnB-Hs quando adsorvida em um substrato sólido, e eventuais diferenças de conformação na estrutura secundária segundo o estado de hidrofobicidade do substrato e tipo de orientação cristalina. Estas diferentes técnicas utilizadas serão abordadas e discutidas nos próximos capítulos e as conclusões resultantes apresentadas de cada aspecto por capítulo pelas diversas técnicas serão combinadas para se construir um quadro geral no último capítulo do estado de absorção da proteína GlnB-HS sobre o substrato sólido de Si(111) e Si (100).

Organização da Tese

A tese está dividida em 7 capítulos:

O capítulo 1 traz uma visão geral do que são proteínas, como elas se estruturam e em particular aborda informações sobre as características da proteína GlnB-Hs, tais como estrutura secundária encontrada nesta proteína, estado de cargas superficiais, resíduos hidrofóbicos, potencial eletrostático da proteína e aspectos da função da proteína GlnB-Hs na bactéria *Herbaspirillum seropedicae*. Uma descrição do estado superficial das superfícies de

silício e estado de hidrofiliicidade são correlacionadas com as características superficiais da proteína GlnB-Hs durante a adsorção.

O capítulo 2 introduz o fenômeno de adsorção de proteínas em interfaces sólido-liquido como base para a compreensão de um fenômeno mais complexo que é a adsorção de proteínas em interfaces que mudam com o tempo. Em seguida, descrevem-se as forças físicas envolvidas no processo de formação do filme fino de proteína por substrato girante ("spin-coating") que foi utilizado para recobrimento do substrato sólido. Uma breve abordagem da teoria DLVO (Derjaguin- Landau, Verwey-Overbeek) que prevê a interação entre interfaces e partículas carregadas é aplicada ao caso específico da formação do filme de GlnB-Hs e a provável formação de arranjos ordenados de proteínas em substratos de silício.

Os capítulos 3, 4, 5 e 6 abordam as diversas técnicas utilizadas para a compreensão do fenômeno de adsorção por "spin-coating" da proteína GlnB-Hs sobre os substratos de silício e estão organizados da seguinte maneira: uma visão compreensiva da técnica conjuntamente com os resultados experimentais e conclusões.

No capítulo 3 descreve-se o método desenvolvido para a limpeza de pontas quando se investiga materiais biológicos com microscopia de força atômica (AFM). Apresenta-se ainda resultados da investigação por microscopia de força atômica das diversas formas de agregação da proteína GlnB-Hs em substrato de Si(111) e Si(100), tanto hidrofílico como hidrofóbico e vidro. As deposições foram realizadas usando a técnica de "spin-coating" (substrato girante) e deposição em um substrato imóvel. Correlações dos arranjos formados na deposição nas condições de substrato móvel e imóvel são também discutidas.

O capítulo 4 é dedicado aos resultados obtidos com a técnica XPS para avaliação da regularidade das camadas de filmes finos de proteína obtidas por "spin-coating", bem como à investigação dos prováveis sítios preferenciais de adsorção da proteína GlnB-Hs em substratos hidrofílicos e hidrofóbicos.

A técnica de infravermelho (Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflectance-FTIR-ATR) é o tema do quinto capítulo que aborda a investigação da estabilidade da proteína GlnB-Hs em substratos hidrofílicos e hidrofóbicos de Si(100) e Si(111). O espectro de absorção da proteína GlnB-HS desnaturada é utilizado como referência.

O sexto capítulo tenta elucidar a estrutura do filme fino de GlnB-Hs produzido por "spin-coating". Neste capítulo utiliza-se perfis de difração em incidência rasante procurando demonstrar a formação de arranjos auto-organizados ordenados de proteína GlnB-Hs em silício. O sétimo, e último capítulo é dedicado a análise conjunta dos resultados obtidos com as diversas técnicas, as conclusões e as sugestões dos possíveis trabalhos futuros.

Capítulo 1

Proteínas

Aborda-se inicialmente os conceitos básicos sobre estrutura de proteínas para compreensão das características principais da estrutura da proteína GlnB-Hs, bem como as suas propriedades elétricas e seu estado superficial de cargas. Inclui-se, também, uma breve descrição da função desta proteína no organismo da bactéria *Herbaspirillum seropedicae*. Em seguida, será apresentada uma descrição da superfície de Si (111) e Si (100) e seu estado de hidrofobicidade buscando correlações com as características superficiais de carga da proteína GlnB-Hs durante a adsorção.

1.1 Introdução

Proteínas são macromoléculas nitrogenadas de peso moleculares variáveis, formadas por aminoácidos. Existem cerca de 20 aminoácidos diferentes que podem fazer parte da constituição das proteínas (Branden, 1988; Lehninger, 1993). Macromoléculas com massa molecular abaixo de 5000 Dalton (1 Da igual a $1,66E^{-27}$ kg, massa de um átomo de hidrogênio) não são consideradas proteínas. Todos os aminoácidos naturais isolados dos produtos exceto a glicina, são opticamente ativos e na mesma configuração levógira (Branden, 1988). A conformação levógira é aquela em que os grupamentos ligados ao C_{α} aparecem na seguinte ordem: grupamento COOH, o radical R e o grupamento NH_3^+ , quando a rotação é realizada no sentido horário, tendo o C_{α} ligado ao hidrogênio, posicionado no centro do tetraedro. Na proteína, os aminoácidos ligam-se por ligações peptídicas formando a cadeia polipeptídica. Na ligação peptídica, o grupo carboxílico de um aminoácido condensa-se ao grupo amina do outro aminoácido, formando a cadeia principal primária. O grupo amina do primeiro aminoácido e o grupo carboxílico do último aminoácido permanece inalterado. Daí a denominação de N terminal e de C terminal. A unidade básica repetida ao longo da cadeia principal será: $NH-C_{\alpha}H-C'=O$, como esboçado na figura 1.1:

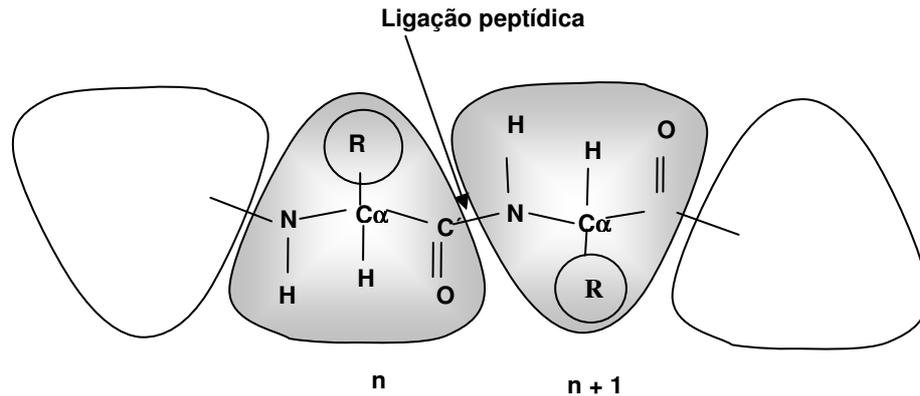


Figura 1.1: Unidade básica da proteína formando a estrutura primária. Esta unidade se repete ao longo da cadeia primária. R é o símbolo para radical (Branden, et al., 1998).

A ligação covalente de aminoácidos formando a cadeia polipeptídica caracteriza a estrutura primária da proteína que é definida pela sua seqüência de aminoácidos.

A estrutura secundária é consequência da interação de aminoácidos próximos da cadeia polipeptídica. As estruturas secundárias mais estáveis e, portanto, mais freqüentes em proteínas são as α -hélices e as folhas β -pregueadas. Estas estruturas são estabilizadas por pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas.

α -Hélice

No arranjo em hélice, (figura 1.2), a cadeia principal enrola-se na forma de uma espiral. Cada volta desta espiral apresenta 3,6 aminoácidos. Esta estrutura é estabilizada por pontes de hidrogênio intracadeia entre o grupo amina de um aminoácido e o oxigênio da carbonila de um aminoácido distante quatro resíduos. A carbonila (C=O) é paralela ao eixo da hélice e quase em linha direta com o grupamento NH ligado por pontes de hidrogênio.

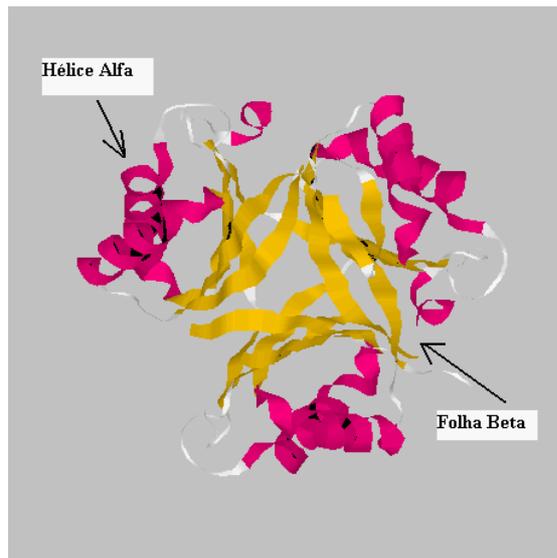


Figura 1.2. Estrutura da proteína GlnB-Hs, folhas β em amarelo e α -hélices em púrpura (RASMOL).

Folha β

Neste tipo de estrutura secundária as cadeias laterais de aminoácidos distantes dois resíduos interagem, pois estarão voltados do mesmo lado da fita β -pregueada. Neste caso, a cadeia principal assume uma conformação em zig-zag. Várias fitas β podem interagir através de pontes de hidrogênio intracadeia formando a folha β . Quando as fitas β nesta folha estão orientadas no mesmo sentido são ditas paralelas e quando os sentidos são contrários são antiparalelas. As folhas β da proteína GLnB-Hs podem ser vistas na figura 1.2, em amarelo.

Na estrutura terciária ocorre interação entre aminoácidos distantes na cadeia polipeptídica podendo formar domínios funcionais. Estas interações podem ser fracas (pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas) ou fortes (pontes de sulfeto).

Uma molécula de proteína pode conter uma única cadeia monomérica ou possuir várias cadeias polipeptídicas que se associam formando uma estrutura polimérica. A interação entre cadeias polipeptídicas caracteriza a estrutura quaternária da proteína. Esta estrutura é

estabilizada por interações fortes ou fracas entre aminoácidos de cadeias polipeptídicas diferentes.

1.2 A proteína GlnB-Hs

A proteína GlnB-Hs é uma proteína globular pertencente à família das proteínas tipo PII (Ninfa, 2000). GlnB é uma proteína transdutora de sinal e participa de uma complexa cascata que controla o metabolismo de nitrogênio em muitas bactérias incluindo a *Herbaspirillum seropedicae*, um microrganismo diazotrofo (Benelli et al., 1997); Souza et al., 1999). Esta bactéria é encontrada em arroz, milho, sorgo, cana de açúcar e abacaxi (Baldani et al, 1986,1992); (Weber et al, 1999); (Pimentel et al,1991).

O mecanismo que regula os padrões de expressão de genes e de enzimas que são necessárias à fixação de nitrogênio em organismos diazotrofos apresenta algumas pequenas variações. Em geral, a proteína NifA é responsável pela transcrição do genes que codificam a nitrogenase, enzima responsável pela conversão de nitrogênio atmosférico em amônia (fixação do nitrogênio) (Postgate, 1982). Por sua vez, a expressão dos genes NifA é regulada pelo sistema Ntr que controla o metabolismo geral de nitrogênio nesses organismos. A proteína GlnB atua controlando a atividade das proteínas do sistema Ntr que depende dos níveis de carbono e nitrogênio do meio externo (Merrick et al., 1995).

Quando há excesso de nitrogênio, GlnB interage com NtrB que catalisa a desfosforilação do ativador de transcrição de genes NtrC-P. Como consequência, ocorre a diminuição da expressão de NifA. Quando os níveis de nitrogênio são baixos, a proteína GlnB é uridililada pela proteína GlnD. GlnB-UMP não interage com NtrB, que nesta forma catalizará a fosforilação de NtrC (ver apêndice A1 para diagrama esquemático), (Ninfa, et al., 1986).

A proteína GlnB-Hs foi purificada e sua estrutura foi determinada por difração de Raios-X (Benelli et al., 2001, 2002). Esta proteína é um trímero de 36 kDa em solução. Um

dos cristais obtidos foi do grupo espacial ortorrômbico (P212121) e a estrutura foi determinada com 2.1Å de resolução.

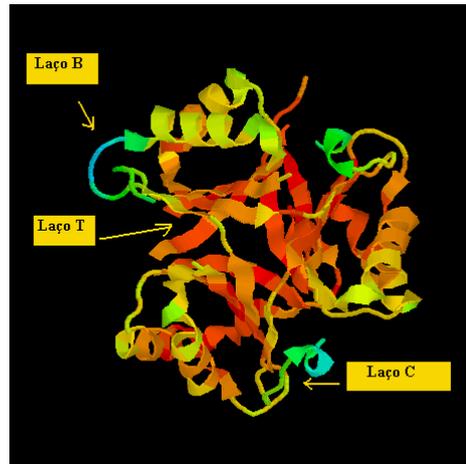


Figura 1.3: Diagrama da proteína GlnB-Hs.

Como ocorre para as demais proteínas tipo PII, os monômeros conservam um duplo motivo: $\beta\alpha\beta$ com uma pequena volta B, (figura 1.3). As maiores diferenças estruturais encontram-se na volta T e C (Benelli et al., 2002). As folhas β do motivo $\beta\alpha\beta$ estão alinhadas no interior da cavidade central formada pela união dos monômeros e as hélices situam-se na periferia da proteína. O interior da cavidade central é hidrofóbico. Entre os monômeros formam-se três cavidades laterais que são constituídas majoritariamente por aminoácidos hidrofílicos.

A face inferior do trímero, por convenção, é a face que possui a volta C. Ela contém principalmente resíduos negativamente carregados. A outra face da proteína também é negativamente carregada, porém menos que a face inferior. As cargas positivas são localizadas na face lateral da proteína, ao redor da volta B.

Como pode ser visto pela figura 1.4(a), a face inferior está mais negativamente carregada (laranja escuro) do que a face superior, figura 1.4(c). A convenção para as cores das cargas é a seguinte: cargas de valor mais baixo (negativa) passariam do vermelho até as

cargas de valor mais alto azul (positiva). As laterais são predominantemente amarelas. O azul corresponde à volta B, onde estão concentradas as cargas positivas.

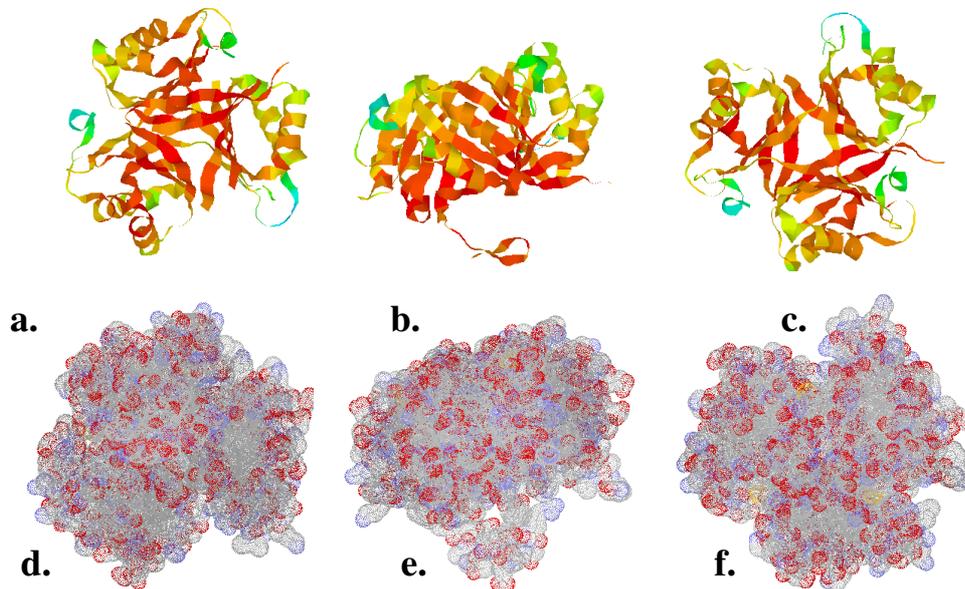


Figura 1.4: Estado de cargas e potencial eletrostático da proteína GlnB-Hs respectivamente. (a). e (d). Face inferior, (b). e (e). Face Lateral. (c). e (f). Face superior. (Imagem e convenção de cores (RASMOL).

$V < -25$	Branco	$-25 < V < -10$	Púrpura	$-10 < V < -3$	Azul	$-3 < V < 0$	Azul claro
$0 < V < 3$	verde médio	$3 < V < 10$	Amarelo	$10 < V < 25$	Laranja	$25 < V$	Vermelho

O potencial eletrostático é calculado usando a lei de Coulomb, levando em conta a carga associada a cada átomo armazenada no arquivo 1HWU pdb da proteína GlnB-Hs depositado no Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>). O código de cores para o potencial dessa vez associa o azul/ branco para valores baixos de potencial (negativo) e vermelho é associado aos valores mais altos de potencial (positivo). A cor predominante é o branco que é associado a valores predominantemente negativos de potencial.

Os resíduos hidrofóbicos alanina (verde médio), valina (púrpura claro), prolina (cinza escuro), glicina (branco), metionina (marrom claro), leucina (verde oliva), estão

situados preferencialmente no interior da proteína, nas folhas β e nas α -hélices, como pode ser observado na figura 1.5.

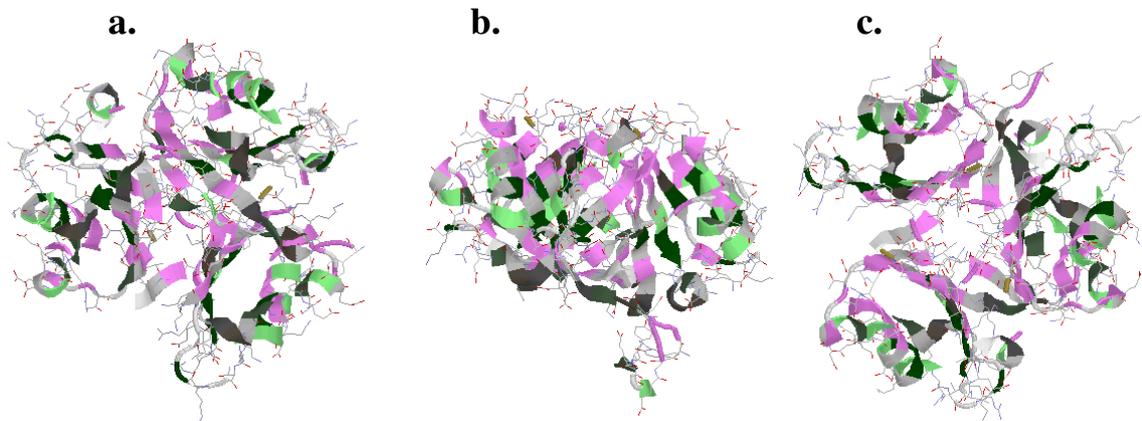


Figura 1.5: Aminoácidos hidrofóbicos. (a). Face inferior (b). Face lateral (c). Face superior.

ALA	Verde médio	VAL	Púrpura claro	PRO	Cinza escuro
GLY	Branco	MET	Marron claro	LEU	Verde oliva

Os resíduos polares situados na superfície da proteína são: tirosina (marrom médio), treonina (laranja escuro), glutamina (salmão escuro), serina (laranja médio), ácido aspártico (rosa escuro), ácido glutâmico (marrom escuro), arginina (azul escuro), lisina (azul real). A figura 1.6(a) mostra que a face inferior possui predominantemente arginina e lisina e a face superior, (figura 1.6(c)), predominantemente ácido glutâmico e glutamina. Estes resíduos polares são responsáveis pela interação da proteína GlnB-Hs com a superfície de silício, durante a adsorção.

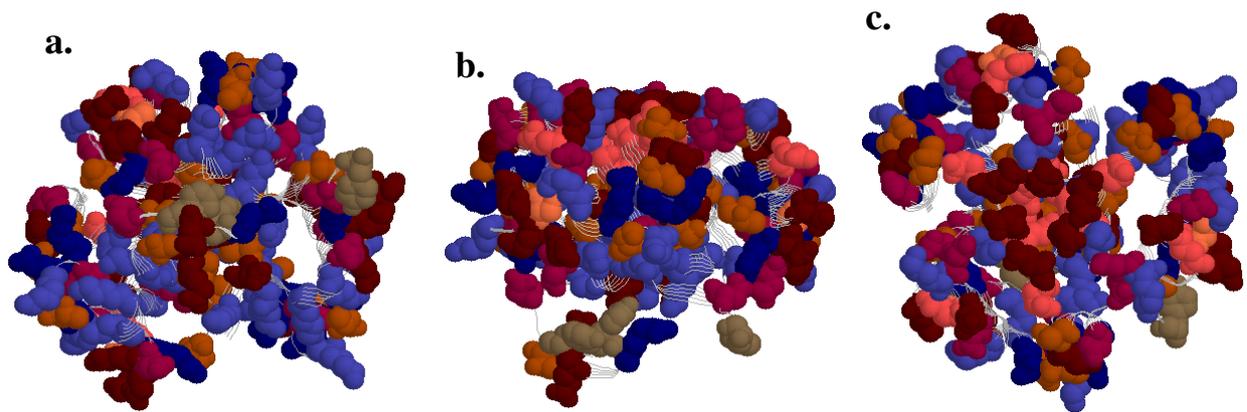


Figura 1.6: Aminoácidos polares superficiais: (a). Face inferior (b). Lateral (c). Face superior.

TYR	Marrom médio	THR	Laranja escuro	GLN	Salmão escuro	SER	Laranja médio
ASP	Rosa escuro	GLU	Marrom escuro	ARG	Azul escuro	LYS	Azul real

1.3 Descrição da superfície de Silício

A necessidade de produzir superfícies de silício livres de óxido para a indústria eletrônica levou ao estudo do comportamento da cinética de oxidação da camada de óxido e tratamentos químicos adequados para se obter superfícies de silício terminadas com hidrogênio (Hirose et al., 1991).

O tratamento químico usando HF (ácido fluorídrico) remove a camada de óxido natural das bolachas de silício. Após este tratamento, a superfície de silício é terminada em uma ligação Si-H, que é mais estável do que a superfície terminada em Si-Si, sendo responsável pela passivação da superfície (Higashi et al., 1989).

A remoção da camada de óxido do silício torna a superfície hidrofóbica. Uma pequena quantidade de flúor permanece após o tratamento químico. Esta quantidade vai depender da concentração de HF e do tempo de lavagem (Hirose et al., 1991). Uma superfície

de silício limpa, livre de contaminação orgânica, mas preservando a camada de óxido, pode ser obtida mergulhando o silício em uma solução fervente de caráter ácido por 10 minutos de $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{HCl}$ (86:11:3) e depois em uma solução de caráter básico $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_4\text{OH}$ (4:1:1) por outros 10 minutos (Hirose et al., 1991). Como a camada de óxido não é retirada, a superfície de silício consiste em ligações de siloxano (Si-O-Si) que rapidamente são transformadas em (Si-OH) ao contato com a água ou atmosfera. Esta superfície assim terminada é naturalmente hidrofílica (Marsh, 2002; Okorn-Schmidt, 1999).

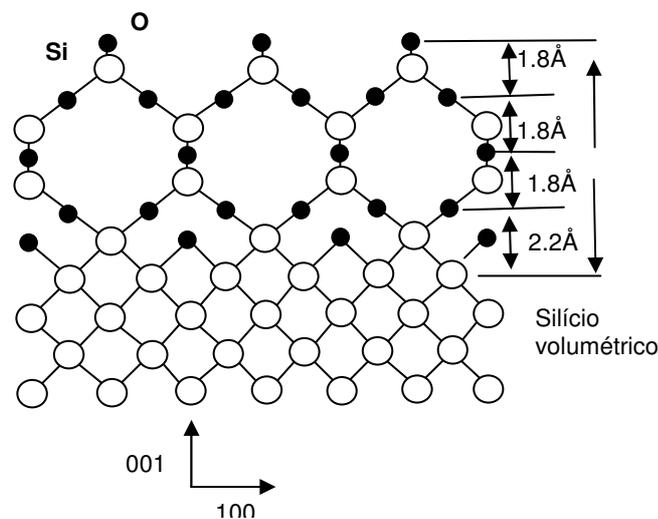


Figura 1.7: Modelo clássico estrutural proposto para a camada formada de SiO_2 no silício (111). (Hirose et al., 1991)

A espessura da camada de óxido de silício não depende da dopagem e é formada paralela à superfície de silício (Hirose et al., 1991). O modelo estrutural proposto para a camada saturada de óxido para Si (100) é visto na figura 1.7. A oxidação preferencialmente começa em terraços nos sítios ativos e se propaga ao longo da superfície. A taxa de crescimento da camada de óxido depende da orientação cristalográfica (Hirose et al., 1991). Ela é mais rápida em silício (100), provavelmente devido a uma probabilidade maior de penetração do oxigênio, pois a vacância entre átomos de silício nesta orientação é igual a $3,08\text{Å}$ e o átomo de oxigênio possui um raio atômico de $2,71\text{Å}$ (Hirose et al., 1991).

A velocidade de formação da camada de óxido depende da rugosidade final da superfície e da concentração de flúor. Superfícies rugosas se oxidam mais facilmente do que superfícies lisas. Diminuição da cobertura de flúor favorece a oxidação. Aparentemente, somente a taxa de oxidação e a espessura da camada final estão correlacionadas com orientação cristalográfica. A espessura é menor para o Si (111) e está em torno de 3 Å, sendo que no Si (100) ela vale aproximadamente 8 Å (Hirose et al., 1991). A estrutura amorfa da camada de óxido final é a mesma, para ambas as orientações.

1.4 Correlação do estado de carga superficiais da proteína GlnB-Hs e o estado de hidrofobicidade da superfície do silício

Durante a adsorção, quando a proteína GlnB-Hs entra em contato com a superfície de silício oxidado hidrofílico, a interação ocorrerá preferencialmente entre as superfícies hidrofílicas da proteína que se situam na sua superfície (face superior ou face inferior) e o óxido de silício. Se a superfície de silício é hidrofóbica, a proteína tenderá a interagir com suas faces laterais (menos hidrofílicas) ou com a face menos eletronegativa, no caso a face superior (ver figuras 1.4 e 1.6).

Capítulo 2

Adsorção de proteínas em superfícies sólidas

Este capítulo estabelece alguns parâmetros que permitem a análise da adsorção de camadas no método "spin-coating", e finaliza com uma aplicação para a proteína GlnB adsorvida sobre silício utilizada neste trabalho. No entanto, o modelo utilizado não é um modelo completo para explicar as diversas formas observadas como anéis e filamentos que serão vistos no próximo capítulo.

2.1 Introdução

O fenômeno de adsorção de proteínas em superfícies sólidas vem atraindo atenção por várias décadas. Diferentemente dos estudos de adsorção de polímeros que progrediram bastante, o processo de adsorção de proteínas permanece ainda um campo aberto, onde existem muito mais questões do que respostas (Hlady, 1996). O motivo deste quadro é que a adsorção de proteínas em interfaces é um fenômeno complexo que depende de vários fatores: efeitos de interação da proteína com a superfície, efeitos de interação da proteína com a proteína, efeitos de estabilidade conformacional da proteína, efeitos de interação da proteína com o solvente. Apesar da complexidade, o estudo do comportamento das proteínas durante a adsorção pode ser simplificado em certos casos. Proteínas frequentemente podem se comportar como copolímeros ou como partículas coloidais e, por isso, deveriam estar sujeitas à mesma termodinâmica (Malmsten, 1998).

A maioria das investigações está fundada em interfaces sólido-líquido. O motivo principal é o fato de, em geral, considerar-se adsorção da proteína em seu meio fisiológico normal. Estas investigações permitiram o desenvolvimento de biosensores, testes imunológicos e sistemas de transporte de medicamentos (Hlady, 1996). O processo de adsorção da proteína GlnB-Hs por "spin-coating" é um processo complexo que envolve a

adsorção em interfaces que mudam com o tempo. A interface líquida tende a desaparecer (evaporação) e interface sólido-ar será a interface final. Naturalmente, inúmeros fatores que influenciam a adsorção de proteína em interface sólido-líquido estarão presentes. No entanto, devido ao processo de evaporação da camada líquida, outros fatores mais complexos contribuirão para a formação da camada de proteína. Nos próximos parágrafos serão descritos primeiramente os fatores que promovem a adsorção de proteínas em solução, seguidos dos fatores que influenciam a formação da camada de proteína e sua estrutura. Com o objetivo de possibilitar uma análise fenomenológica, será utilizado um modelo de formação para a camada de proteínas depositadas por "spin-coating" (Adachi, et al., 1977,1996), (Nagayama, 1996). Este modelo é baseado nas forças eletrostáticas, de Van der Waals conjuntamente com as forças de capilaridade e o processo de evaporação.

2.2 Visão geral das interações que promovem a adsorção em meio líquido

Interação proteína-superfície

A interação da proteína com a superfície depende principalmente dos seguintes fatores: a carga líquida da proteína, a ocorrência de domínios hidrofóbicos na superfície da proteína, sua distribuição de cargas, tamanho da proteína e domínio de influência das interações eletrostáticas. Em regra geral, mas com inúmeras exceções, as proteínas tendem a ser adsorvidas mais fortemente em superfícies hidrofóbicas (Norde, 1986). Esta interação pode provocar mudanças conformacionais na proteína dependendo se ela está sendo adsorvida em uma superfície hidrofílica ou hidrofóbica.

Os efeitos eletrostáticos também exercem um papel importante na interação proteína-superfície levando as proteínas a se dividirem, de uma forma simplificada, em duas categorias de acordo com o seu comportamento eletrostático: proteínas lábeis, menos estáveis e rígidas, mais estáveis.

Proteínas lábeis

As proteínas macias apresentam mudanças conformacionais grandes durante a adsorção. A adsorção destas proteínas é governada por forças não eletrostáticas: ganho entrópico com a mudança estrutural. Elas tendem a se adsorver em qualquer tipo de superfície (Nakanishi, et al., 2001).

Proteínas rígidas

Estas proteínas não apresentam mudanças conformacionais durante a adsorção ou, se apresentarem, elas serão negligenciáveis. Neste caso, a adsorção tende a ser governada por forças eletrostáticas com o comportamento semelhante a sistemas coloidais (Malmsten, 1998).

Interação proteína-solvente

Quando em solução, o balanço delicado de inúmeras interações entre a proteína e a solução determinará sua estrutura. Assim, alterações nas condições do solvente podem alterar a estrutura da proteína. Em geral, efetuando-se uma mudança drástica na solução, por exemplo, introduzindo uréia ou hidrocloreto de guanidino a proteína sofrerá desnaturação.

A desnaturação é um processo onde as moléculas de proteínas que estão em um estado biologicamente ativo, passam para um estado inativo devido a alteração de sua estrutura tridimensional (Branden et al., 1998).

A adsorção também varia com o pH da solução. Por exemplo, a adsorção é máxima perto do ponto isoelétrico. Se a carga líquida da proteína é diminuída, a interação proteína - proteína se torna mais favorável, diminuindo a interação proteína-solução, e favorecendo a adsorção. Por outro lado, para proteínas moderadamente estáveis, o decréscimo de carga provocará instabilidade estruturais ou mesmo mudanças estruturais.

Interação proteína–proteína

Para homopolímeros e copolímeros a quantidade adsorvida aumenta com o aumento do peso molecular. No entanto, no caso das proteínas, esta propriedade é difícil de se verificar, pois além de ser difícil mudar o peso molecular de uma proteína, também é difícil isolar este fenômeno de influências superficiais (Malmsten, 1998).

2.3 Estabilidade conformacional da proteína

A estabilidade estrutural da proteína influencia a estrutura da camada formada durante a adsorção, a força com que a proteína se liga ao substrato e o estado de adsorção. Esta influência está relacionada com o fato da proteína em solução possuir uma estrutura restrita. Durante a adsorção, pode haver perda de uma fração de sua estrutura ordenada e o conseqüente ganho conformacional entrópico, fato que influenciará diretamente a estrutura da camada adsorvida e a força de adsorção.

2.4 Estrutura da camada adsorvida

A estrutura formada durante a adsorção varia consideravelmente para sistemas diferentes e pode ser classificada de acordo com a forma da estrutura e com a estabilidade em estrutura tipo polímero, estrutura de partículas rígidas coloidais e hastes rígidas. Dependendo da estrutura e da estabilidade, camadas diferentes podem ser formadas.

Proteínas flexíveis do tipo polímero

Proteínas com comportamento do tipo polímero possuem cadeias longas e grande peso molecular e costumam se comportar como sistemas simples de polímeros durante a adsorção: a estrutura das camadas formadas sofre variações contínuas e se as condições eletrostáticas da solução são modificadas, variações estruturais importantes podem ocorrer (Malmsten, 1998).

Proteínas com comportamento de partículas coloidais

Estas proteínas têm um comportamento parecido com partículas coloidais, ou seja, em muitos estudos já efetuados (Malmsten, 1998), partículas coloidais se depositam influenciadas por duas interações principais: interações eletrostáticas e de Van der Waals. Elas apresentam uma taxa de deposição crescente, quando a interação eletrostática atrativa aumenta ou a repulsiva diminui. No entanto, diferentemente das partículas coloidais, no caso das proteínas, as interações hidrofóbicas devem ser levadas em conta (Malmsten, 1998).

Se a proteína for considerada como partícula coloidal, a adsorção poderá provocar pouca ou nenhuma alteração conformacional. Neste caso, as orientações interfaciais e a informação da quantidade de proteína adsorvida, dependendo do tipo, da densidade de empacotamento e da forma da proteína, podem ser extraídas e preditas através do espaçamento interplanar (Haggerty, et al., 1993).

Proteínas de lábeis

As proteínas nesta categoria terão a adsorção e o rearranjo estrutural dependente de vários parâmetros tais como temperatura, estabilidade estrutural, interação interfacial, concentração e da interação com as vizinhas mais próximas. Na verdade, cada proteína terá um comportamento similar dentro destas categorias descritas, mas com especificidades a cada uma delas. Mesmo em sistemas simples como o de proteínas que apresentam um caráter coloidal, existem peculiaridades no comportamento de adsorção, como por exemplo: transições no tipo de conformação sobre a interface de adsorção preferencialmente com a face lateral para face para cima, agregação dependendo do pH, adsorção de multicamadas dependente da concentração, perda de atividade das camadas mais próximas da interface (Malmsten, 1998).

2.5. Formação da camada adsorvida

Se não houver nenhum efeito de ordem orientacional e também nenhuma mudança estrutural relacionada com a interação com a superfície, o processo de formação da camada de proteína será semelhante ao de um sistema coloidal com um perfil de distribuição radial dependendo das forças de interação entre partículas (Johnson, et al., 1996).

O modelo geralmente utilizado é o RSA (Random sequential adsorption- adsorção seqüencial aleatória). Neste modelo, que descreve a adsorção de partículas coloidais, o processo de adsorção é irreversível e as partículas não se interpenetram (Adamczyk, et al. 1990). Este modelo, portanto, prevê somente a configuração de monocamadas de proteínas lado a lado sem interpenetração. Existem modificações desse modelo que levam em conta rearranjos da camada de proteína, ou seja, o rolamento de partículas para acessar posições inocuadas (Schaaf, et al., 1989), interação entre partículas, etc. No entanto, este modelo só é satisfatório para alguns sistemas de proteínas. A formação da camada adsorvida na verdade, também envolve fatores muito mais complexos tais como, interações repulsivas de longo alcance, aglomeração, formação de multicamadas (Malmsten, 1998).

2.6 Formação do filme de proteína durante a deposição por "spin-coating"

A formação do filme de proteína no substrato sólido sofrerá a influência de diversas forças que, em conjunto, favorecerão a formação de um filme fino organizado. As forças que governam a formação de arranjos de proteína revelam que o mecanismo de ordenamento dependerá do compromisso entre a velocidade de rotação do substrato, do processo de evaporação, da polaridade da proteína e do substrato. A velocidade de rotação do substrato e a taxa de evaporação governarão o tempo de vida do filme fino "secundário" previsto pela teoria DLVO(Derjaguin-Landau, Verwey-Overbeek), que é essencial ao processo de organização do arranjo de proteína (Adachi, et al., 1996). Por outro lado, as interações

proteína-substrato e proteína-proteína também influenciarão o tipo de deposição (face para cima, face de lado).

"Spin-coating" é uma técnica usada para a preparação de filmes finos uniformes. Ela possui inúmeras aplicações na indústria de polímeros, na preparação de filmes para pintura, verniz, fabricação das telas de televisão (Acrivos, et al., 1960), camadas refletoras em instrumentos óticos (Britten, 1991), na indústria microeletrônica, na fabricação de camadas de polímeros em bolachas de silício, na preparação de filmes finos supercondutores (Lawrence, et al., 1991), etc.

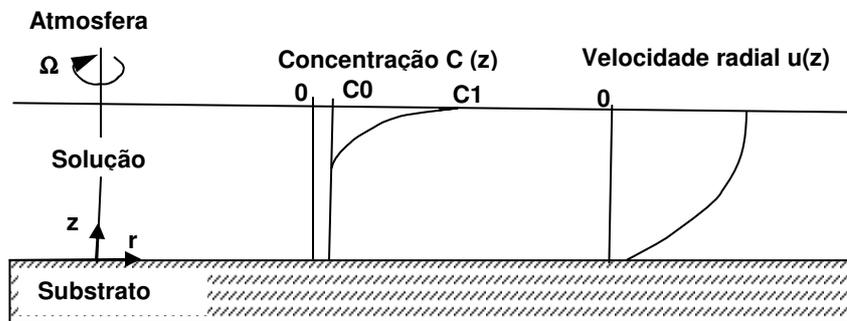


Figura 2.1: Diagrama do processo de "spin-coating" mostrando o perfil da velocidade radial e da concentração durante a fase 2 (Lawrence, 1988).

A formação da camada de filme fino durante a deposição por "spin coating" é descrita a seguir (Lawrence, et al., 1991).

O material que formará a camada final sobre o substrato está dissolvido em um solvente (solução). Uma gota com volume pré-determinado desta solução é depositada no centro do substrato e este é levado a girar em alta velocidade. O fluxo da solução possui uma direção radial do centro para as bordas do substrato formando uma camada de solução uniforme da qual o solvente evaporará até desaparecer, a partir da região mais próxima da superfície livre. À medida que a espessura de fluido diminui, tornando-se comparável à camada de proteína, há um aumento da viscosidade e nas regiões onde não há mais solvente suficiente, o fluxo de líquido cessa. A partir daí, a evaporação do solvente residual será o

principal efeito até que o filme atinja um estado uniforme, onde não existirá mais nem solvente, nem fluxo.

Este processo pode então ser resumido em três fases (Lawrence, 1988): a primeira fase transiente é dominada por efeitos inerciais, tensão superficial e formação de uma fina camada concentrada na superfície livre. Em geral, esta fase dura em torno de 1 ou 2 segundos. Na segunda fase, o fluido é considerado newtoniano, a concentração da camada perto da superfície livre gradualmente aumenta. Esta variação de concentração ocorre devido à evaporação do solvente. A terceira fase se inicia devido à variação da concentração de soluto, o fluxo cessa e a evaporação é o processo dominante. O processo termina quando a concentração é uniforme em todo o filme e a viscosidade é suficientemente alta para impedir o fluxo. O tempo total requerido para as três fases é rápido. Porém, no presente trabalho, foram necessárias tipicamente 24h para que o solvente residual evaporasse possibilitando a análise das amostras com o microscópio de força atômica depois de efetuado o depósito. Aparentemente, as amostras não se estabilizam em tempos menores, tornando impossível à aquisição de imagens antes desse tempo de espera.

O modelo proposto por (Lawrence, 1998) para "spin coating" prevê uma camada final h_f , tempo final T_f e taxa de evaporação e do solvente para o processo dada pelas relações respectivas:

$$h_f \approx KC_0(D_0\nu_0)^{1/4}\Omega^{-1/2} \quad (2.6.1).$$

$$T_f \approx \frac{1}{4}\Omega^{-1}\left(\frac{\nu_0}{D_0}\right)^{1/2} \quad (2.6.2).$$

$$e = \Omega h_0 e^* \left(\frac{D_0}{\nu_0}\right)^{1/2} \quad (2.6.3).$$

A camada dependerá da velocidade angular de rotação do substrato Ω e da concentração inicial do polímero C_0 , do coeficiente de difusão inicial do polímero D_0 e da viscosidade cinemática ν_0 , onde e^* é um parâmetro de evaporação adimensional, h_0 é a altura da camada inicial de fluido. K é um parâmetro adimensional que possui ordem de grandeza unitária; o valor dependerá do modelo adotado para difusividade e viscosidade do soluto (Lawrence, 1988)

A taxa de evaporação é determinada pela difusividade da solução, de forma a manter uma concentração constante C de equilíbrio na camada livre. Ela é proporcional a Ω e decai monotonicamente com o tempo.

Considerando que o comportamento da proteína seja semelhante ao de partículas coloidais, o arranjo de proteínas será formado durante a evaporação do filme eletrolítico, ou seja, durante a terceira fase do processo de "spin-coating". Nesta fase, a evaporação é o processo dominante e o filme eletrolítico terá a sua condição variando com o tempo durante a deposição. Este fenômeno é consequência da anisotropia criada pela distribuição eletrolítica da solução e é causada pela eletronegatividade de dois materiais na interface, pois as duas superfícies que contém a solução eletrolítica estão carregadas.

Se por exemplo, as proteínas são negativamente carregadas, elas serão repelidas das duas superfícies e buscarão uma posição estável, favorecendo a formação de uma camada fina de proteínas aprisionadas perto da interface líquido-substrato ou líquido-ar.

Para o sistema descrito acima, a teoria DLVO (Derjaguin-Landau, Verwey-Overbeek) prevê a criação de um potencial eletrostático e de Van der Waals de interação entre a interface e as partículas carregadas na direção vertical (Israelachvili, 1992), (Adachi, et al. 1997), (Adachi, 1996). Este potencial, caracterizado por um mínimo secundário, sempre

estará presente na interface ar-líquido de um filme fino sobre substrato sólido e também na interface ar-líquido, de líquidos.

Durante o processo de evaporação, o perfil do potencial resultante se modificará de acordo com a concentração do eletrólito. É provável que o arranjo ordenado de proteínas esteja ligado ao "tempo de vida" deste mínimo secundário. Quando a concentração de eletrólito aumenta durante a evaporação do solvente e a secagem do filme de proteína, o potencial conseqüentemente variará nessa situação. O tempo de vida deste mínimo secundário, portanto, está intimamente ligado a taxa de evaporação.

Ao contrário da interação de duas camadas, a interação de Van der Waals não é sensível nem à variação da concentração de eletrólitos, nem ao pH (Israelachvili, 1992). Ela pode ser, portanto, considerada em uma primeira aproximação como sendo fixa, devendo sempre exceder a repulsão da dupla-camada a distâncias pequenas. Ela é uma interação proporcional $-1/D^N$, ao contrário da interação da dupla-camada que é finita ou aumenta lentamente quando D tende para 0, onde D é a distância proteína- superfície.

O potencial total de interação da partícula carregada será dado pelo potencial eletrostático e pelo potencial de Van der Waals (Adachi, et al., 1997), (Adachi, 1996):

$$V(x) = \phi(x) + W(x) \quad (2.6.4).$$

onde $\phi(x)$ e $W(x)$ são o potencial eletrostático e o potencial de Van der Waals, respectivamente, descritos pelas seguintes relações (Adachi, et al., 1997), (Adachi, 1996):

$$\phi(x) = \left[\frac{q}{\epsilon_0 \epsilon_r \kappa (e^{\kappa h} - e^{-\kappa h})} \left[(\sigma_1 e^{\kappa h} - \sigma_2) e^{-\kappa x} + (\sigma_1 e^{-\kappa h} - \sigma_2) e^{\kappa x} \right] \right] \quad (2.6.5).$$

$$W(x) = -\left(\frac{R}{6} \right) \left(\left[\left(\frac{A_1}{x} \right) + \left(\frac{A_2}{h-x} \right) \right] \right) \quad (2.6.6).$$

onde σ_i é a densidade de carga por unidade de área e A_i é a constante de Hamaker na interface. A partícula possui uma carga q e diâmetro R . A espessura do filme é h . κ é o parâmetro de Debye dado pela seguinte expressão:

$$\kappa = \sqrt{\left(\frac{2nZ^2e^2}{\epsilon_0\epsilon_r k_b T}\right)} \quad (2.6.7).$$

onde n é a densidade de números de íons longe da interface, Z é a carga iônica, e é a carga elétrica, ϵ_0 permissividade do vácuo, ϵ_r é a constante dielétrica relativa da água, k_b é a constante de Boltzmann e T é a temperatura.

Quando se deriva a equação do potencial total de interação da partícula carregada, a derivada do potencial será caracterizada por dois mínimos: o primário, (figura 2.2), responsável pelo contato entre a partícula coloidal e a superfície, e o mínimo secundário, (figura 2.2), característico de um filme fino eletrolítico virtual (filme secundário de altura h_n , figura 2.3), que apareceria no início do processo de evaporação e desapareceria no final.

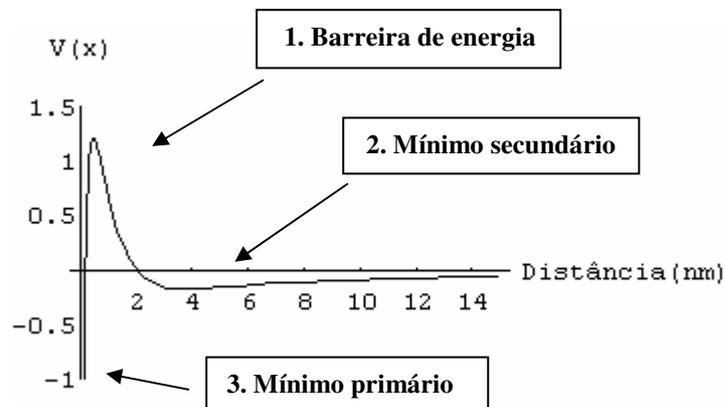


Figura 2.2: Características principais do potencial de interação total $V(x)$ expresso em $(0,62V(x) \text{ eV})$ da partícula coloidal carregada (proteína GlnB-Hs) em função da distância a superfície do substrato x expressa em nm. 1.Barreira de potencial que as partículas devem vencer para atingir o equilíbrio termodinâmico mais estável em 3. mínimo primário, se não, elas poderão permanecer no 2. mínimo secundário (mais instável), ou se dispersar na solução. Simulação para o caso de $\text{pH}=11$ e carga superficial da proteína de $-30,11 \times 10^{-19} \text{ C}$.

Em sistemas coloidais, mesmo que o mínimo primário seja aquele que fornece ao sistema um equilíbrio termodinâmico mais estável, para atingí-lo é necessário que as partículas vençam uma barreira de potencial. Esta barreira, mostrada na figura 2.2, pode ser muito alta para que as partículas consigam vencê-la durante um período de tempo finito. Se isso acontece, duas possibilidades poderiam ocorrer: as partículas se posicionariam no mínimo secundário (mais fraco e instável) ou permaneceriam totalmente dispersas na solução (Israelachvili, 1992).

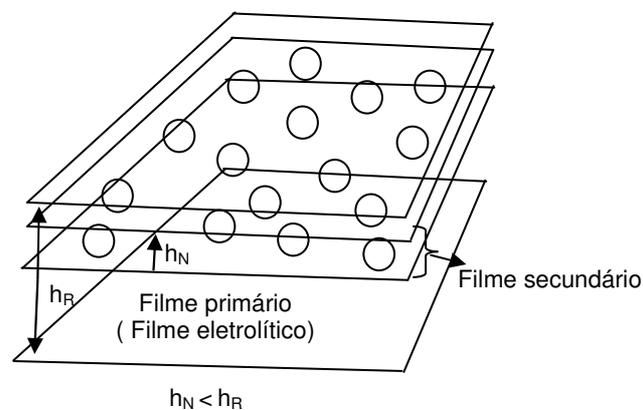


Figura 2.3: Diagrama de formação do filme secundário (virtual) de altura h_N . O tempo de vida deste filme virtual estaria relacionado com arranjos 2D ordenados de proteínas (Adachi et al., 1997).

Quanto maior o tempo de vida do mínimo secundário, maior a probabilidade do ordenamento das partículas de proteínas durante a evaporação do filme fino (Adachi, et al., 1997), (Adachi, 1996). O tempo de vida deste mínimo estaria relacionado com a carga superficial da proteína, com o pH da solução e com a umidade do ambiente. Quanto mais lento o processo de evaporação, quanto maior o pH e maior a carga superficial da proteína, maior o "tempo de vida" do mínimo secundário e maior a probabilidade de ordem. O gráfico da figura 2.2 mostra uma simulação do potencial de interação da partícula carregada (proteína GlnB-Hs) em função da densidade de íons longe da interface.

2.7 Simulação para proteína GlnB-Hs

O ponto isoelétrico da proteína foi determinado usando os valores de pK da seqüência de aminoácidos da proteína GlnB-Hs com o programa IEP (ponto isoelétrico) disponível na página web: <http://bioweb.pasteur.fr>. O resultado é apresentado na figura 2.4 em função do pH e da carga da proteína. A simulação indica um ponto isoelétrico correspondente ao pH 5,9.

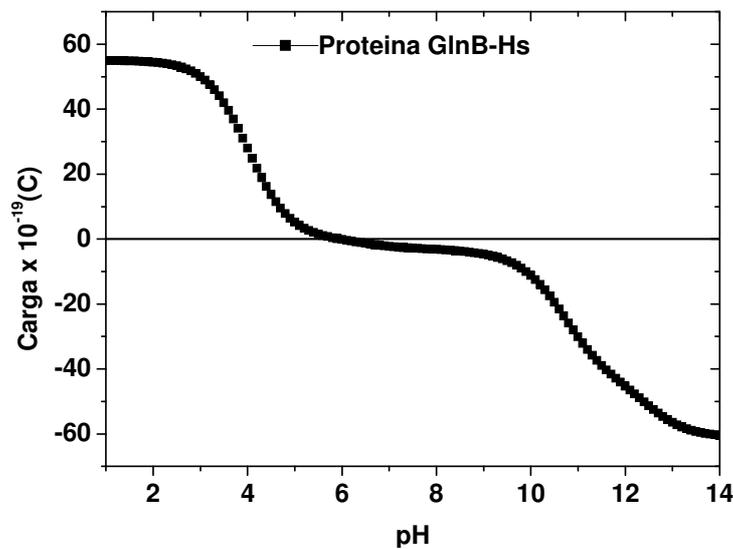


Figura 2.4: Carga superficial da proteína em função do pH da solução tampão, ponto isoelétrico correspondendo ao pH = 5.9.

Caso 1: Considera-se o pH = 8 da solução normalmente utilizada durante a deposição. Os valores de entrada da simulação foram: σ_1 e σ_2 iguais a $-0,16 \text{ C/m}^2$, A_1 e A_2 iguais a $1 \times 10^{-19} \text{ J}$, $R = 5 \text{ nm}$, $\epsilon_r = 80$, $\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$, $Z=1$, $e = 1,6 \times 10^{-19} \text{ C}$ e $K_b T$ igual a $4,1 \times 10^{-21} \text{ J}$, $c = 0,05 \text{ Mol}$ de NaCl, densidade de íons I é igual a $I = nc$, $n = 6 \times 10^{26}$ é fator de conversão para se obter a densidade de íons em Mol/m^3 de íons de valência Z . A carga superficial da proteína Glnb-Hs vale $q = -3,2 \times 10^{-19} \text{ C}$ para pH = 8. A altura adotada para o filme eletrolítico foi 100 nm, (figura 2.5).

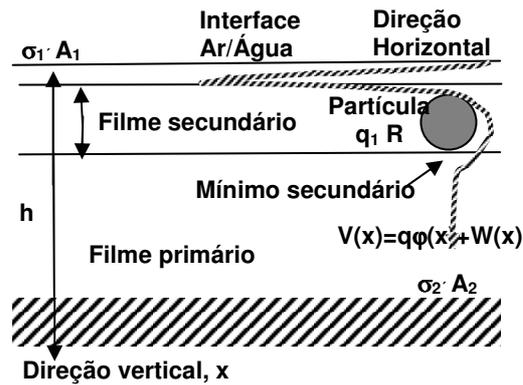


Figura 2.5: Diagrama esquemático mostrando a geometria do filme fino depositado e os parâmetros principais da simulação. (Adachi, et al., 1997).

Esta situação simula o potencial em condições normais de trabalho. A deposição da proteína é realizada em condições onde há adesão da proteína na superfície de silício devido a este mínimo primário (Israelachvili, 1992). O fator preponderante para isto ocorrer é a diminuição do potencial da superfície devido à concentração de NaCl, que promove a diminuição da repulsão da dupla-camada de íons.

Como pode ser visto na figuras 2.6.(a) e 2.6(b), o mínimo primário ocorre perto da superfície do silício.

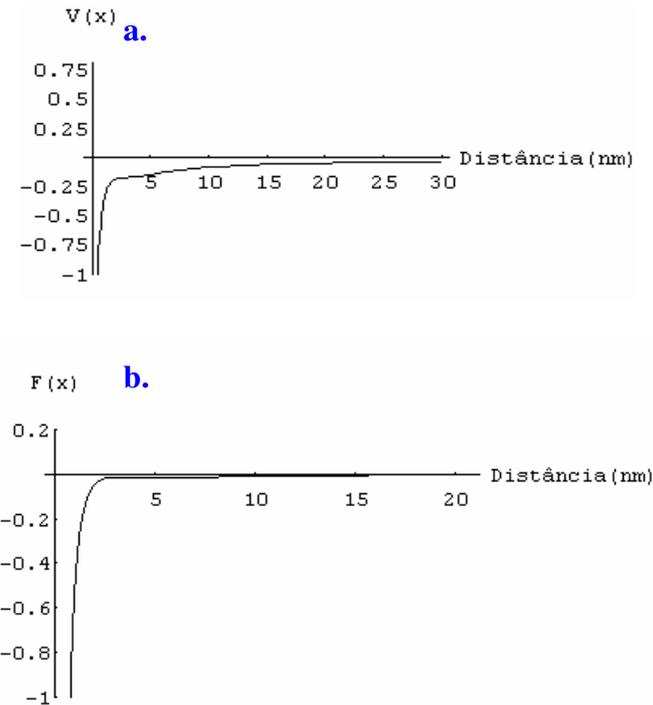


Figura 2.6: **(a)**. Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62 V(x) \text{ eV})$ contra a distância expressa em nm para a interação DLVO no caso da deposição usual utilizada no trabalho, a densidade de íons inicial é de $I=0,05n$, estimando uma camada de filme eletrolítico de 100 nm. **(b)**. Força de interação eletrostática expressa em $(10^{-10} F(x) \text{ N})$ correspondente.

Caso 2: Consideram-se as mesmas condições do caso 1, exceto que a solução tampão inicial terá uma densidade de íons igual a $I=0,01n$ e esta variará até uma concentração final, devido à evaporação de $I=0,05n$.

No início do processo de evaporação, com a densidade de íons igual a $I=0,01n$, caso (A), (figuras 2.7 (a') e 2.7 (b')), as partículas estariam em 'equilíbrio cinético' devido ao mínimo secundário (Israelachvili, 1992).

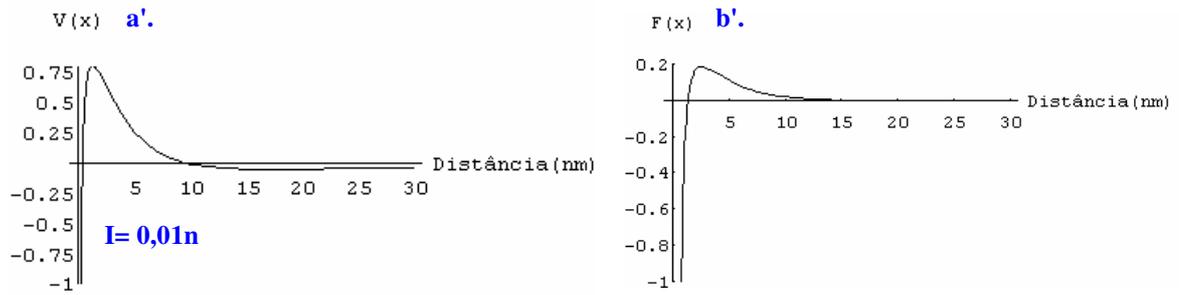


Figura 2.7.: Caso (A):(a'). Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62 V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que a densidade de íons é de $I=0,01n$, camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. (b'). Força de interação eletrostática expressa em $(10^{-10} F(x) \text{ N})$ correspondente.

Com o aumento da densidade de íons para $I = 0,02n$, caso (B), como mostra figuras 2.8 (a') e 2.8 (b'), devido ao mínimo secundário as partículas coloidais estariam aglutinando lentamente.

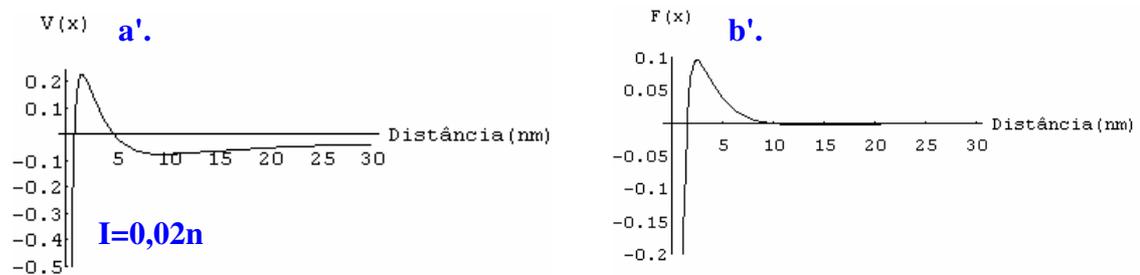


Figura 2.8: Caso (B): (a'). Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que a densidade de íons é de $I=0,02n$, com uma camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. (b'). Força de interação eletrostática expressa em $(F(x)10^{-10} \text{ N})$ correspondente.

No caso (C), $I=0,03n$, (figuras 2.9 (a') e (b')), teríamos a 'concentração crítica' de aglutinação. Nesta concentração, as partículas coloidais aglutinariam rapidamente.

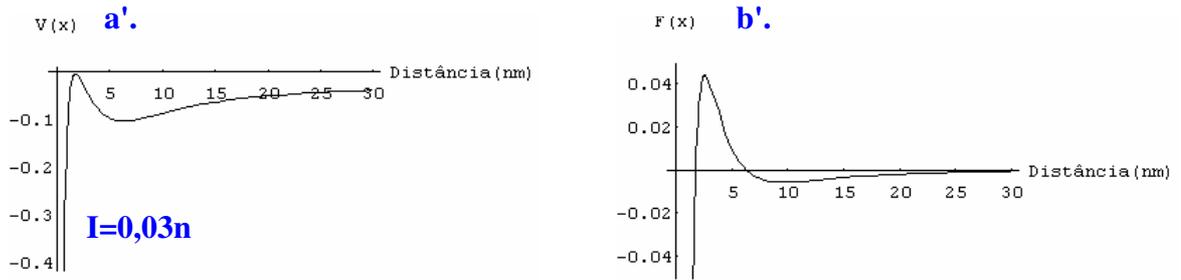


Figura 2.9: Caso (C): (a'). Gráfico do potencial de interação em $(0,62 V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,03n$, camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. (b'). Força de interação eletrostática em $(F(x)10^{-10} \text{ N})$ correspondente.

A partir da concentração dos casos (D e E), $I = 0,04n$ e $I = 0,05n$, (figuras 2.10 (a'), 2.10 (b'), 2.10 (c') e 2.10 (d')), as partículas coloidais e superfícies coalesceriam:

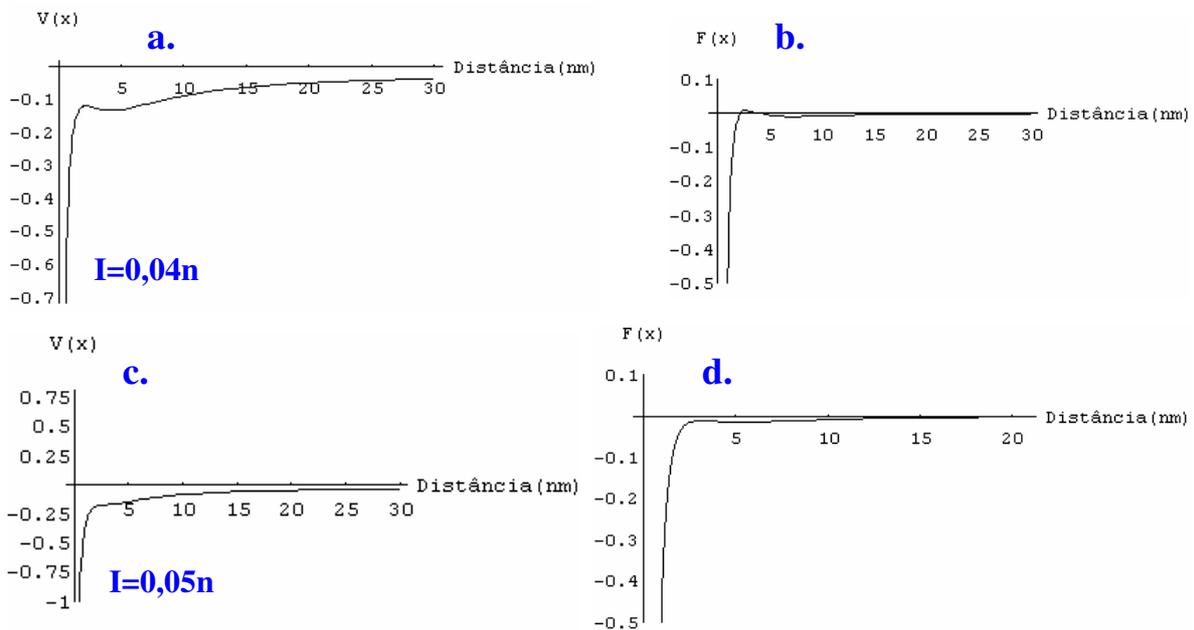


Figura 2.10: Casos (D, E) respectivamente: (a'). Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62 V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,04n$, camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. (b'). Força de interação eletrostática expressa em $(F(x)10^{-10} \text{ N})$ correspondente. (c'). Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62 V(x) \text{ eV})$ contra distância nm no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,05n$. (d'). Força de interação eletrostática expressa em $(F(x)10^{-10} \text{ N})$ correspondente.

O mínimo secundário com a carga líquida da proteína de $-3,2 \times 10^{-19} \text{ C}$ persistiu até uma densidade de íons de $I = 0,045n$. Com o aumento da densidade de íons, o perfil do potencial tende a se modificar com o tempo, a barreira de potencial tende a decrescer, como

pode ser visto pelas figuras 2.10(b) e 2.10(d). A existência desse mínimo promoveria o ordenamento na vertical de partículas que interagem repulsivamente.

Caso 3: Consideram-se as mesmas condições do caso 1, exceto que a solução tampão inicial terá uma densidade de íons $I = 0,01n$, e esta variará até uma concentração final de $I = 0,5n$, devido à evaporação. Considera-se o pH da solução igual a 11, maior do que o utilizado durante a deposição, o que corresponde a uma carga superficial da proteína de $-30,11 \times 10^{-19} C$.

No início do processo de evaporação, com a densidade de íons igual a $I = 0,01n$ e até o estado de densidade de íons igual a $I = 0,05n$, as superfícies se repelem fortemente e partículas coloidais (proteínas) estariam 'estáveis'. Caso (A), (figuras 2.11(a') e 2.11(b')) (Israelachvili, 1992).

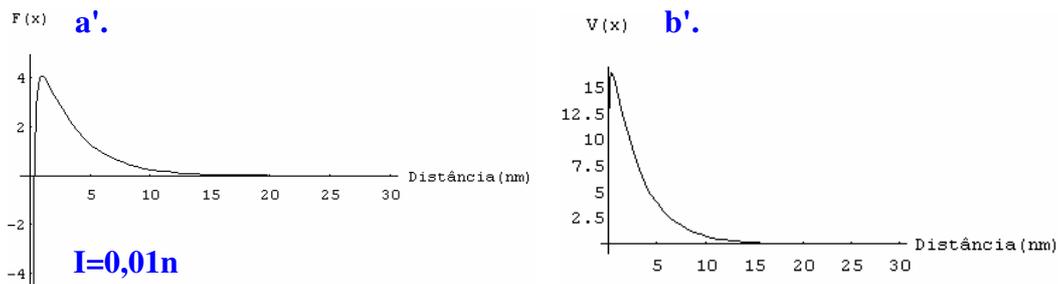


Figura 2.11: Caso (A): (a'). Gráfico do potencial de interação $V(x)$ expressa em $(0,62 V(x) eV)$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que densidade de íons é de $I = 0,01n$, carga superficial da proteína $-30,11 \times 10^{-19} C$, camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. (b'). Força de interação eletrostática expressa em $(F(x) 10^{-10} N)$ correspondente.

Quando a solução atinge a concentração $I = 0,05n$ até a concentração $I = 0,2n$, casos (B e C), durante a evaporação, (figuras 2.12 (a'), 2.12 (b'), 2.12 (c'), e 2.12(d')), as superfícies entram em equilíbrio cinético no mínimo secundário, se este for profundo o suficiente. Nesta situação, as partículas coloidais permaneceriam "cineticamente" estáveis.

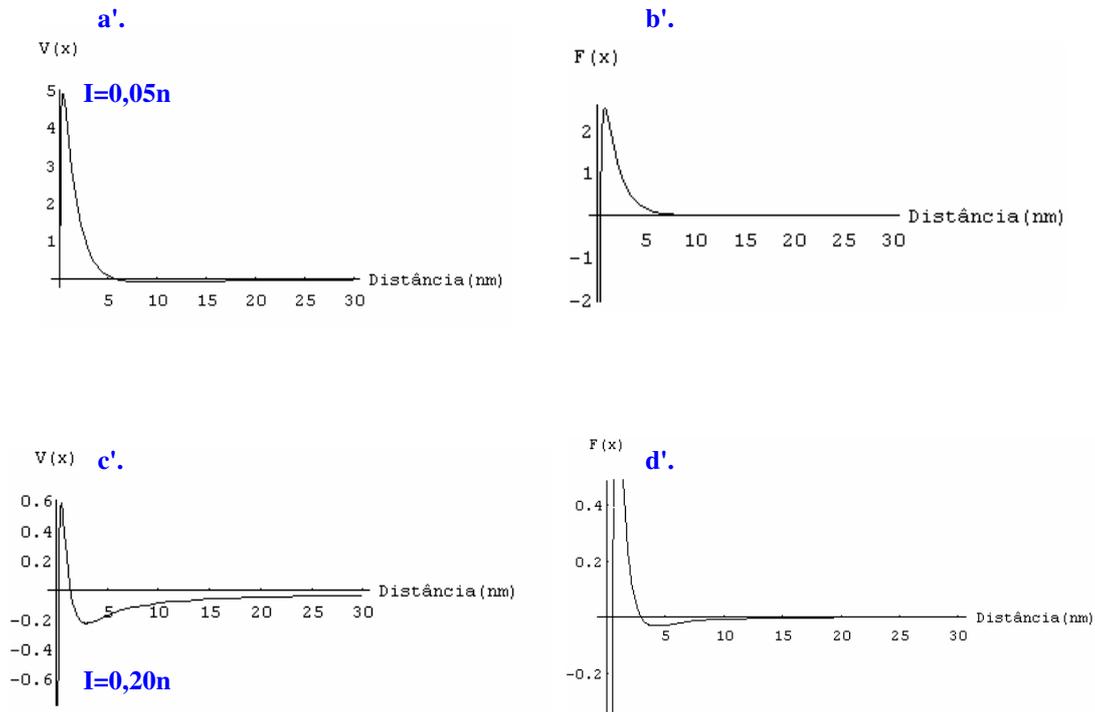


Figura 2.12: Casos (B, C) respectivamente: **(a')**. Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62 V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,05n$, carga superficial da proteína igual $-30,11 \times 10^{-19} \text{ C}$, camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. **(b')**. Força de interação eletrostática expressa em $(F(x) 10^{-10} \text{ N})$ correspondente **(c')**. Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62V(x) \text{ eV})$ contra distância no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,2n$. **(d')**. Força de interação eletrostática expressa em $(F(x)10^{-10} \text{ N})$ correspondente.

Os casos (D, E), $I = 0,3n$ e $I = 0,5n$, nas figuras (2.13, 2.13(a'), 2.13(b'), 2.13(c') e 2.13(d')), mostram as condições em que a concentração crítica de aglutinação foi ultrapassada. Nesta situação, as superfícies e colóides coalescem rapidamente.

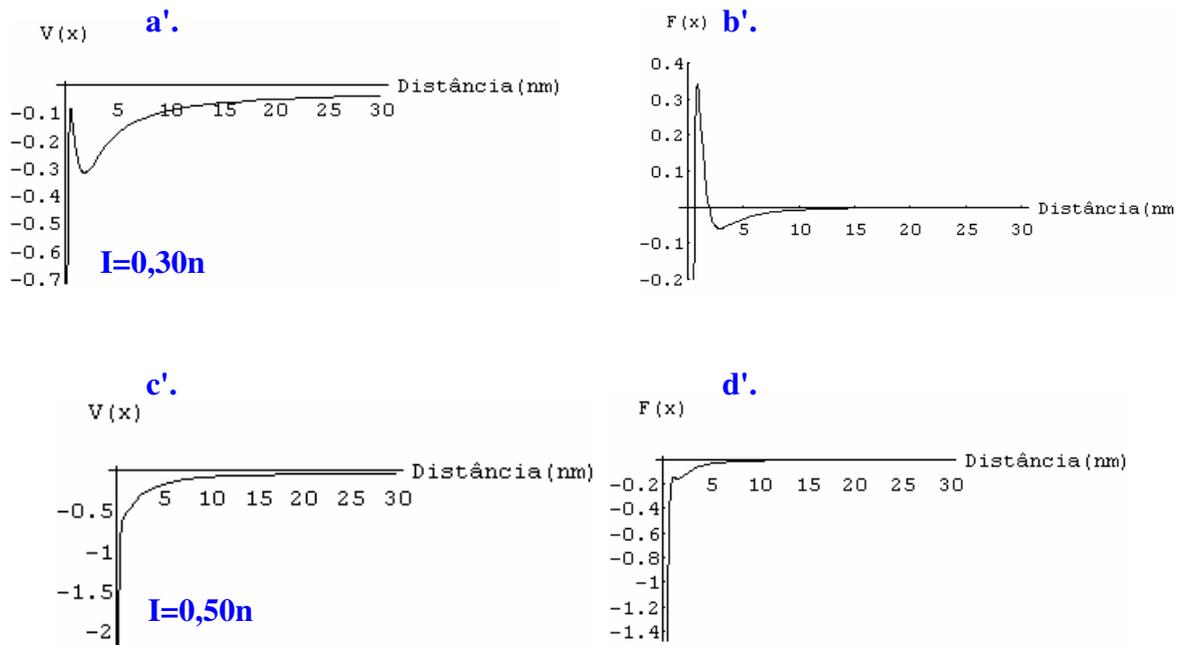


Figura 2.13: Casos (D, F) respectivamente: **(a')**. Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62V(x) \text{ eV})$ contra distância em nm para a interação DLVO no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,3n$, carga superficial da proteína igual a $-30,11 \times 10^{-19} \text{ C}$, camada estimada de filme eletrolítico de 100 nm. **(b')**. Força de interação eletrostática expressa em $(F(x) 10^{-10} \text{ N})$ correspondente **(c')**. Gráfico do potencial de interação expresso em $(0,62V(x) \text{ eV})$ contra distância nm no caso em que a densidade de íons é de $I = 0,5n$. **(d')**. Força de interação eletrostática correspondente expressa em $(F(x) 10^{-10} \text{ N})$.

Nesta última simulação, observa-se que o mínimo secundário persistiria até uma densidade de íons de $I = 0,3n$, ou seja, o "tempo de vida" do mínimo secundário aumentaria com o aumento da carga líquida superficial da proteína.

O processo de formação de filme fino é um processo em duas dimensões. Na direção horizontal, além das forças atrativas de capilaridade lateral de longo alcance, que são forças de imersão devido a molhabilidade das partículas (Kralchevsky, et al., 2001), existiria também uma transição de fase do tipo Alder (Alder, et al., 1968), (Takano, et al., 1977). Este tipo de transição ocorreria em sistemas de partículas que interagem repulsivamente em um reservatório bi-dimensional, numa transição líquido \rightarrow sólido. O processo de ordenamento do filme com proteínas de forma dura, de mesma carga líquida, interagindo repulsivamente, onde o 'reservatório' seria o mínimo secundário, poderá ser considerado um sistema deste tipo (Adachi, 1996).

Conclusão do capítulo 2

Quando a umidade é constante, durante a deposição da proteína, a taxa de evaporação está diretamente relacionada com a velocidade de rotação do substrato. Portanto, a variação da concentração de íons é diretamente proporcional à velocidade do substrato. Portanto, se a taxa de evaporação for muito alta, o ordenamento do filme de proteína seria prejudicado, dificultando também o processo de formação da camada uniforme do filme fino promovida pelo processo de "spin-coating". Existe, portanto, uma velocidade ideal para o processo de ordenamento e uniformidade do filme fino. A investigação dessa velocidade será vista na seção 3.5 (segunda fase) do capítulo 3 (Microscopia de força atômica) e na seção 4.4(segunda fase) no capítulo 4 (XPS). Portanto, seria interessante modificar os outros parâmetros identificados como susceptíveis de melhorar o ordenamento do filme protéico. As simulações demonstram que o aumento de carga superficial geraria um 'tempo de vida' do mínimo secundário maior. O aumento do pH da solução tampão da proteína GlnB-Hs para valores mais altos também seria uma outra alternativa. Deve-se, porém, ser cuidadoso na variação deste parâmetro, pois pH maior significa que a proteína pode desnaturar. Outra opção seria efetuar a deposição e a manutenção dos substratos depositados em atmosferas mais úmidas, diminuindo, dessa forma, a taxa de evaporação do solvente, tendo como consequência uma mudança mais lenta do pH da solução. A variação da densidade de íons da solução tampão também poderia ser explorada.

Capítulo 3

Microscopia de Força Atômica da Proteína GlnB-Hs sobre Silício

Neste capítulo será descrito a utilização da técnica de microscopia de força atômica para investigação de arranjos formados pela proteína GlnB-Hs em interfaces sólidas. Foram utilizadas duas técnicas de deposição da proteína sobre o substrato e dois tipos de substratos: vidro e as faces (111) e (100) do silício. Considerando que a aquisição de imagens biológicas necessita de trocas frequentes de pontas devido à contaminação com o material biológico, foi desenvolvido um protocolo de limpeza de pontas de AFM.

3.1 Introdução à técnica

O microscópio de força atômica pertence à família de microscópios que possui a capacidade de medir a topografia superficial de uma amostra com resolução atômica (Lillehei, 2000). O princípio físico de funcionamento desse microscópio são as forças de Van der Waals (Binnig, 1986). Quando a ponta de prova, com raio nanométrico, se aproxima da amostra, a interação entre os átomos da amostra e a ponta vai ser inicialmente atrativa, (figura 3.1.). À medida que as distâncias vão diminuindo, esta interação torna-se repulsiva. A deflexão causada por esta interação é medida através de uma haste flexível (cantilever), de um feixe de laser e de um fotodiodo. O feixe de laser reflete no extremo da haste, onde se localiza a ponta de prova e é detectado pelo fotodiodo. A deflexão do cantilever é diretamente proporcional à força entre a ponta e a amostra. Um servo-mecanismo procede à varredura da amostra mantendo a força de interação constante, revelando assim a topografia da superfície.

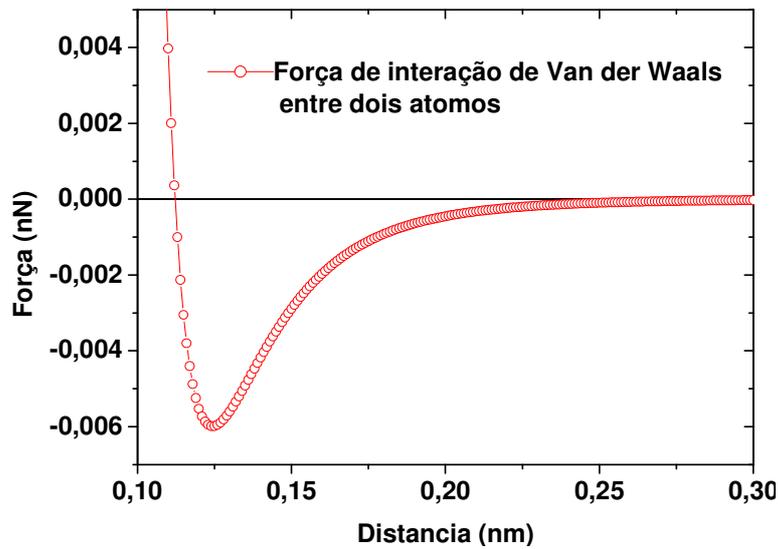


Figura 3.1: Força de interação de Van der Waals entre os átomos da amostra e da ponta de prova.

O potencial de interação pode ser descrito pelo potencial de Lennard-Jones entre dois átomos:

$$U(r) = \frac{-A}{r^6} + \frac{B}{r^{12}} \quad (3.1.1)$$

A força derivada deste potencial seria dada pela expressão abaixo e cujo gráfico está na figura 3.1:

$$F(r) = -\frac{6A}{r^7} + \frac{12B}{r^{13}} \quad (3.1.2)$$

onde r é a distância de separação entre os dois átomos e A e B são constantes de interação empíricas cuja ordem de grandeza é A em torno de 10^{-81} Jm^6 e B em torno de $10^{-139} \text{ Jm}^{12}$ (Kittel, 1983).

A força entre os dois átomos interagindo será dada pela derivada do potencial em relação à distância. O gráfico da figura 3.1 mostra que a força atrativa máxima é atingida a uma distância de 0,12 nm. Com a diminuição da distância, forças repulsivas dominarão. Existem dois modos principais de varredura: o modo contato e o modo dinâmico.

Modo contato

No modo contato, a força atrativa quando a ponta e a superfície da amostra entram em contato é usada como alimentação para manter a altura da amostra constante durante a aquisição da imagem. Neste modo, a ponta da AFM estará sempre em contato com a amostra. No modo contato, várias propriedades superficiais podem ser medidas, entre elas pode-se obter a distribuição de forças de fricção e elasticidade.

Geralmente se usa uma ponta de prova macia de silício com constante de mola baixa em torno de 0,15 N/m.

Modo dinâmico

O modo dinâmico foi desenvolvido para amostras frágeis tais como amostras biológicas. Neste modo, durante a aquisição da imagem, a ponta de prova oscila em torno de sua frequência de ressonância. Quando a ponta se aproxima da superfície da amostra, a amplitude de oscilação e a frequência de oscilação decrescem. A variação na amplitude da oscilação durante a interação com a superfície é usada como alimentação para manter a distância da amostra constante durante a varredura. Uma das grandes vantagens deste modo é a redução de forças laterais durante a varredura, limitando uma eventual degradação da amostra.

A constante de mola da ponta para este modo geralmente se situa em torno de 40 N/m. No caso de amostras biológicas, constantes de molas menores são mais adequadas.

Imagem de Fase

Quando um cantilever oscila, a diferença de fase deste com a fonte excitadora está relacionada com as propriedades viscoelásticas resultantes da interação ponta-amostra. Este modo é uma extensão do modo dinâmico e é complementar a outras técnicas.

3.2 Preparação das amostras biológicas

Uma das grandes limitações do uso da microscopia de força atômica aplicada a materiais biológicos é a fragilidade desses, o que resulta em baixa resolução. (Santos et al., 2004).

Como a amostra pode se soltar do substrato, a contaminação da ponta de prova é freqüente ou mesmo inevitável, podendo vir também do ambiente (DeSouza et al., 2002). Assim, esta contaminação pode ser responsável pela criação de imagens com artefatos levando à necessidade da trocas freqüentes de pontas. O alto custo de trocas de pontas freqüentes levou ao desenvolvimento de um protocolo de limpeza e controle de qualidade (Lubambo et al., 2005). Na maioria das vezes, estas pontas podem ser reutilizadas, evitando assim o descarte prematuro de pontas ainda em condições de realizar imagens com qualidade. Este método será descrito na seção experimental deste capítulo.

Outro parâmetro importante para realizar imagens de amostras biológicas com um microscópio de força atômica é a necessidade de utilização de um substrato sólido. Em regra geral este substrato deve ser bem plano, ou seja, a rugosidade do substrato não deve interferir com a amostra, (ela deve ser menor do que o tamanho da molécula que se quer visualizar (Santos et al., 2004)). Estes substratos devem ser escolhidos levando-se em conta o conhecimento de suas superfícies, pois a interação da molécula com o substrato pode ser através de interações polares, eletrostáticas ou de Van der Waals. É necessário, portanto, um conhecimento destas superfícies de forma que estas não interfiram (a menos que se queira estudar esta interferência) com a amostra a ser estudada. A interação deve permitir a adsorção, mas não deve degradar a amostra. Os substratos mais utilizados são mica, silício (por suas características e possíveis aplicações na indústria eletrônica), vidro, polímeros, ouro, grafite, etc.

3.3 Resultados Experimentais

As imagens de AFM foram realizadas usando um microscópio comercial de força atômica Shimadzu SPM-9500J3 em modo dinâmico (“Dynamic tapping mode”, TM) à temperatura ambiente. Utilizou-se uma ponta de prova “Olympus” de silício, com constante de mola de 42 N/m e raio de curvatura de 10 nm. A frequência de varredura das imagens foi de 1 Hz e foram adquiridas com 256x256 pixels. Todas imagens foram tratadas corrigindo-se o movimento do piezo e eliminando-se eventuais ruídos quando esse procedimento não prejudicava a resolução final.

3.4 Protocolo de Limpeza de Pontas de AFM

Imagens topográficas realizadas por AFM correspondem à convolução da geometria da ponta com as características topográficas próprias da amostra. Portanto, se uma partícula aderir à ponta durante a aquisição da imagem, surgirão artefatos (DeSouza et al., 2002). Partículas orgânicas ou inorgânicas quando estão aderidas à ponta podem alterar a geometria desta resultando em imagens com baixa qualidade. Esta situação é ainda muito mais crítica quando biomateriais como proteínas cujas dimensões são da ordem do raio de curvatura da ponta são investigadas. Neste caso, o conhecimento do exato perfil da ponta não é possível, e informações de estrutura e determinação de simetrias cristalinas são informações cujo acesso não é direto, necessitando tratamento das imagens (Li et al., 1999).

Para se evitar incertezas provenientes deste fator, um protocolo de limpeza e controle de imagem confiável, simples e econômico foi desenvolvido para remover a contaminação orgânica e detectar também uma possível deterioração da ponta. Neste processo de limpeza foram utilizados dois materiais: filme de celulose produzida por fermentação da bactéria *Acetobacter xylinum* (Fontana et al., 1990) e um filme de polipropileno.

O protocolo de limpeza consiste nos seguintes passos: primeiro, a ponta é irradiada no suporte próprio com uma lâmpada de mercúrio emitindo no ultravioleta por 15 minutos. Em seguida, imagens do filme de polipropileno e de celulose embebidos em álcool isopropílico são adquiridas. O processo de limpeza é melhorado varrendo três diferentes regiões das amostras de limpeza e a utilização de curvas de força também melhora o processo.

Para se quantificar a qualidade da imagem, o programa **IQM** (Nill, 1992) de medidas de qualidade de imagem foi utilizado.

O controle de qualidade de imagens usa como referência uma imagem da celulose adquirida com uma ponta nova. Em seguida, esta ponta é contaminada com material biológico. Uma segunda imagem da amostra de celulose é adquirida com a ponta contaminada para comparações. Finalmente, uma terceira imagem é adquirida seguindo o protocolo de limpeza descrito no parágrafo anterior, e a imagem obtida com a ponta que sofreu limpeza é comparada com as anteriores para o teste de eficiência do processo de limpeza.

O programa **IQM** é baseado no espectro de potência da imagem que é o quadrado da intensidade da transformada de Fourier. O resultado **IQ** fornece informações sobre contraste e definição da imagem. O fator **IQ** é uma soma ponderada e normalizada do espectro de potência da imagem permitindo comparações com outras imagens. Se o fator **IQ_{razão}** for maior que 1 quando duas imagens **A** e **B** são comparadas na mesma região, isto significa que a qualidade da imagem **A** é melhor que a da imagem **B**, senão **B** será a de melhor qualidade. O fator **IQ_{razão}** para uma série de imagens adquiridas em modo contato e modo dinâmico é mostrado na tabela 3.1 a seguir.

Estes resultados demonstram a superioridade do uso da celulose na limpeza pois a qualidade das imagens calculada pelo fator **IQ_{razão}** é maior do que 1 nos dois modos quando o procedimento de limpeza usa a celulose. O resultado obtido na terceira linha **IQ_{razão} ~1**

correspondendo ao processo por limpeza com celulose sugere que a ponta pode ter recuperado sua qualidade original.

PONTA (A/B)	MODO DINÂMICO	MODO CONTATO
	IQ_{TAXA} (IMAGEM A/ IMAGEM B)	IQ_{TAXA} (IMAGEM A/ IMAGEM B)
Nova / contaminada	2,17	1,69
Nova / limpa com polímero	1,57	1,47
Nova / limpa com celulose	0,98	1,05
Limpa com celulose /limpa com polímero	3,37	1,42

Tabela 3.1: Resultados do programa IQM do protocolo de limpeza de pontas para imagens em modo dinâmico e contato. Se $IQ_{razão} > 1$ imagem A possui melhor qualidade que imagem B. Se $IQ_{razão} < 1$ imagem B possui qualidade melhor que a imagem A.

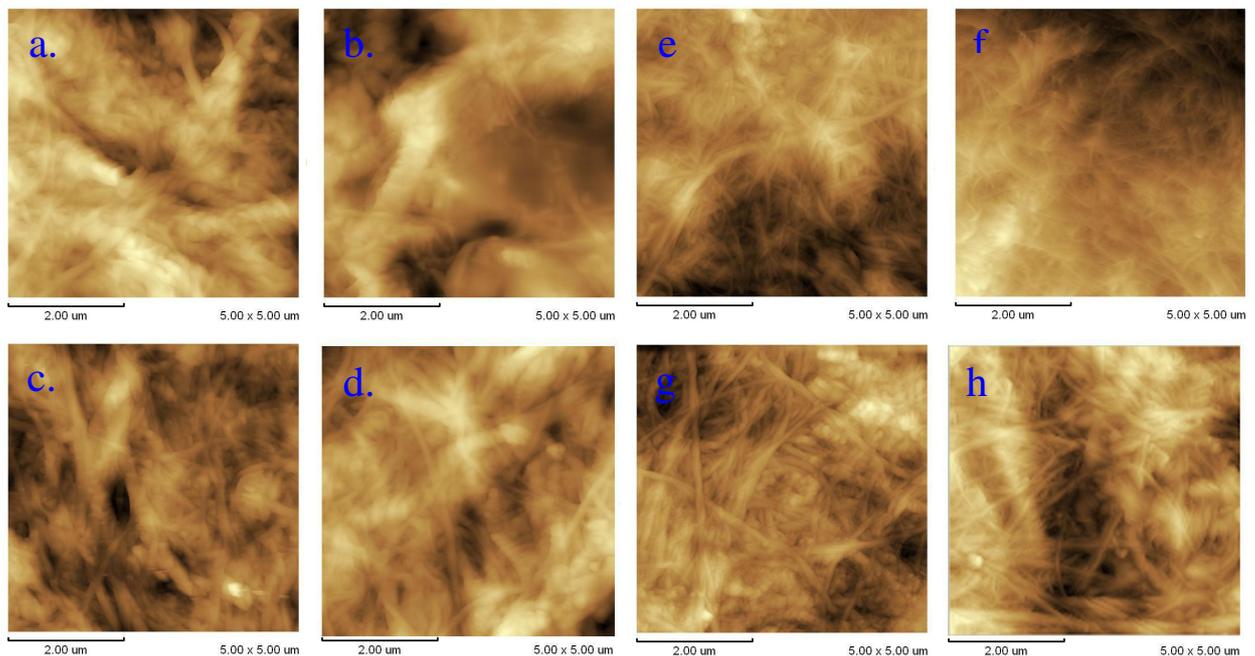


Figura 3.2: Imagem AFM, modo contato(a, b, c, d), dimensões $25 \mu\text{m}^2$. (a). Imagem adquirida com a ponta nova. (b). Imagem adquirida com a ponta contaminada. (c). Imagem adquirida com a ponta limpa com o polímero. (d). Imagem adquirida com a ponta limpa com a celulose. Imagem AFM modo dinâmico, (e, f, g, h), dimensões $25 \mu\text{m}^2$. (e). Imagem adquirida com a ponta nova. (f). Imagem adquirida com a ponta contaminada. (g). Imagem adquirida com a ponta limpa com o polímero. (h). Imagem adquirida com a ponta limpa com a celulose.

As imagens, (figuras 3.2 (b) e 3.2 (f)), foram obtidas com a ponta contaminada. Elas mostram uma perda de definição nas bordas das fibras de celulose, resultando em uma imagem de má qualidade. As imagens adquiridas com as pontas limpas, (figuras 3.2 (c) e 3.2 (g)), tendem a recuperar as definições originais das bordas das fibras. As etapas do processo de limpeza também foram comparadas entre si com o objetivo de verificar que elas eram efetivas, (figura 3.3). A tabela 3.2 abaixo mostra os resultados em modo contato.

PONTA	MODO CONTATO (IQ)
Contaminada	$1,74 \times 10^{-3}$
Limpa com polímero + Curvas de força	$1,45 \times 10^{-3}$
Limpa com polímero + álcool + Curvas de força	$2,32 \times 10^{-3}$
Limpa com polímero + álcool+ curvas de força+ U.V.	$3,11 \times 10^{-3}$

Tabela 3.2: Resultados do programa IQM para imagens em modo contato durante as diversas etapas do protocolo de limpeza de pontas.

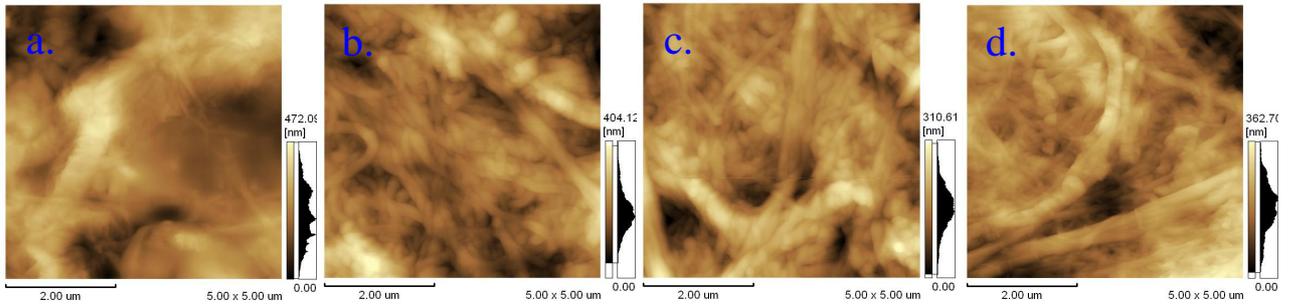


Figura 3.3: Imagem AFM modo contato, dimensões $25 \mu\text{m}^2$ (a). Imagem com a ponta suja. (b). Imagem com a ponta limpa com polímero e curvas de força. (c). Imagem com a ponta limpa com polímero, álcool e curvas de força. (d). Imagem com a ponta limpa com polímero, álcool, curvas de força e U.V.

Observando o resultado da segunda linha, tabela 3.2, quando a ponta foi limpa com polímero e curvas de força, vemos que a qualidade da imagem é pior se comparada com a ponta contaminada. Este tipo de limpeza proposto por (Nie et al., 2001) parece indicar que a limpeza só com o polímero e curvas de força sem adição de um solvente tende a sujar a ponta. O método desenvolvido com a celulose ou com o polímero tem a grande vantagem de não precisar manipular a ponta durante todo o processo de limpeza. Isto evita a quebra da ponta por manipulação indevida necessária no método de limpeza por banho (DeSouza, 2002). O uso de álcool isopropílico, ao invés de acetona, é recomendado pois não deixa resíduo. A grande vantagem de materiais como a celulose e o polipropileno é que eles são macios se comparados com a ponta de prova, e isto previne possíveis quebras durante o processo de limpeza.

3.5 Deposição da proteína GlnB-HS em substrato de silício

A proteína GlnB-Hs foi depositada no substrato de silício (111) e (100) com o objetivo de investigar a conformação dos agregados e a influência da orientação cristalina do

substrato na agregação. Investigou-se também os efeitos da mudança da superfície do silício do estado hidrofílico para hidrofóbico na agregação da proteína.

A proteína foi diluída em uma solução tampão contendo 50mM de Tris/HCl pH 8, 50 mM de NaCl, 0.1 mM de EDTA e 10% de glicerol.

Na primeira fase da investigação, depositou-se uma gota de 10 μ L de solução de proteína no centro do substrato previamente limpo segundo o protocolo do capítulo 1. Deixou-se a gota incubar, ou seja, imóvel para que as moléculas de proteína pudessem ser adsorvidas pelo substrato, por tempos variáveis, ver tabela 3.3. Logo em seguida, a superfície foi lavada com uma solução de 10 mMol de Tris/HCl pH 8 por três vezes para eliminar o excesso de proteína não adsorvida. Deixou-se o substrato com a proteína em um ambiente com temperatura (24°C) e umidade controlada (40%) por 24 h antes de se visualizar com a AFM.

Primeira Fase

Os parâmetros investigados nesta primeira fase foram: concentração da proteína na gota, mudança do tempo de incubação, estudo da influência da orientação cristalina do substrato através do depósito em duas orientações diferentes de silício e uso de substrato amorfo (uma lamínula de vidro para microscopia ótica) para comparações. Um resumo dos tipos de depósito da proteína GlnB-Hs no substrato de silício e vidro pode ser visto na tabela 3.3 a seguir:

Substrato	Estado de hidrofiliçidade	Concentração	Tempo de incubação
Si (111)	hidrofílico	100 pMol	30"
Si (111)	hidrofílico	100 pMol	1'
Si (111)	hidrofílico	100 pMol	5'
Si (111)	hidrofílico	100 pMol	10'
Si (111)	hidrofílico	10 nMol	30'
Si (100)	hidrofílico	100 pMol	10'
Vidro	hidrofílico	100 pMol	10'
Proteína desnaturada sobre si (111)	hidrofílico	100 pMol	10'

Tabela 3.3: Resumo dos tipos de deposição da proteína GlnB-HS sobre substrato sólido em função da orientação do substrato, tempo de incubação, concentração e do tipo de substrato.

Si (111)- 100 pMol, hidrofílico, 30 segundos de incubação

Observa-se, pelas figuras 3.4(a) e 3.4(c) que a superfície do silício já está completamente preenchida para uma área de aproximadamente $1 \mu\text{m}^2$, com um tempo de incubação de 30 segundos. Os agregados de proteína estão dispostos de uma forma aleatória, (figura 3.4c). Pelas imagens de fase correspondentes, (figuras 3.4 (b) e 3.4 (d)), vê-se que os núcleos dos agregados globulares apresentam uma cor mais escura indicando que possivelmente o núcleo pode conter material menos aderido ou diferente.

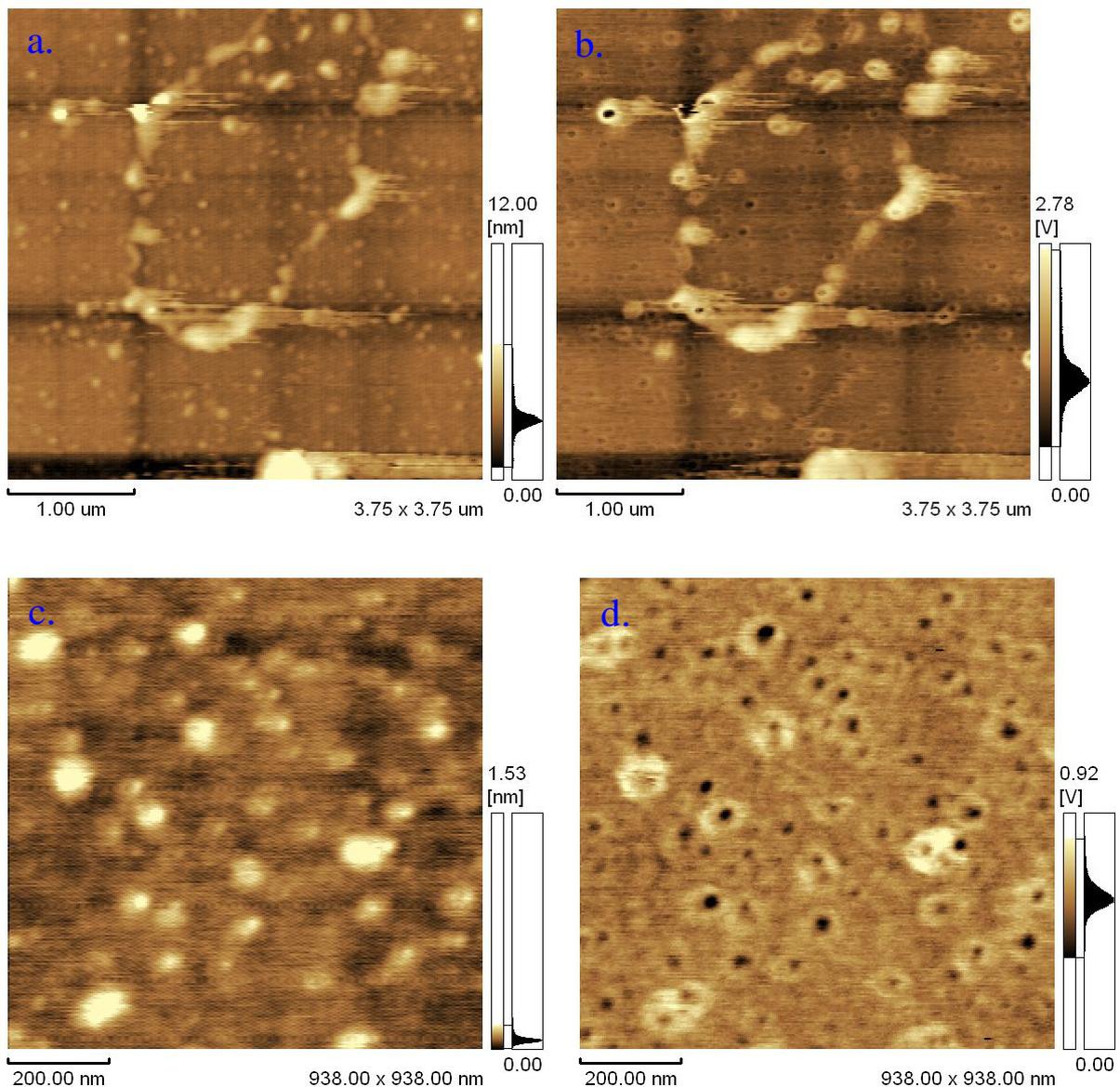


Figura 3.4: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (111). Incubação de 30s. (a). Imagem de dimensões $(3,75 \times 3,75) \mu\text{m}$. (b). Imagem de fase da imagem a. c. Zoom da imagem a, dimensões de $(938, 00 \times 938, 00) \text{ nm}$ (d). Imagem de fase da imagem c.

Si (111)-100 pMol, hidrofílico, 1 minuto de incubação

Com o tempo de incubação de 1 minuto observa-se, na figura 3.5, que a superfície de silício (111) está recoberta com agregados de geometria globular dispersos aleatoriamente para uma área de aproximadamente $1 \mu\text{m}^2$. As dimensões desses agregados são em torno de 55 nm de diâmetro e 1.65 nm de altura em relação à camada inferior de proteínas, como mostra a figura 3.6.

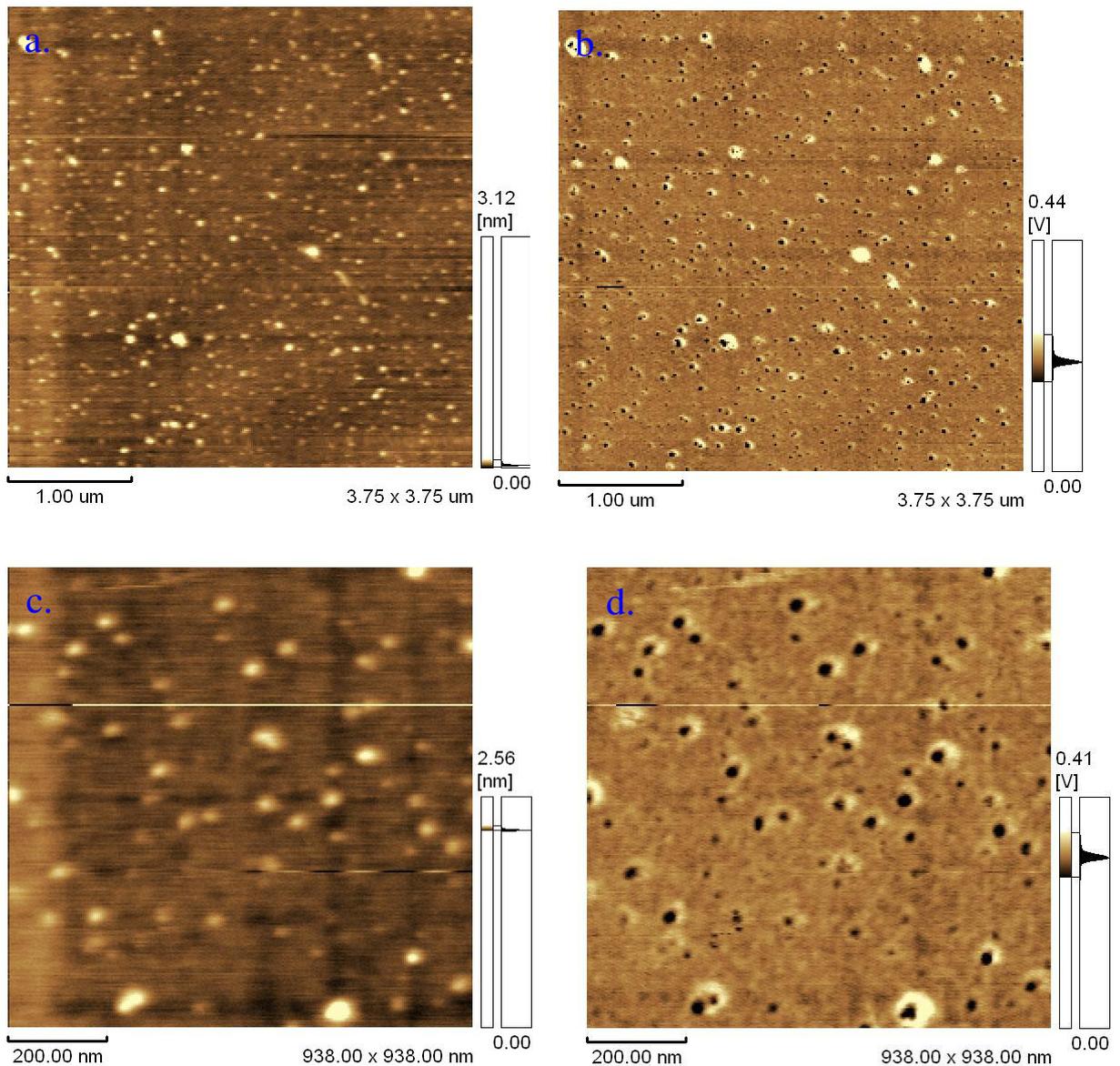


Figura 3.5: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (111). Incubação de 1 minuto. (a). Imagem de dimensões (3,75 x 3,75) μm . (b). Imagem de fase da imagem a. (c). Zoom da imagem a , dimensões de (938, 00 x 938, 00) nm (d). Imagem de fase da imagem c.

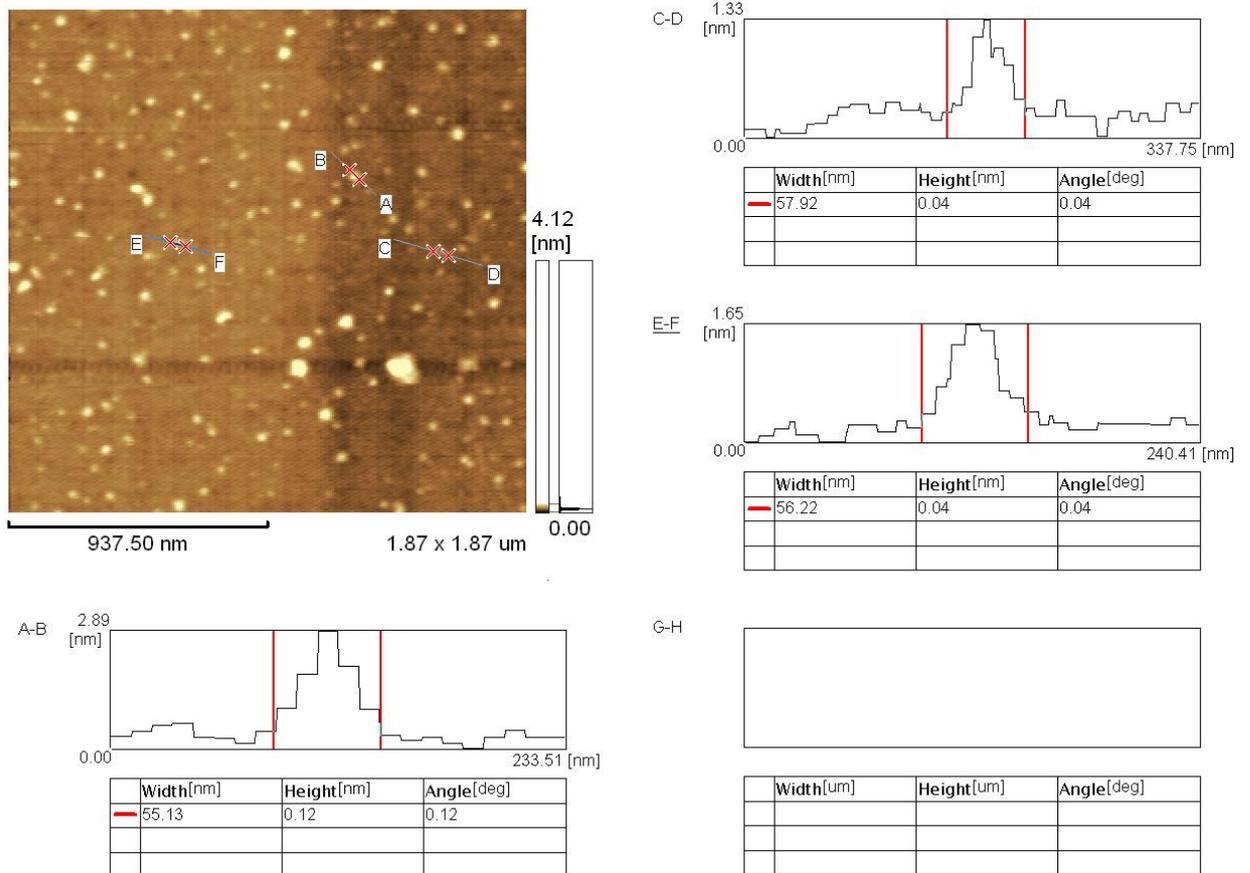


Figura 3.6: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.5. Imagem de dimensões (1, 87 x 1, 87) μm . A altura é relativa à camada inferior de proteínas.

Si (111)-100 pMol, hidrofílico, 5 minutos de incubação

Com o tempo de incubação de 5 minutos, nota-se, pela figura 3.7, a tendência destas unidades protéicas a se alinharem. A dimensão desses anéis é em torno de 70 nm de diâmetro e 1 nm de altura como é visto pela figura 3.8, na próxima página.

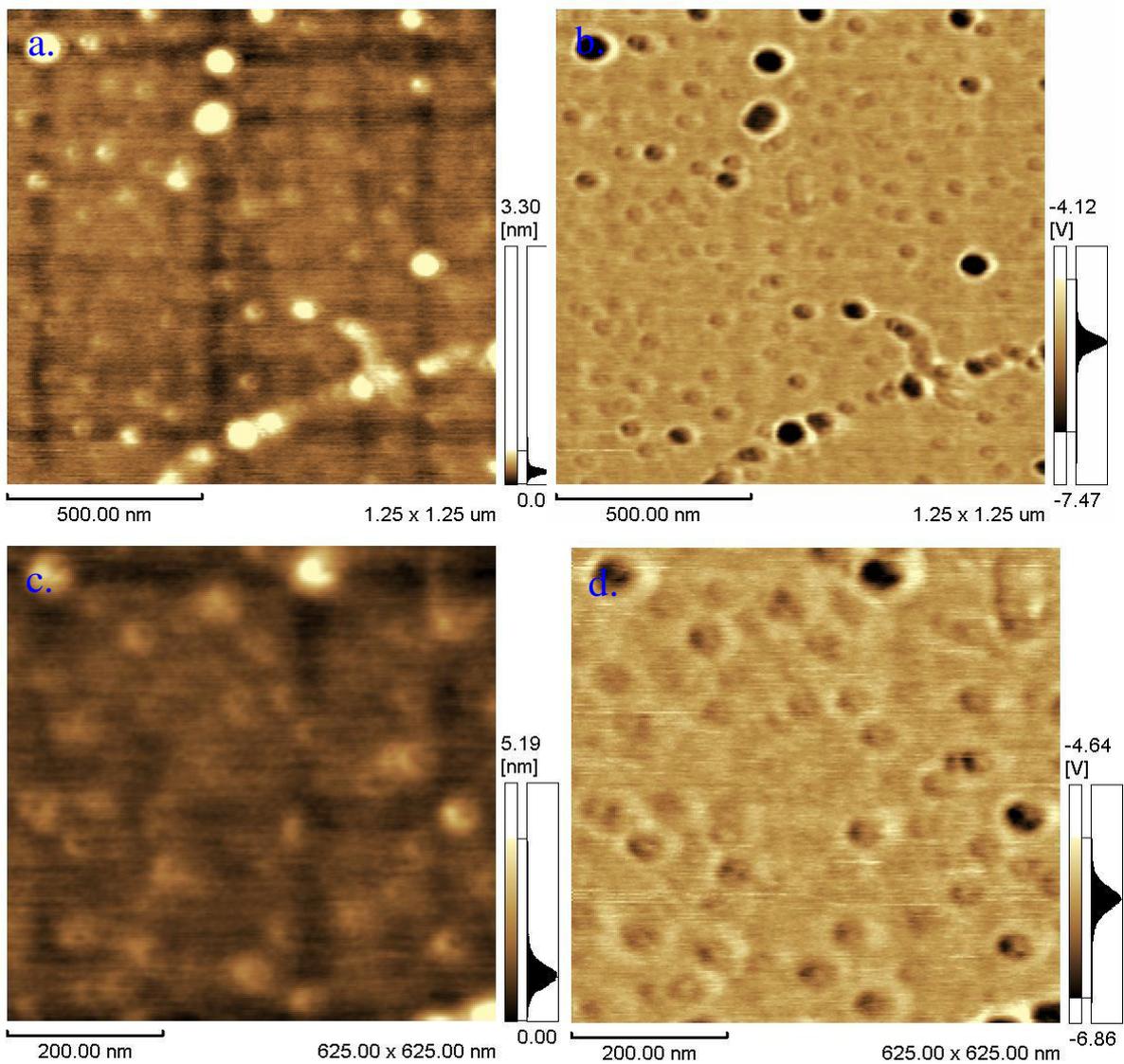


Figura 3.7: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (111). Incubação de 5 minutos. (a). Imagem de dimensões (1,25 x 1,25) μm. (b). Imagem de fase da imagem a. (c). Zoom da imagem a, de dimensões (625,0 x 625,00) nm. (d). Imagem de fase da imagem c.

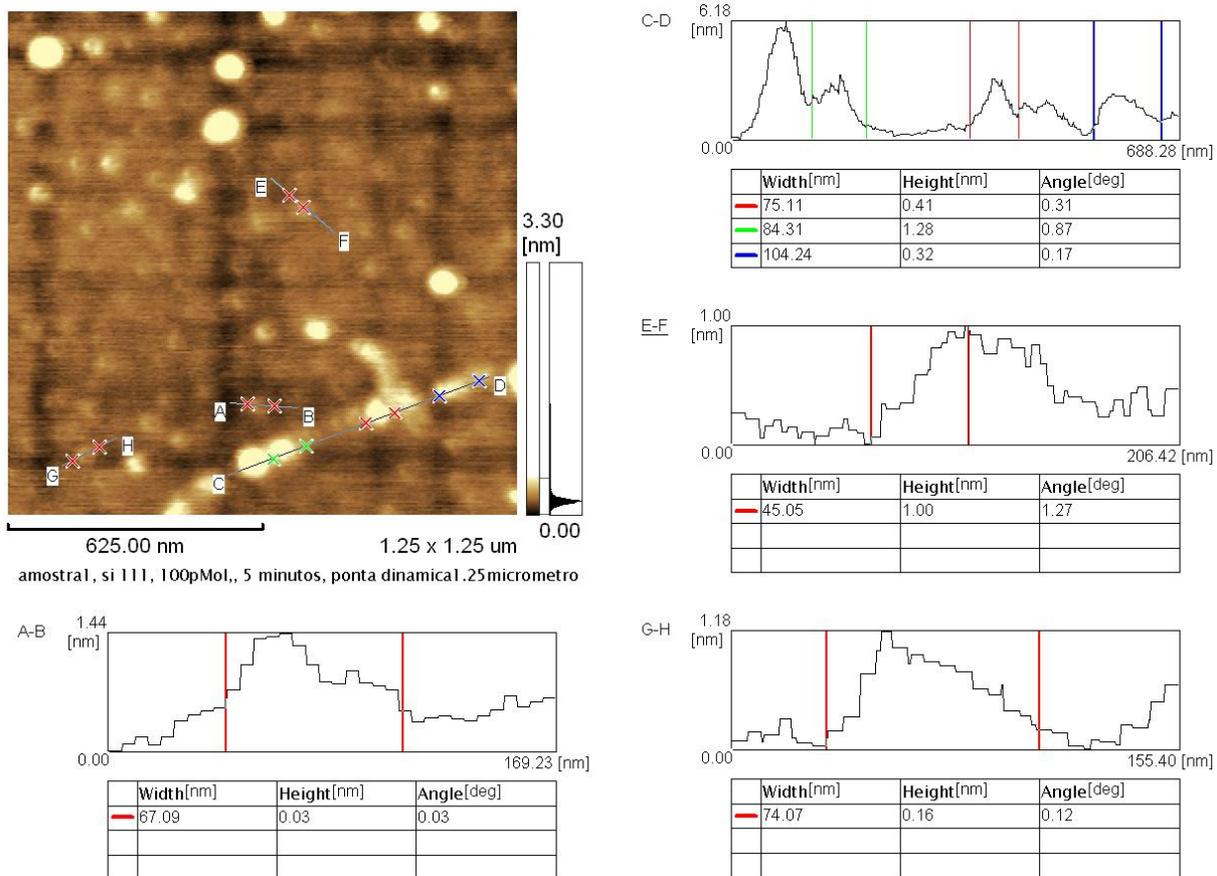


Figura 3.8: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.7a., Imagem de dimensões (1, 25 x 1, 25) μm. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.

Si (111)-100 pMol, hidrofílico, 10 minutos de incubação

A agregação da proteína, para este tempo de incubação, apresentou uma estrutura com tendência a formar linhas, (figura 3.9), compostas de unidades globulares cujo diâmetro varia em torno de 30 nm a 40 nm com 2,13 nm de altura, como mostra a figura 3.10. A superfície está totalmente preenchida com estas unidades protéicas que apresentam uma tendência ao empacotamento.

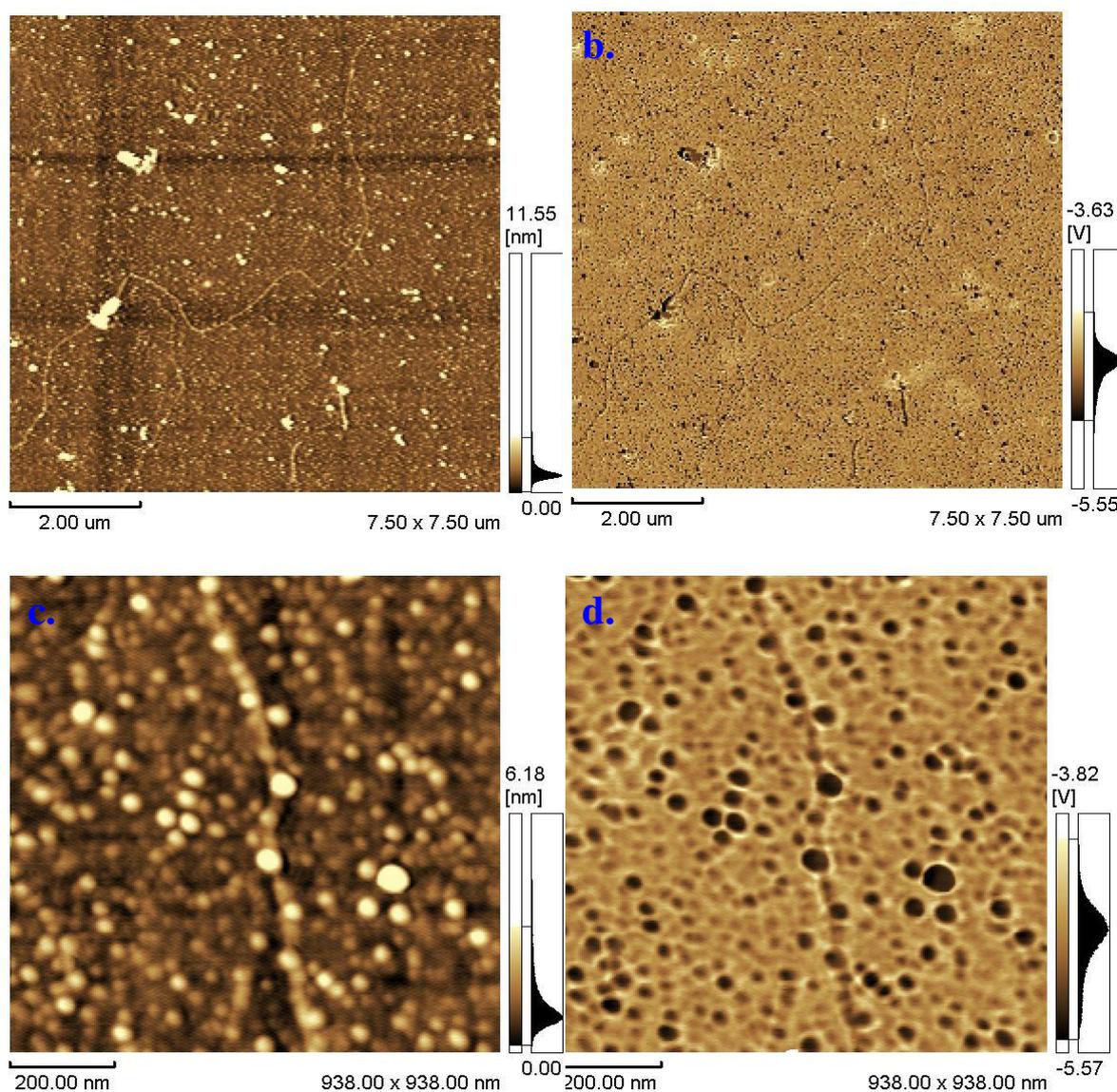


Figura 3.9: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (111). Incubação de 10 minutos. (a). Imagem de dimensões (7,50 x 7,50) μm . (b). Imagem de fase da imagem a. (c). Zoom da imagem a , de dimensões (938,00 x 938,00) nm (d). Imagem de fase da imagem c.

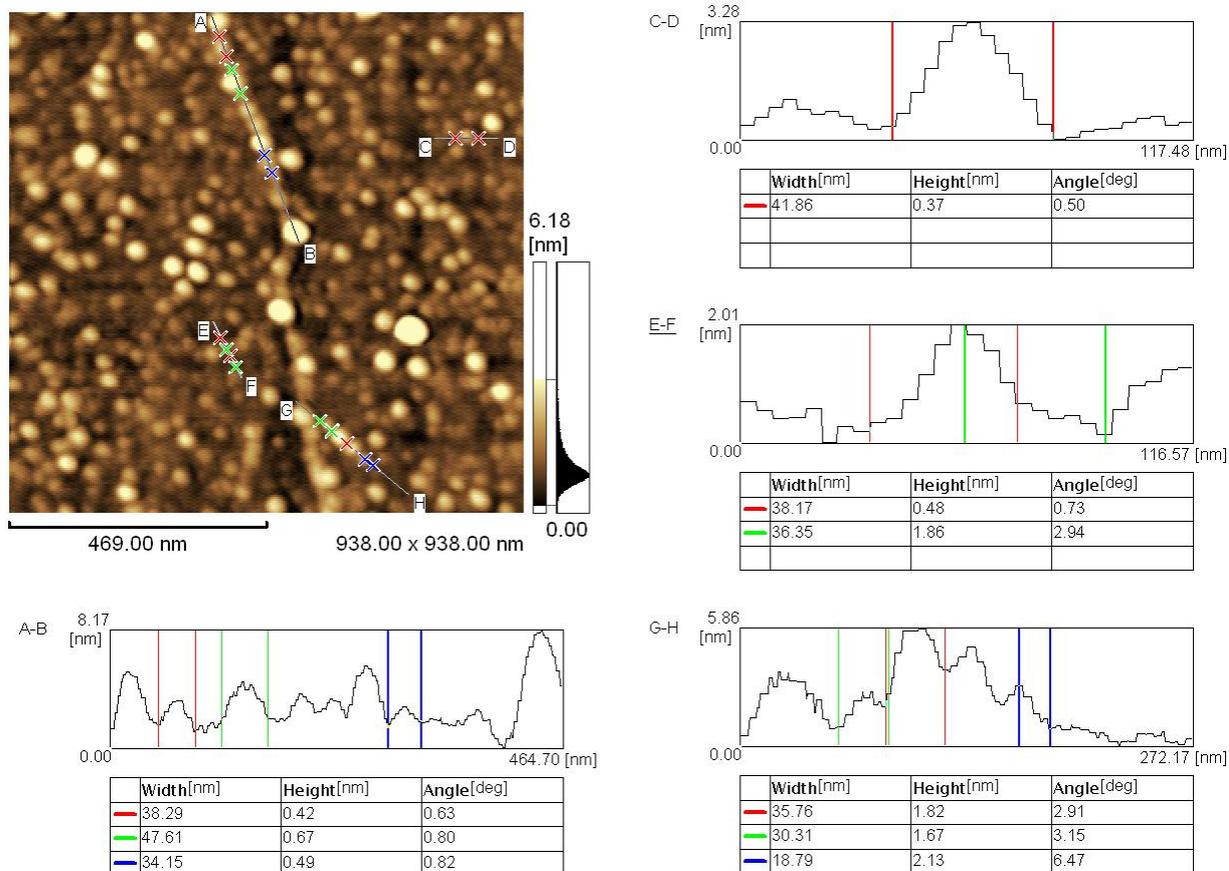


Figura 3.10: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.9 (c). Imagem de dimensões (938, 00 x 938, 00) nm. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.

Si (111)-10 nMol, hidrofílico, 30 minutos de incubação

A adsorção da proteína GlnB-Hs no substrato de silício em função do tempo de incubação parece ser um evento rápido, pois com 30 segundos a superfície do silício apresenta-se totalmente coberta para uma área de aproximadamente $4 \mu\text{m}^2$, (figura 3.4). Quando o tempo de incubação é de 30 minutos e concentração de 10 nmol, (figura 3.11), a superfície do substrato está preenchida com anéis de largura em torno de 100 a 130 nm e altura de 3 nm, como mostra a figura 3.12. Esta proteína no substrato de Si (111) hidrofílico, com este tipo de deposição por gotas incubadas, tem tendência a formar estruturas complexas

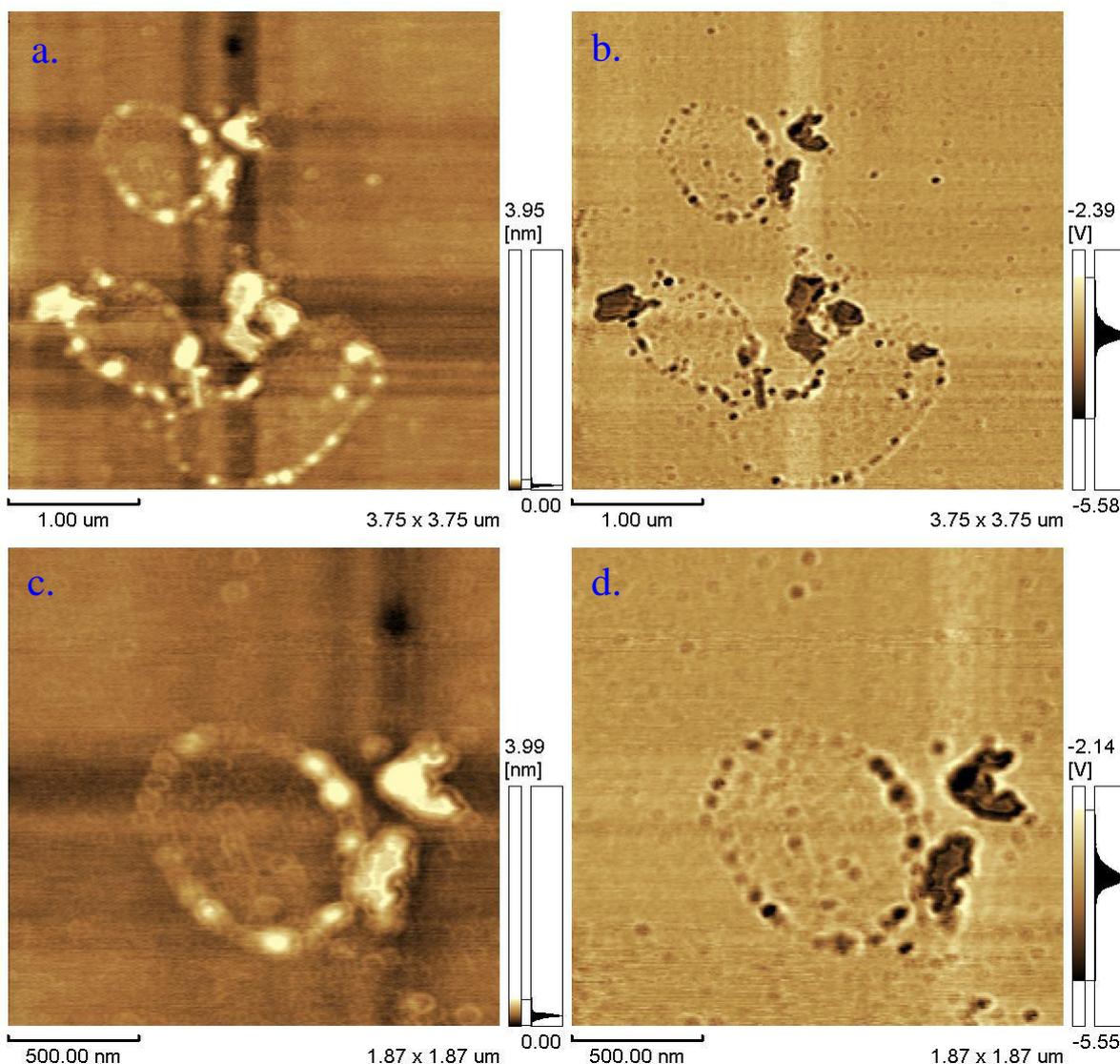


Figura 3.11: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (111). Incubação de 10 minutos, concentração 10 nMol. (a). Imagem de dimensões $(3,75 \times 3,75)\mu\text{m}$. (b). Imagem de fase da imagem a. (c). Zoom da imagem a, de dimensões $(1,87 \times 1,87)\mu\text{m}$. (d). Imagem de fase da imagem c.

onde as proteínas preferem se alinhar. Estas estruturas formam círculos e linhas fechadas ou abertas. O tamanho destas linhas podem atingir a ordem do micrômetro. Esta tendência é favorecida pelo tempo de incubação e concentração da proteína em solução.

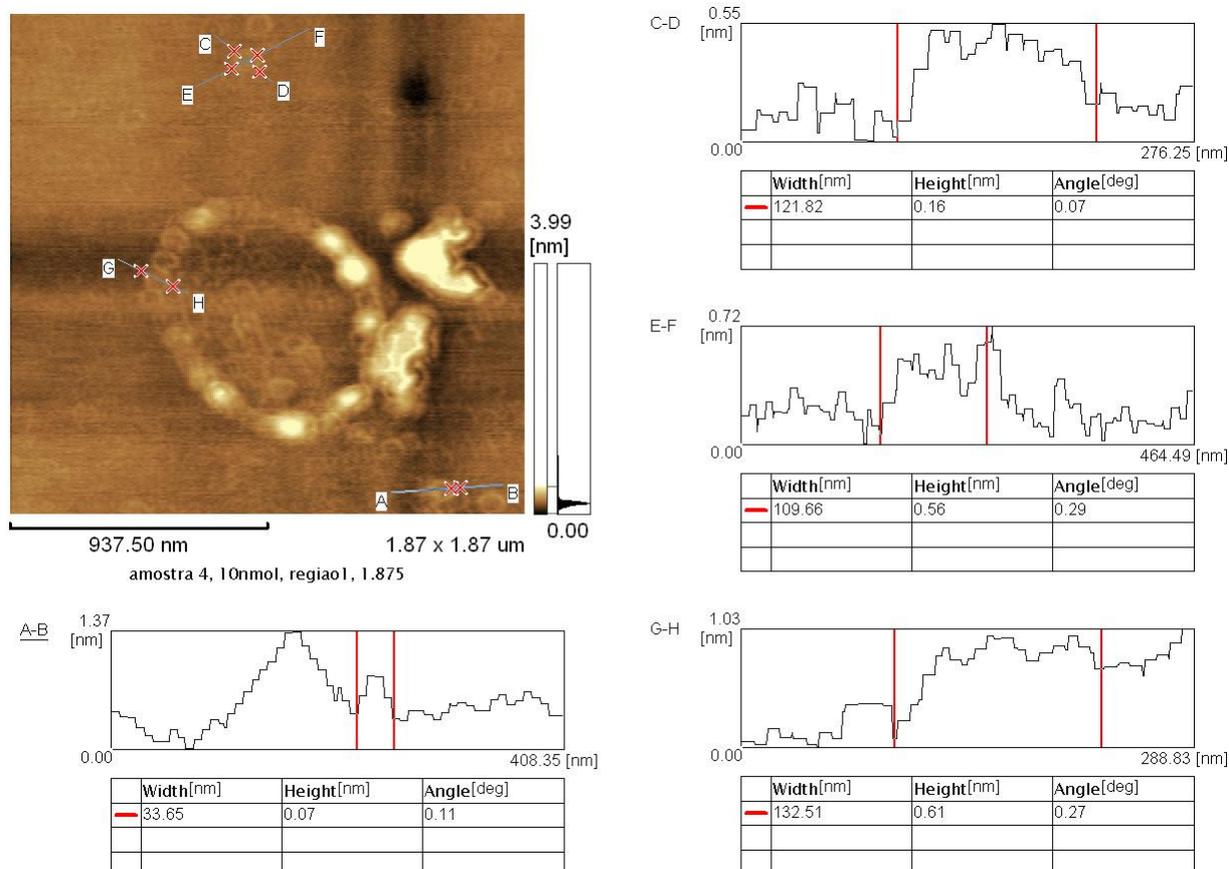


Figura 3.12: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.11(c). Imagem de dimensões (1, 87 x 1,87) μm. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.

Si (100)-100 pMol, hidrofílico, 10 minutos de incubação

Nota-se que para o caso onde o substrato é Si (100), o arranjo da proteína GlnB-Hs tem a configuração de discos de dimensões em torno de 140 nm de diâmetro e 1,6 nm de altura como mostra a figura 3.14. Estes discos recobrem a superfície completamente. Pela configuração vista na imagem da figura 3.13, a posição de cada disco em relação ao outro não é lado a lado, mas eles se superpõem e formam pilhas aleatórias.

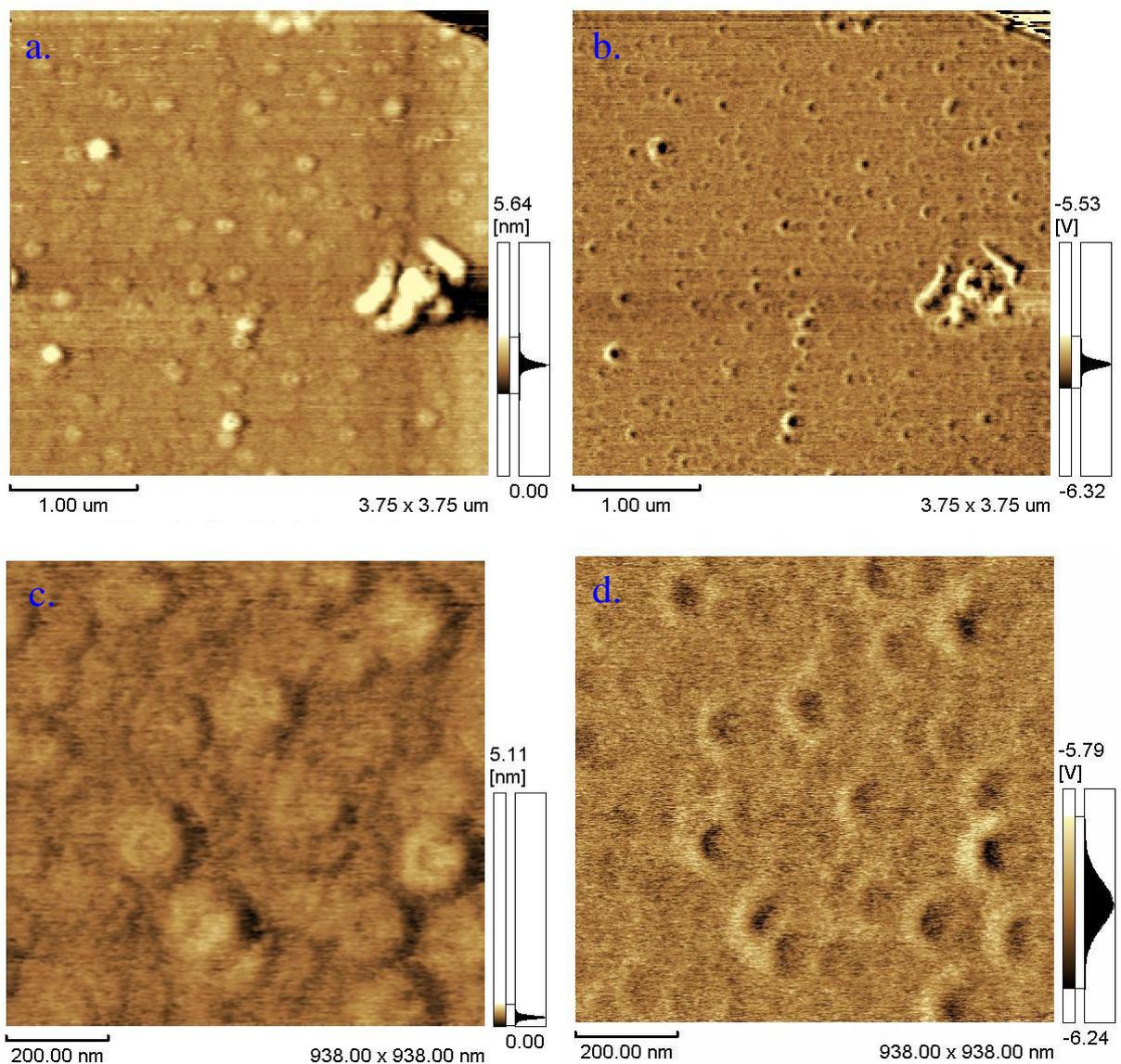


Figura 3.13: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (100). Incubação de 10 minutos. **(a)**. Imagem de dimensões (3,75 x 3,75) μm . **(b)**. Imagem de fase da imagem a. **(c)**. Zoom da imagem a , de dimensões (938,00 x 938,00) nm. **(d)**. Imagem de fase da imagem c.

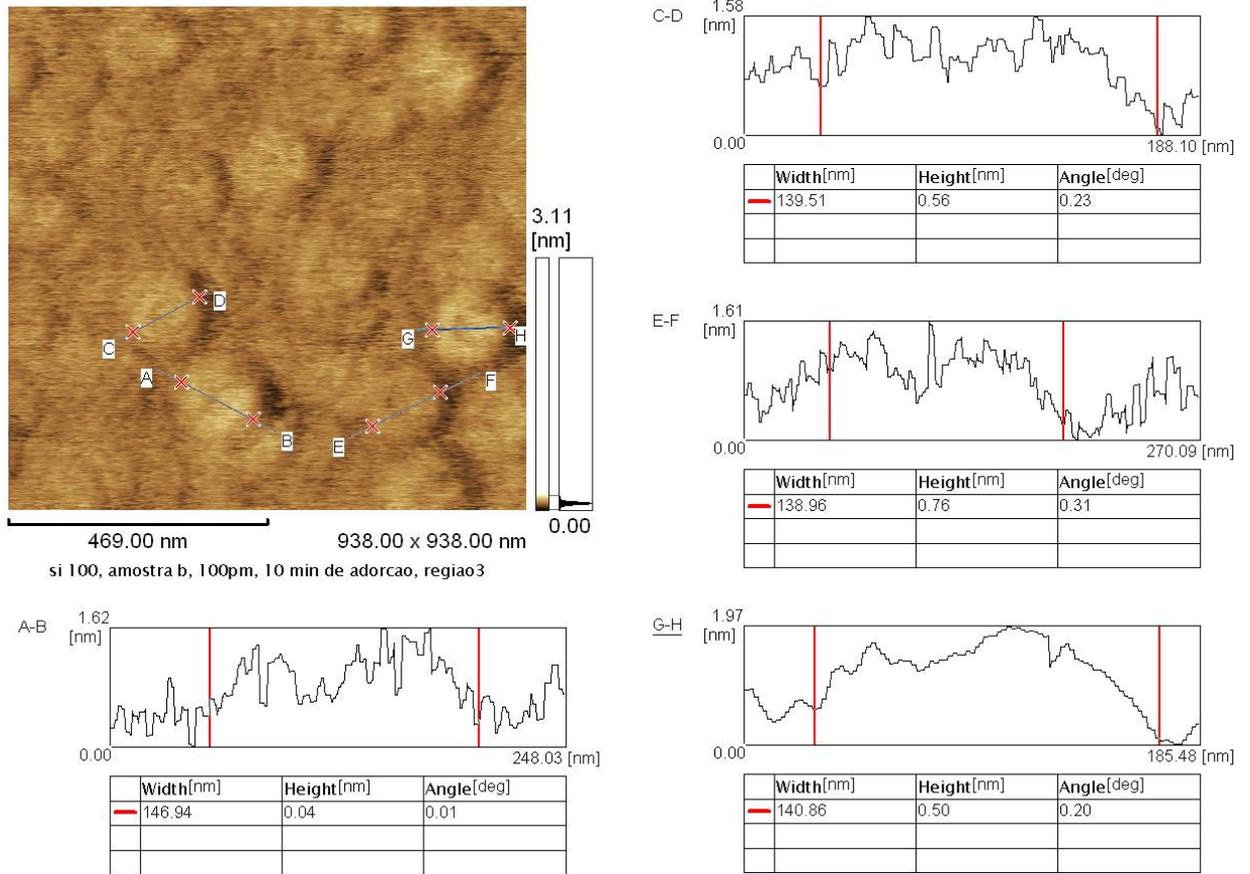


Figura 3.14: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.13©. Imagem de dimensões (938,00 x 938,00) nm. A altura é relativa à camada inferior de proteínas

Vidro-100 pMol, hidrofílico, 10 minutos de incubação

No substrato de vidro, que é amorfo e hidrofílico, observa-se que ele está totalmente coberto com proteínas para uma área de aproximadamente $1 \mu\text{m}^2$, (figura 3.15 (a)), para uma concentração de 100 pMol e para 10 minutos de incubação. As proteínas se agregam em unidades floculares com geometria losangular de dimensões 70 nm na maior largura por 2,18 nm de altura, (figura 3.16). Estas unidades floculares tendem a se agrupar em flocos e por sua vez cada unidade floccular possui uma estrutura interna que é composta de 4 unidades agrupadas com dimensões de 30 nm, (figura 3.17). Este tipo de arranjo é diferente do que ocorre nos substratos de silício hidrofílico (111) e (100). Além do mais, esta proteína não formou fios no substrato de vidro nem linhas. Provavelmente, o arranjo em fios e linhas é uma particularidade do substrato de silício e deve estar relacionado com a influência da interação da orientação cristalina, juntamente com a polaridade da proteína dirigindo a deposição durante a adsorção.

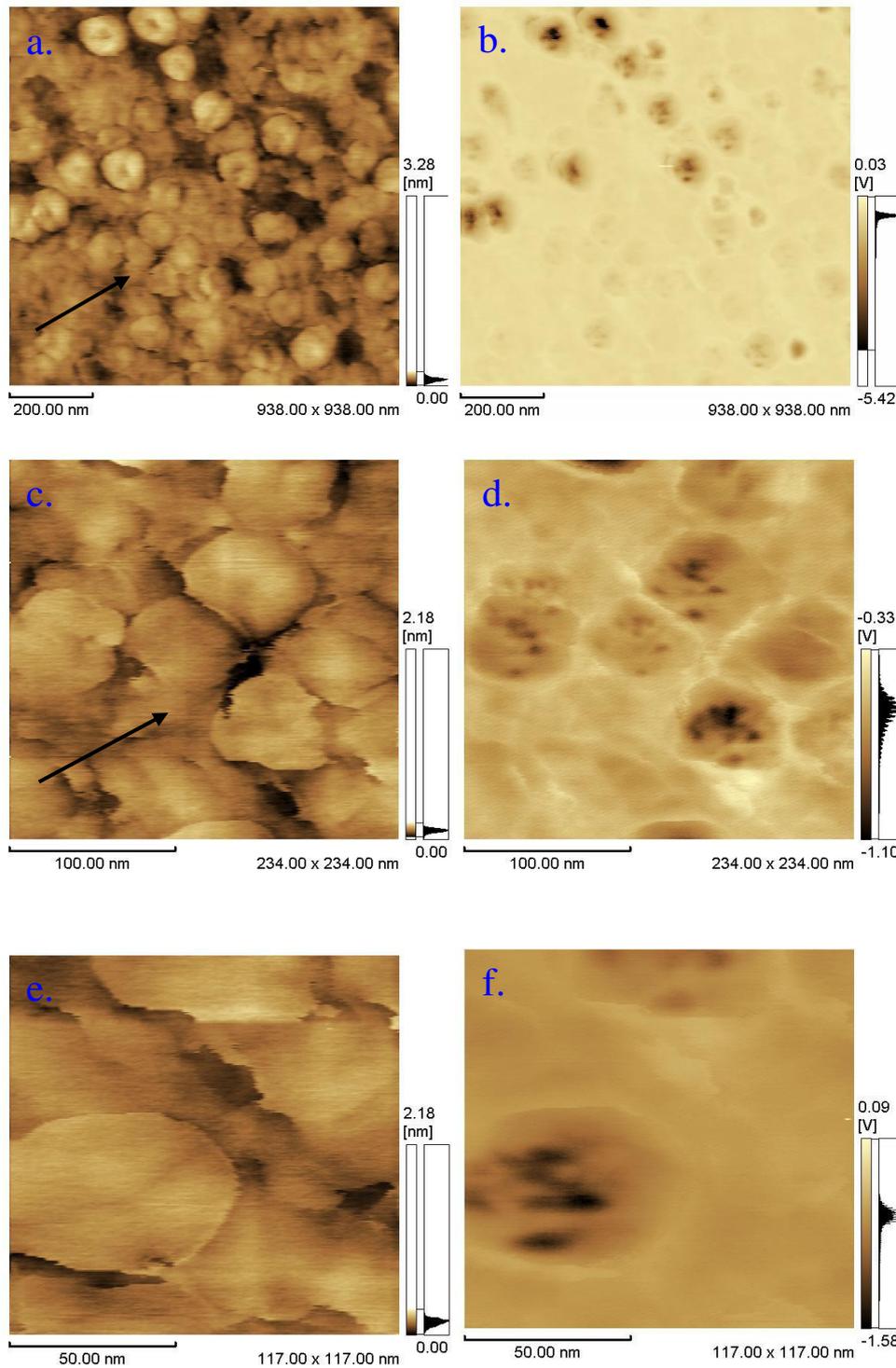


Figura 3.15: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de vidro. Incubação de 10 minutos. **(a)**. Imagem de dimensões (938, 00 x 938, 00) nm. **(b)**. Imagem de fase da imagem a. **(c)**. Zoom da imagem a, de dimensões (234, 00 x 234, 00) nm. **(d)**. Imagem de fase da imagem b. **(e)**. Zoom da imagem c, de dimensões (117, 00 x 117, 00) nm. **(f)**. Imagem de fase da imagem e.

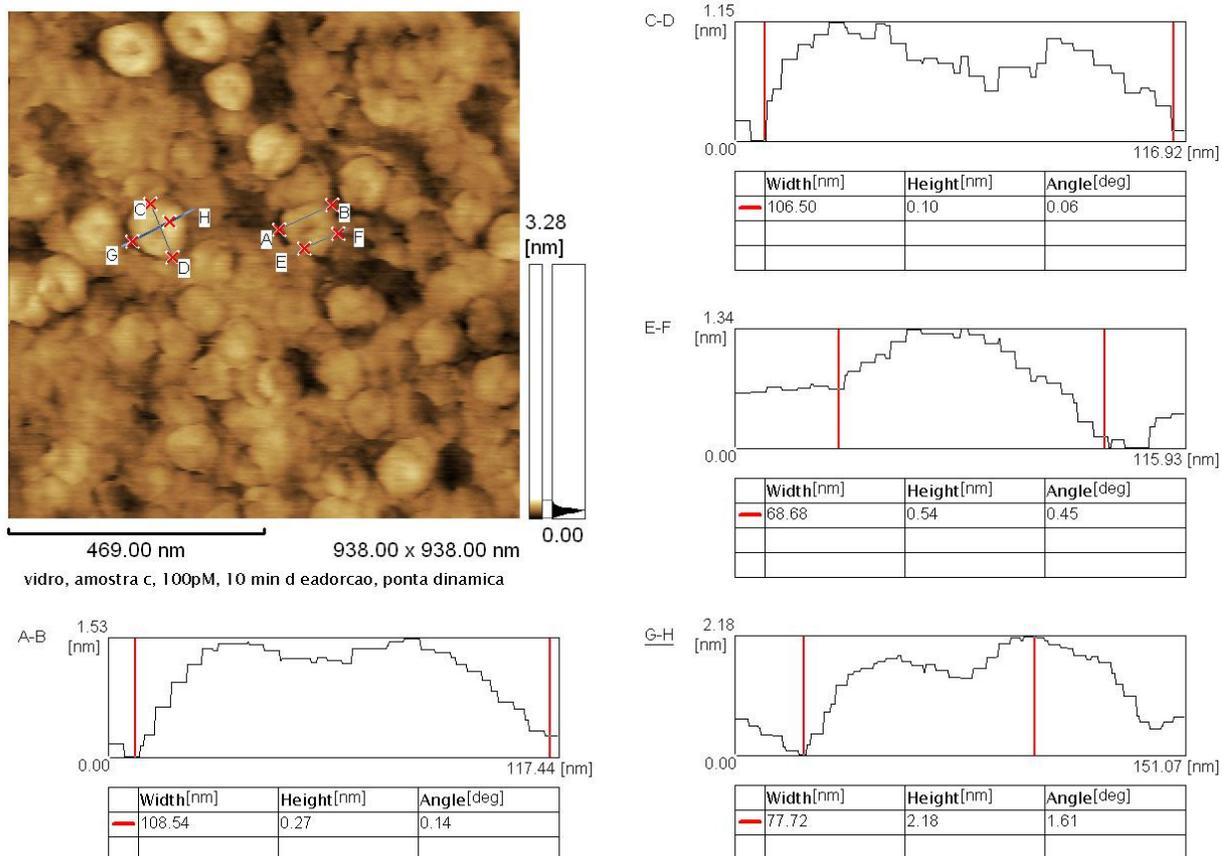


Figura 3.16: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.15(a). Imagem de dimensões (938, 00 x 938, 00) nm. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.

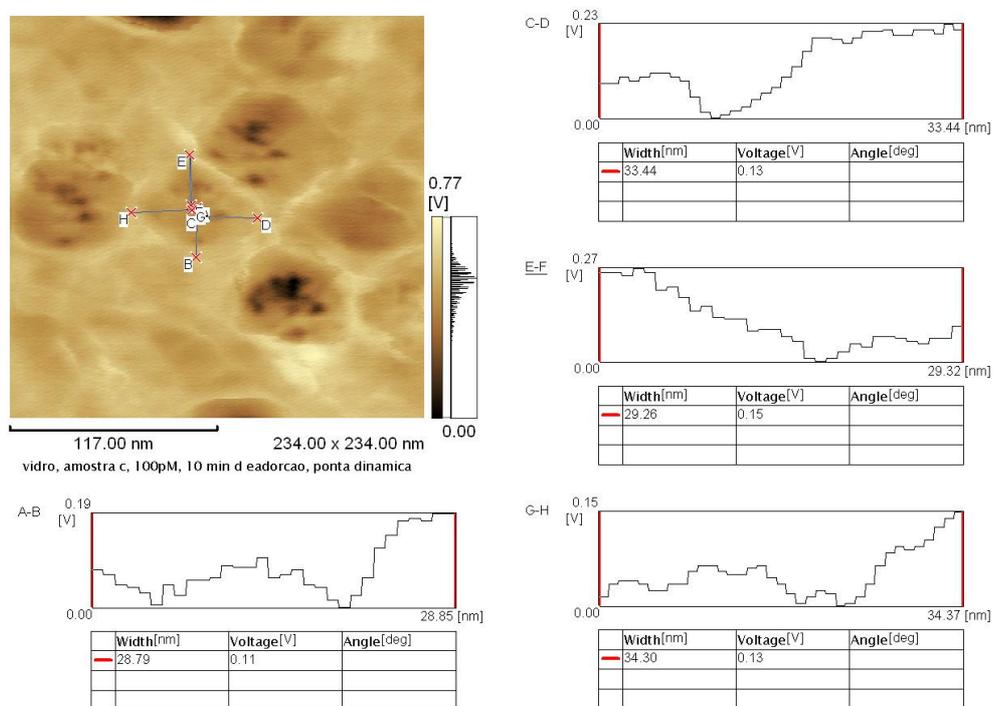


Figura 3.17: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.15. Imagem de dimensões (234,00 x 234,00) nm. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.

Proteína desnaturada 100 pmol sobre Si (111) hidrofílico, 10 minutos de incubação

A proteína GlnB-Hs foi mantida a 100°C durante 15 minutos, em seguida ela foi depositada na superfície do Si(111), de acordo com o procedimento descrito na seção 3.5. As imagens mostram fios da ordem de 30 nm de diâmetro e comprimento da ordem do micrômetro. Estes fios devem estar relacionados com a estrutura primária da proteína GlnB-Hs. As imagens de AFM, (figuras 3.18 e 3.19), sugerem que estes fios, ao se desenrolarem, interagem

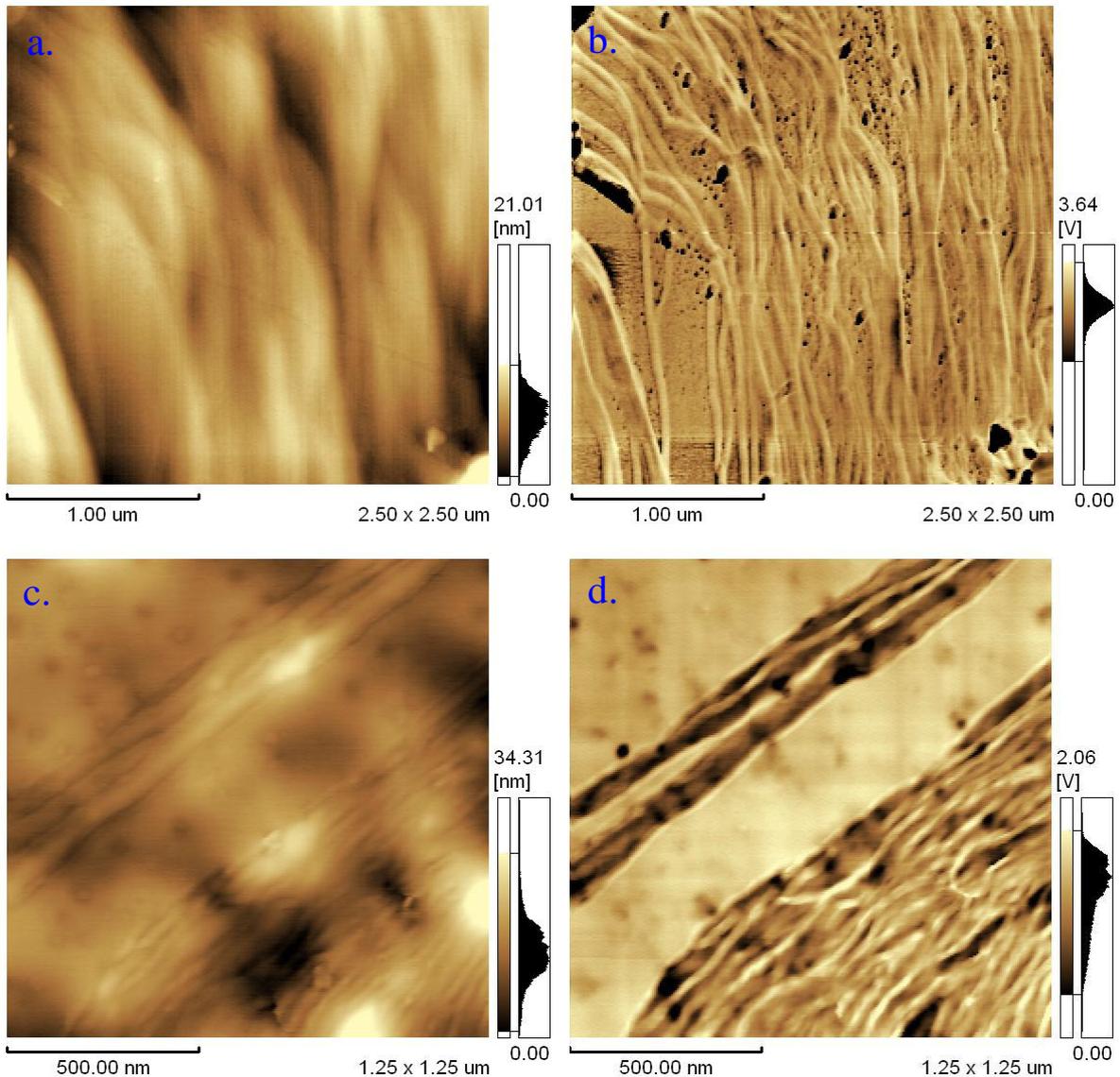


Figura 3.18: Imagem AFM da deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de silício (111). Incubação de 10 minutos. (a). Imagem de dimensões (2,50 x 2,50) μm . (b). Imagem de fase da imagem a. (c). Zoom da imagem a , de dimensões (1,25 x 1,25) μm (d). Imagem de fase da imagem c.

entre si, coalescendo lateralmente e formando uma massa compacta como resultado final.

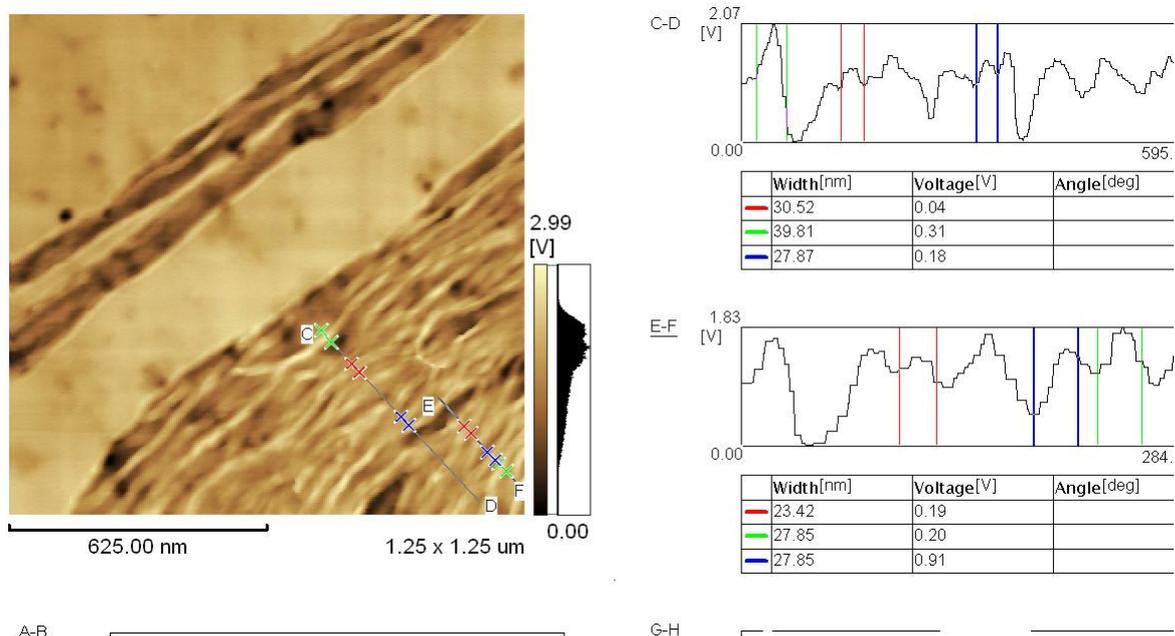


Figura 3.19: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.18. Imagem de dimensões (1,25 x 1,25) μm. A altura é relativa à camada inferior de proteínas.

Segunda Fase

Na segunda fase da investigação, a deposição da gota de proteína foi feita usando a técnica "spin-coating", para obtenção de um filme fino e uniforme com o objetivo de investigar a estrutura do filme formado de proteína através do uso das técnicas de Raios-X em incidência rasante e infravermelho. Um aspecto deste estudo foi a otimização da velocidade do "spin-coater" para se obter o melhor recobrimento (maior área, mais regular) possível da superfície do substrato. Foram investigados os padrões de agregação com a mudança no tipo de deposição (substrato móvel). A proteína foi diluída como descrito na seção primeira fase e ela foi pipetada no centro do substrato que estava girando a uma velocidade pré-estabelecida. Logo em seguida, a gota de proteína foi lavada com uma solução de Tris-HCl por três vezes para eliminar o excesso de proteína não adsorvida no substrato ainda girando. Deixou-se o substrato com a proteína em um ambiente com temperatura e umidade controlada por 24h antes de se visualizar com a AFM. A visualização foi executada nas bordas e centro do substrato.

Um resumo dos tipos de depósitos da proteína GlnB-Hs no substrato de silício (111) pode ser visto na tabela 3.4:

Substrato	Estado de hidrofiliicidade	Concentração (pMol)	Velocidade de rotação do spin-coater (rpm)
Si (111)	Hidrofílico	1000	500
Si (111)	Hidrofílico	1000	1000
Si (111)	Hidrofílico	1000	1500
Si (111)	Hidrofílico	1000	2500
Si (111)	Hidrofóbico	1000	2500

Tabela 3.4: Resumo dos tipos de deposição da proteína GlnB-Hs em substrato de Si(111) em função da rotação do "spin-coater".

Velocidade de 500rpm, substrato hidrofílico

A proteína, nessas condições de rotação do substrato, como mostra a figura 3.20, foi adsorvida na região central e nas bordas, mas não recobriu completamente o substrato, como pode ser visto na figura 3.20 c de dimensões $4\mu\text{m}^2$. Sua configuração é toroidal.

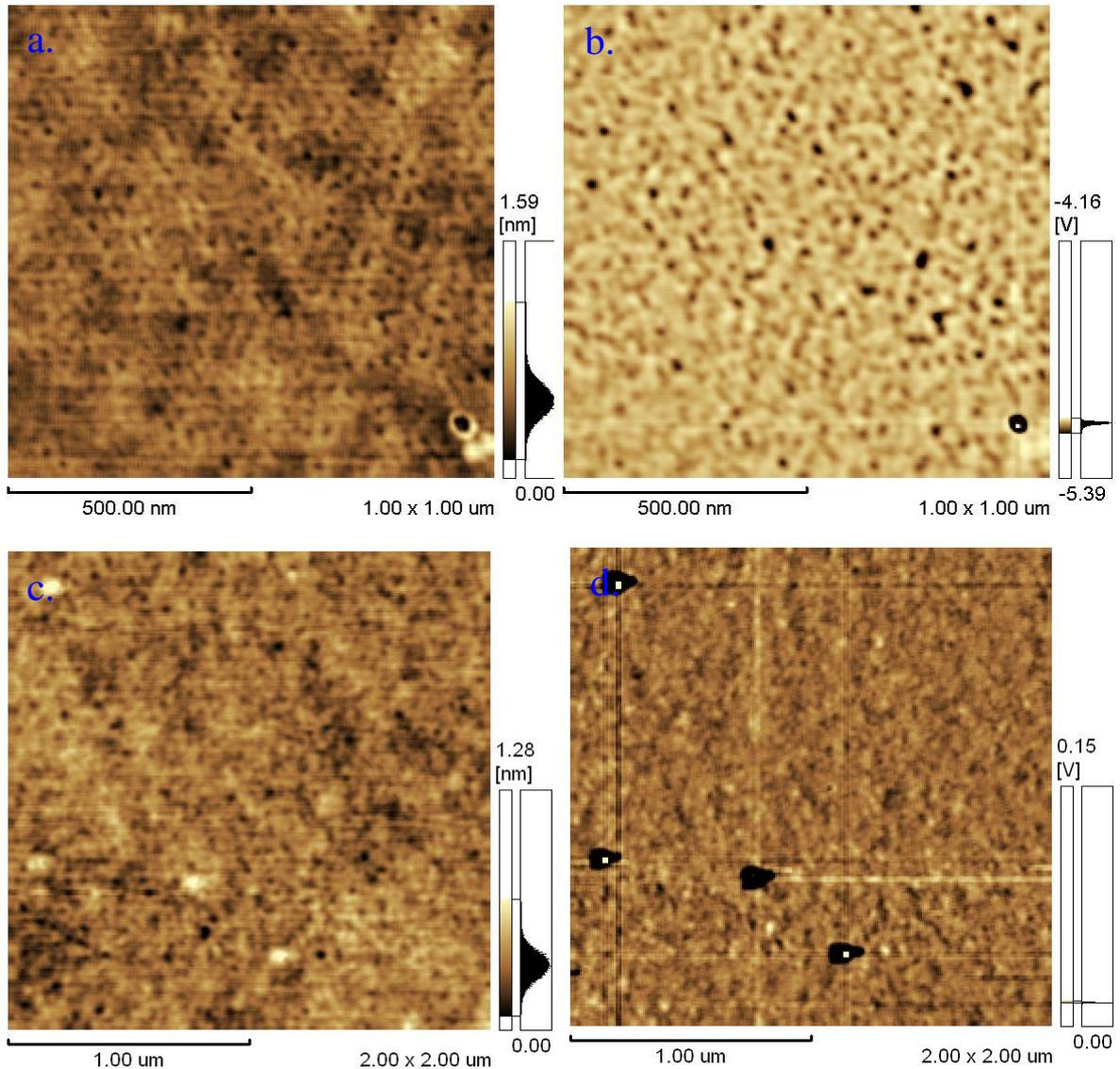


Figura 3.20: Imagem de AFM, modo dinâmico, da amostra de proteína em silício (111) hidrofílico a 500rpm. A adsorção ocorreu nas bordas e região central, mas é visível a superfície do substrato. **(a)**. Imagem de dimensões $(1,00 \times 1,00) \mu\text{m}$ da região central da amostra. **(b)**. Imagem de fase da fig.a **(c)**. Imagem de dimensões $(2,00 \times 2,00) \mu\text{m}$ da borda **(d)**. Imagem de fase da figura c.

Velocidade 1000rpm, substrato hidrofílico

Com esta velocidade de rotação, a proteína recobriu completamente o substrato de silício na região central e bordas para uma área de aproximadamente $1 \mu\text{m}^2$, como mostra a figura 3.21. Sua configuração é circular formando anéis na região central de dimensões em torno de 68 nm de diâmetro e 1nm de altura relativa à camada inferior de proteínas.

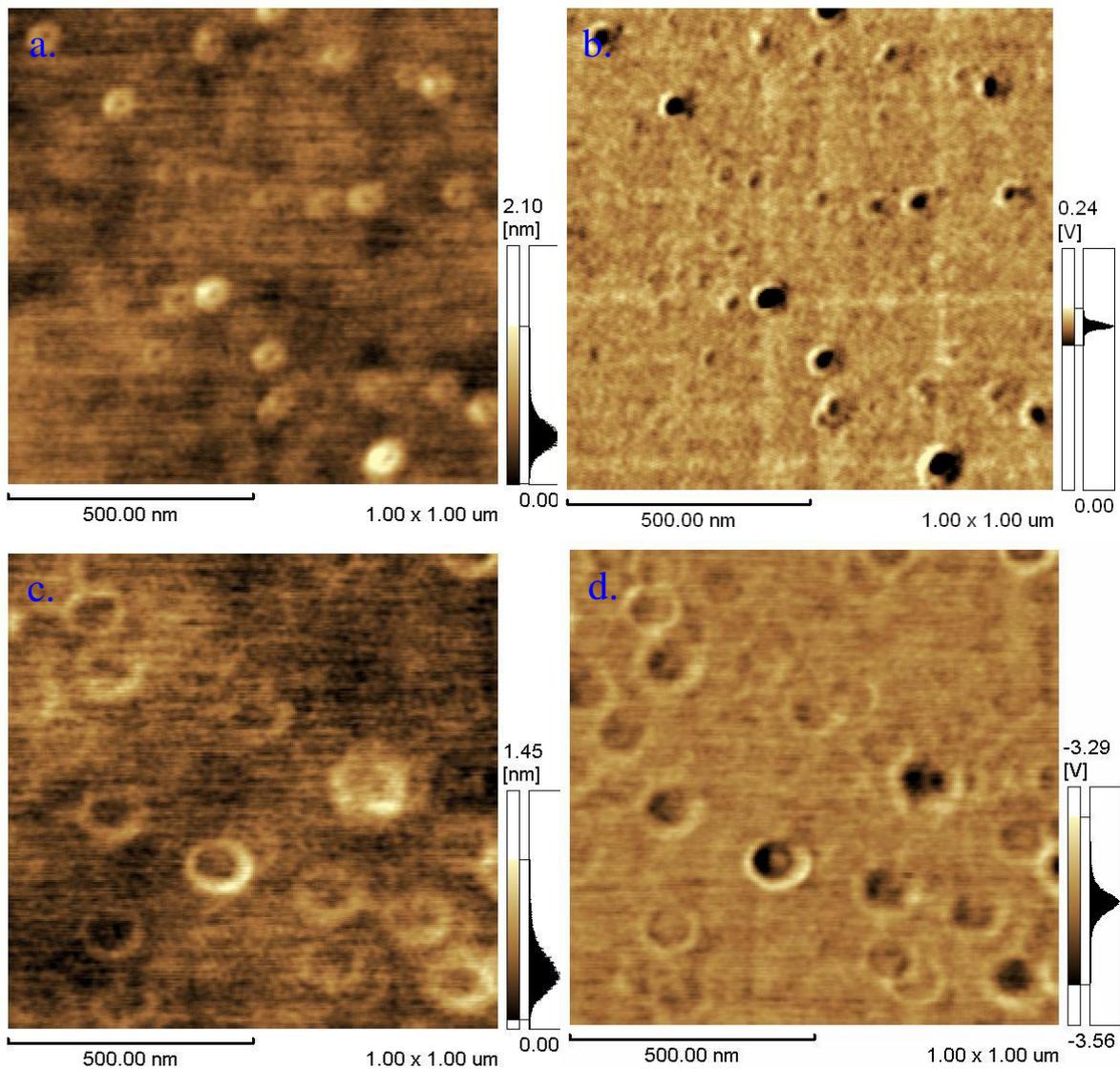


Figura 3.21: Imagem de AFM, modo dinâmico, da amostra de proteína em silício (111) hidrofílico a 1000rpm. A adsorção ocorreu regularmente na região central e bordas (a). Imagem de dimensões (1,00 x 1,00) μm da região central da amostra. (b). Imagem de fase da fig.a. (c). Imagem de dimensões (1,00 x 1,00) μm da borda (d). Imagem de fase da figura c.

Na região da borda, provavelmente pela força radial ser maior, os anéis possuem um diâmetro em torno de 130 nm e altura em torno de 1 nm e espessura de 40 nm, (figura 3.22). Nesta amostra uma unidade protéica com diâmetro aparente em torno de 10 a 28 nm foi medida, (figura 3.23). Vale salientar que não foram descontados dessas medidas os efeitos de convolução da ponta nem foi levada em conta a distorção proveniente do tratamento de imagem efetuado.

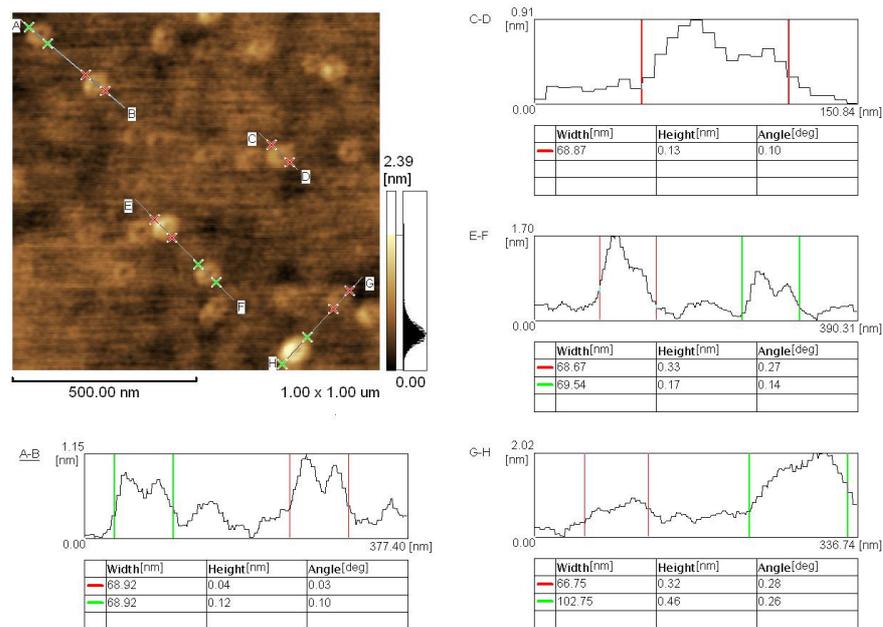


Figura 3.22: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.21(a). Imagem de dimensões (1, 00 x 1, 00) μm . A altura é relativa à camada inferior de proteínas.

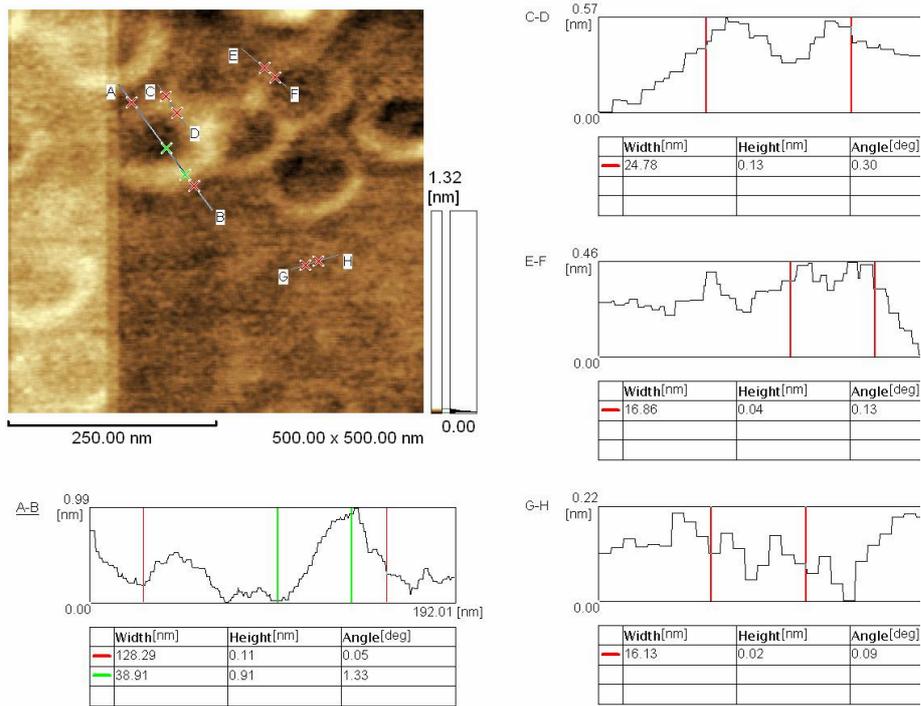


Figura 3.23: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.21. Imagem de dimensões (500, 00 x 500, 00) nm. A altura é relativa à camada inferior de proteínas

Velocidade 1500rpm, substrato hidrofílico

A proteína para esta velocidade se adsorveu minimamente nas bordas do substrato, (figura 3.24), e se adsorveu no centro do substrato formando anéis como pode ser visto na figura 3.24 (a).

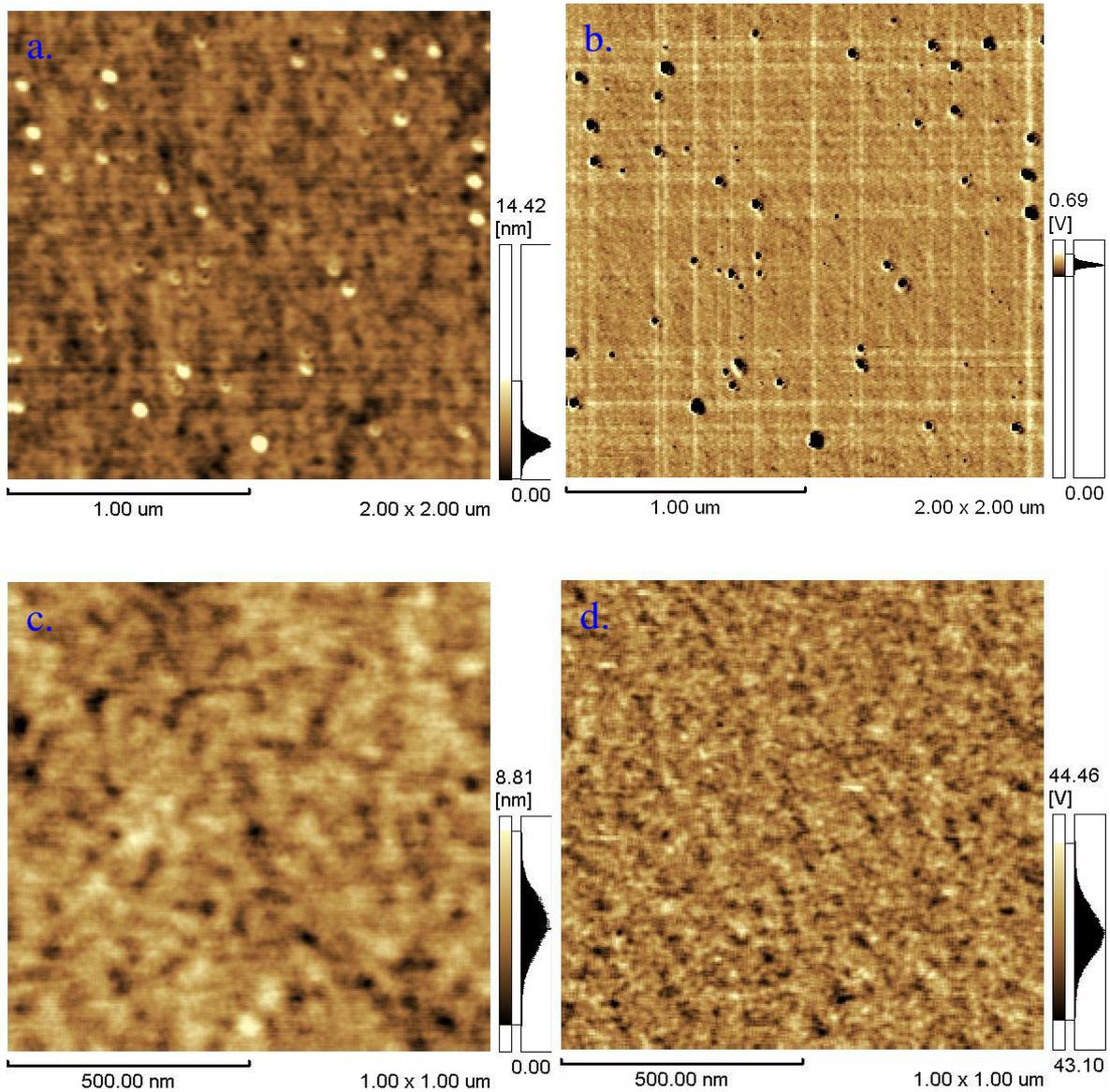


Figura 3.24: Imagem de AFM, modo dinâmico, da amostra de proteína em silício (111) hidrofílico a 1500rpm. A adsorção ocorreu nos centros e quase pouco nas bordas do substrato (a). Imagem de dimensões (2,00 x 2,00) μm da região central da amostra. (b). Imagem de fase da fig.a (c). Imagem de dimensões (1,00 x 1,00) μm da borda (d). Imagem de fase da figura c.

Velocidade 2500rpm, substrato hidrofílico

A proteína nessas condições, pela investigação visual das bordas e centro da amostra, (figura 3.25), quase não se adsorveu no centro do substrato onde ela foi inicialmente pipetada. A adsorção aconteceu nas bordas e de modo não homogêneo, formando aglomerados. Esta velocidade parece inadequada aos objetivos de formação de um filme fino de proteína homogêneo e uniforme.

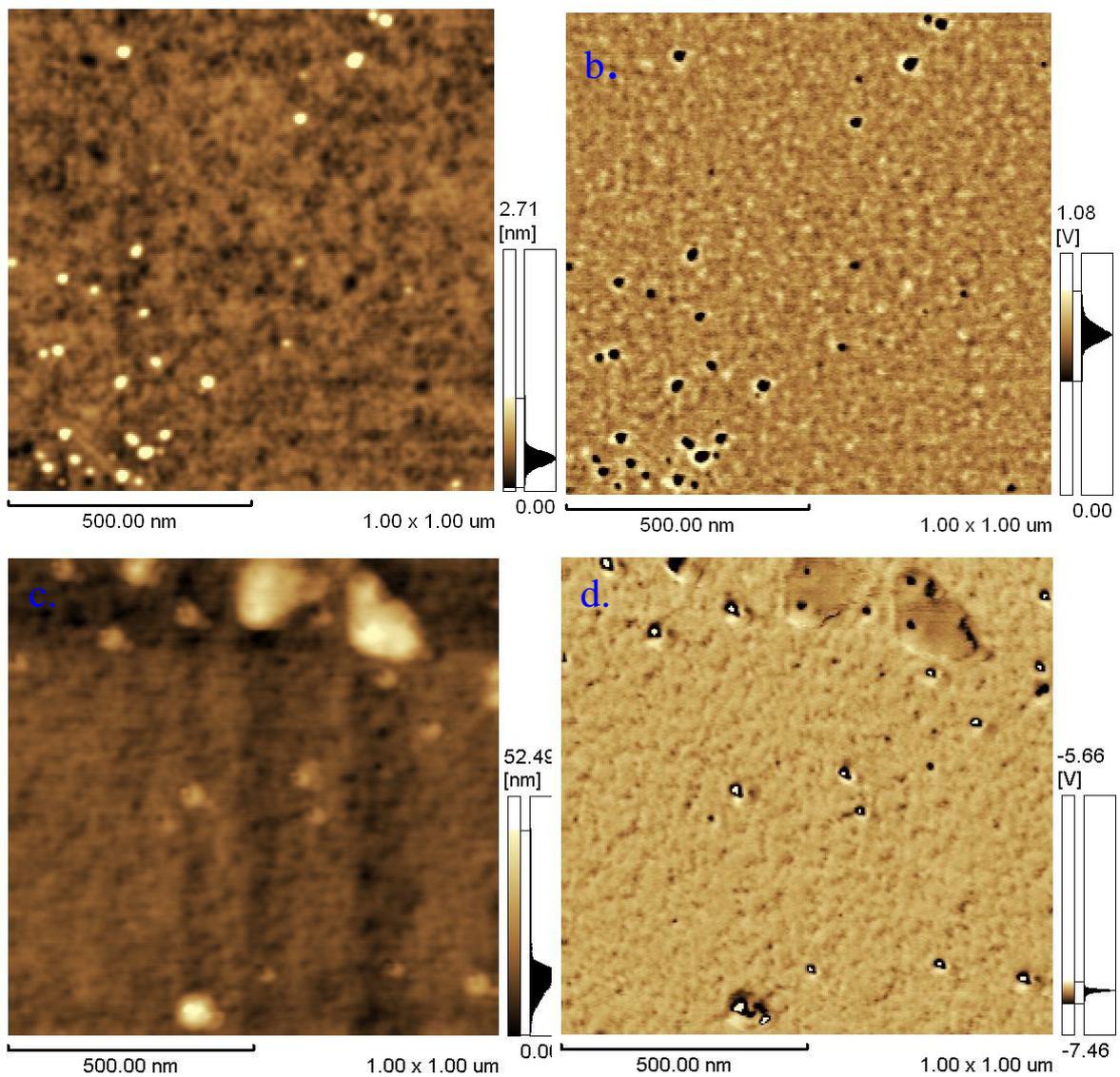


Figura 3.25: Imagem de AFM, modo dinâmico, da amostra de proteína em silício (111) hidrofílico a 2500rpm. Adsorção nas bordas não ocorreu homogeneamente (a). Imagem de dimensões (1,00 x 1,00) μm da região central da amostra. (b). Imagem de fase da fig.a (c). Imagem de dimensões (1,00 x 1,00) μm da borda (d). Imagem de fase da figura c.

Velocidade 2500 rpm, substrato hidrofóbico

A proteína GlnB-Hs durante a interação com o substrato hidrofóbico foi adsorvida preferencialmente em uma só região do substrato: em uma das bordas e formando fios, como mostram as figuras 3.26 e 3.27. A provável razão para este tipo de agregação é que a proteína superficialmente, como foi visto no capítulo 1, possui as faces superiores e inferiores hidrofílicas e as laterais menos hidrofílicas. Portanto, ela adotou uma configuração onde as regiões mais hidrofílicas não entrariam em contato

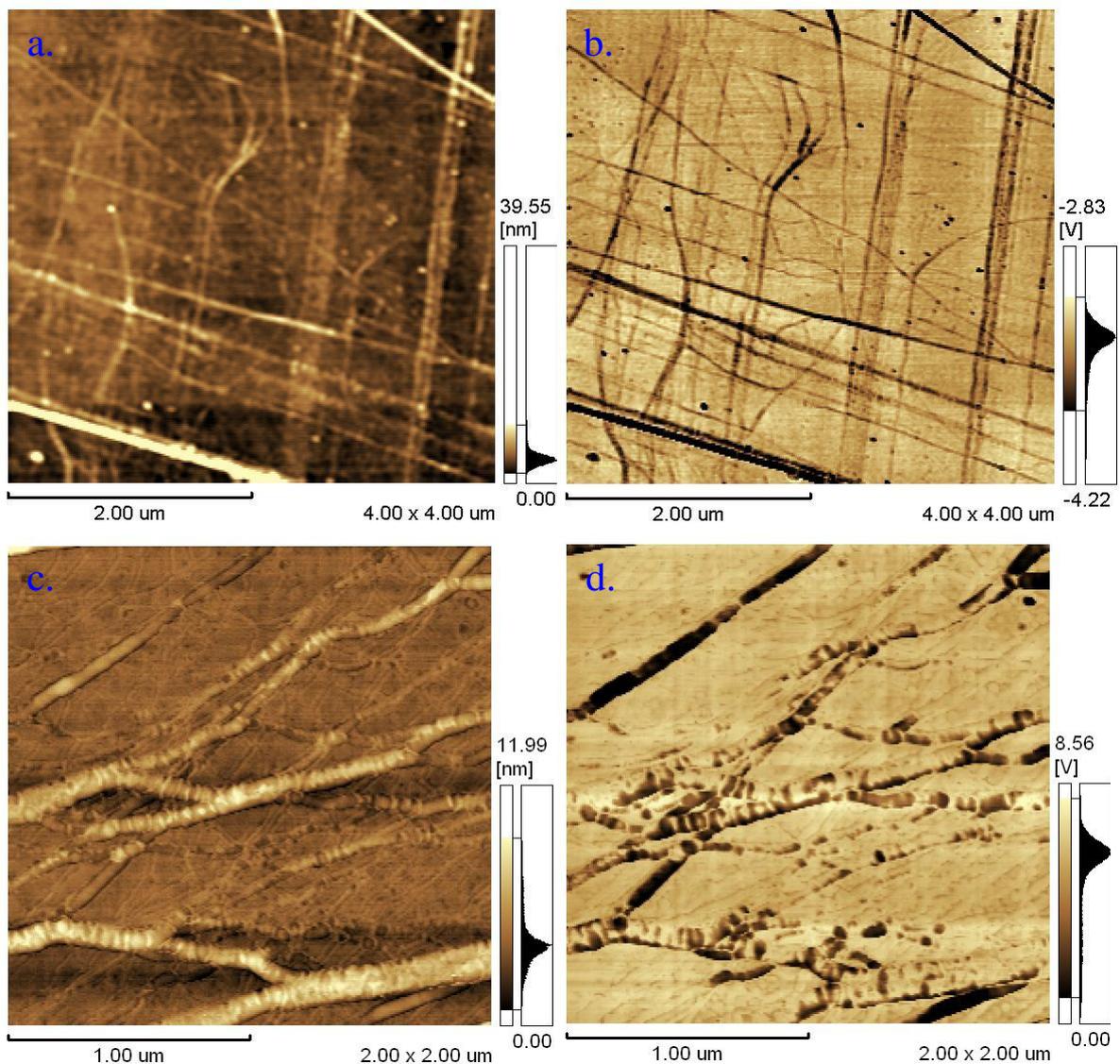


Figura 3.26: Imagem de AFM modo dinâmico da amostra de proteína em silício (111) hidrofóbico. Os fios são formados com a configuração face-lateral. (a). Imagem de dimensões (4,00 x 4,00) μm , da borda da amostra. (b). Imagem de fase da fig.a (c). Imagem de dimensões (2,00 x 2,00) μm, de outra região da borda (d). Imagem de fase da figura c.

com a superfície hidrofóbica, ou seja, formando fios com sua superfície lateral tocando o substrato. Estes fios não estão desnaturados, pois a largura dos fios mais finos como mostra a figura 3.27 é em torno de 56 nm e altura de 27 nm. Vê-se também, (figuras 3.26 e 3.27) que são unidades independentes que estão se agregando e não um fio contínuo, diferentemente de como foi visto no caso da proteína desnaturada, (figura 3.18) que possui de largura em torno de 30 nm.

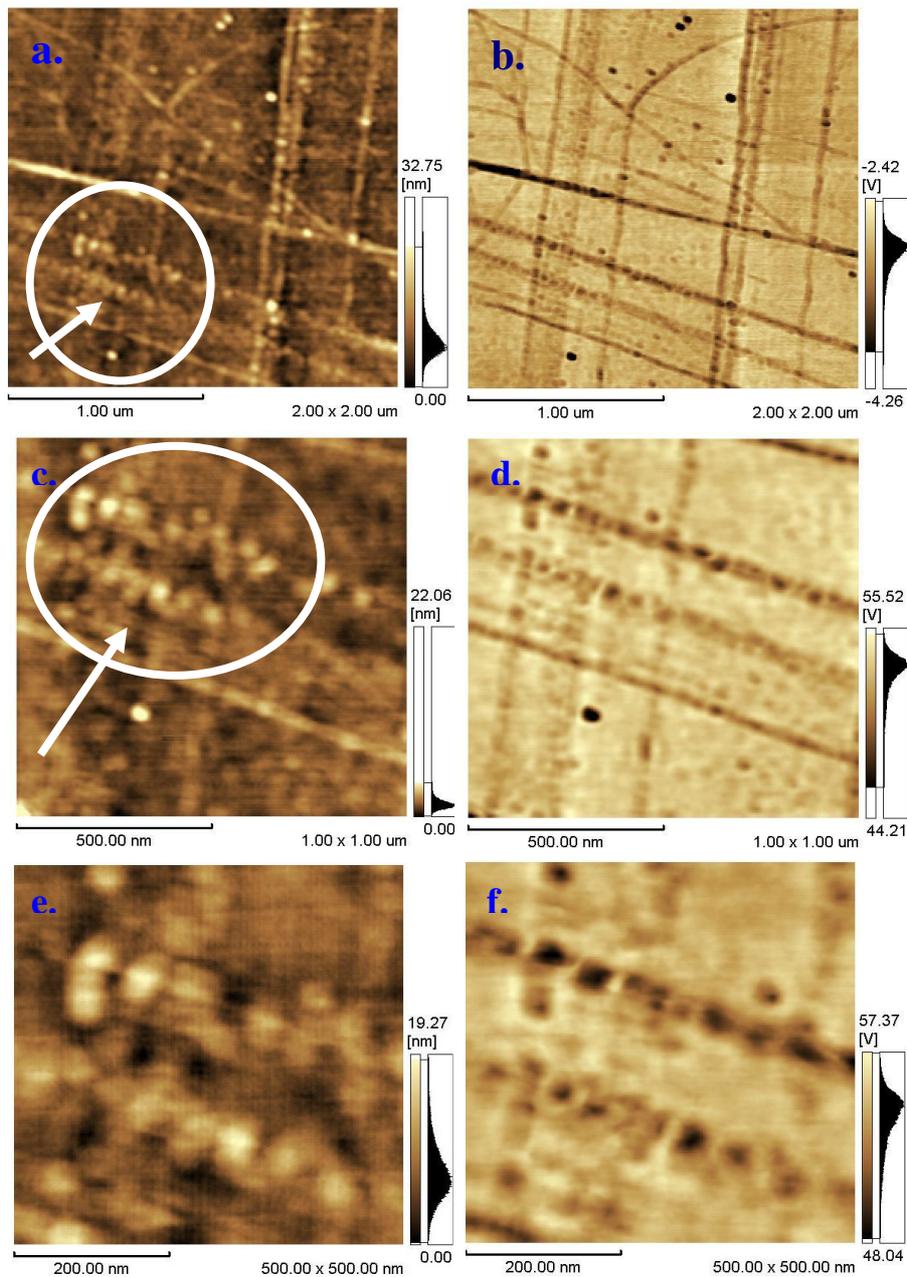


Figura 3.27: Imagem de AFM modo dinâmico da amostra de proteína em silício (111) hidrotóxico. Os fios são formados com a configuração face-lateral (a). Imagem de dimensões (2,00 x 2,00) μm . (b). Imagem de fase da fig.a c. Imagem de dimensões (1,00 x 1,00) μm zoom da fig.a. (d). Imagem de fase da figura c. (e). Imagem de dimensões (500,00 x 500,00) nm zoom da fig.c. (f). Imagem de fase da fig.e.

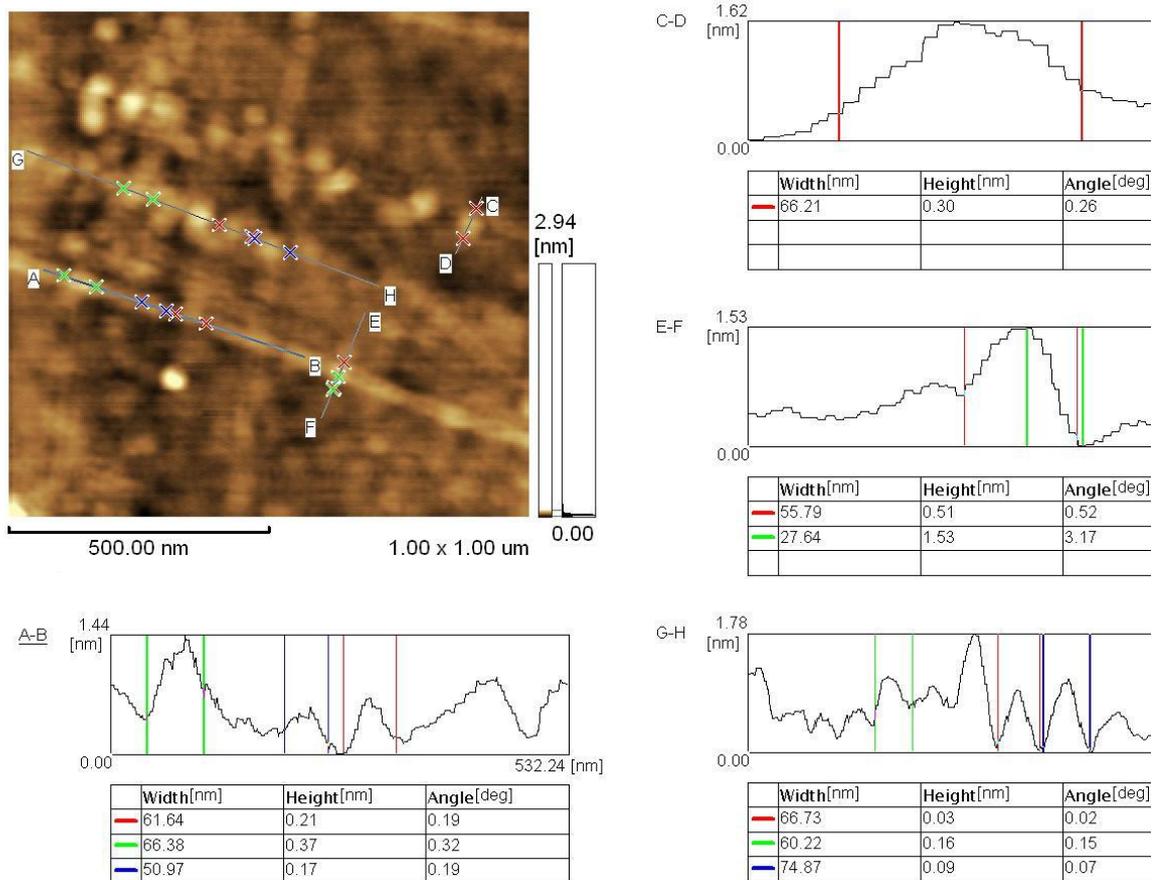


Figura 3.28: Dimensões dos agregados vistos na figura 3.27©. Imagem de dimensões (1,00 x 1,00) μm . A altura é relativa a camada inferior de proteínas.

A região central do silício hidrofóbico adsorveu poucas proteínas como pode ser visto pela figura 3.29 abaixo:

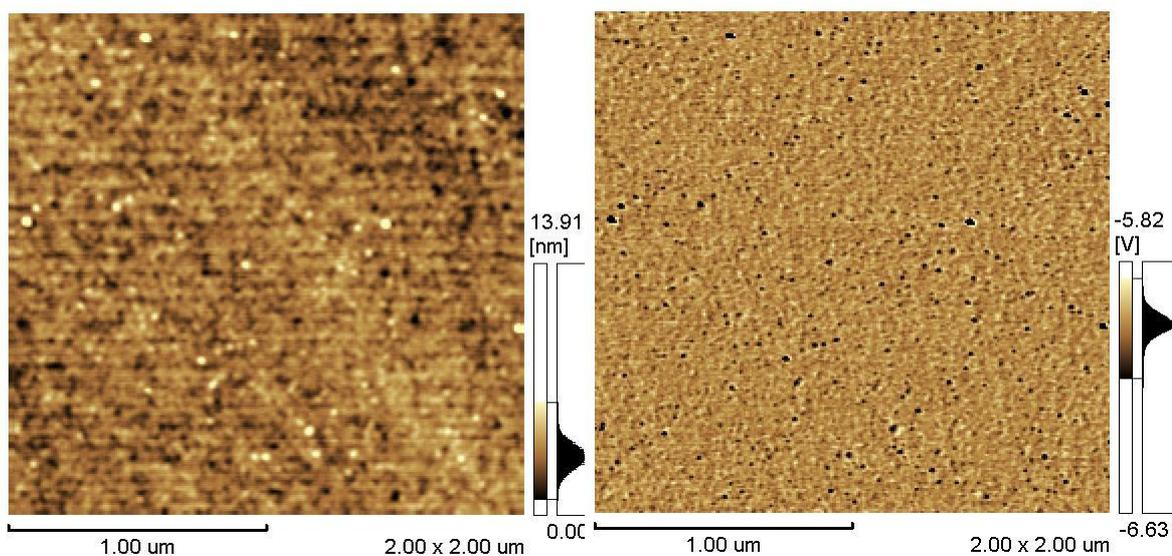


Figura 3.29: Imagem AFM, modo dinâmico, (a). Região central do substrato de silício hidrofóbico (111), imagem de dimensões (2,00 x 2,00) μm . (b). Imagem de fase da fig.a, mesmas dimensões.

Conclusão do capítulo 3

A adsorção da proteína GlnB-Hs no substrato de silício (111) é um processo contínuo com formação de algumas camadas. Alguns padrões repetitivos aparecem como resultado do processo de adsorção. Eles são formados por arranjos circulares, lineares e outros arranjos complexos de proteínas com forma de anéis ("donuts"). Estes anéis parecem ser o motivo básico dos agregados circulares que variam entre 85 nm a 180 nm de largura e com alturas até 3 nm. É importante observar que as diferenças em altura estão relacionadas com a camada inferior de proteína. A adsorção no Si (111) hidrofílico é suposta ser controlada basicamente pela configuração da proteína com a face para cima. As formações destes padrões repetitivos são favorecidas por dois fatores: grande concentração de proteína e tempos longos de adsorção. Embora a proteína GlnB-Hs tenha sido depositada aleatoriamente durante a adsorção, é provável que o seu arranjo na superfície de Si (111) apresente uma tendência ao empacotamento. Este arranjo parece ser favorecido pelo substrato que possui um empacotamento fechado (McPherson, 1998), (Haggerty, 1991) e também a adsorção parece ser influenciada pela própria configuração polar ponta-cabeça que ela adota durante o processo de adsorção (Yetes, 2002).

A proteína apresentou uma configuração de agregação totalmente diferente em um substrato amorfo (vidro). Ela demonstrou a tendência a formação de flocos com geometria losangular. Estes flocos possuem dimensões em torno de 70 nm no diâmetro maior e 2,18 nm de altura. Por sua vez, eles parecem ser formados por uma estrutura interna composta de 4 unidades de proteína com 30 nm de largura. Neste substrato a proteína não apresentou a formação de linhas, nem de formas circulares, típicas do substrato de silício.

Quando a proteína é desnaturada pelo uso de temperatura, ela apresenta a formação de fios que provavelmente estão relacionados com a estrutura primária da proteína. Estes fios parecem coalescer preferencialmente pelos lados formando uma massa compacta.

A proteína GlnB-Hs no Si (100) apresentou uma agregação em formas de discos de 140 nm que se superpõem parcialmente. Não foi observada a formação de linhas no caso desta superfície. A proteína parece recobrir a superfície de forma bastante regular não se notando uma conformação preferencial em uma direção. Se existirem mudanças conformacionais devido a este fator, estas devem ser mínimas e o uso do infravermelho ou Raios-X poderão elucidar este ponto.

O uso da técnica de "spin-coating" e da investigação da velocidade mais adequada para recobrir o substrato o mais regularmente possível demonstraram que a velocidade de 1000 rpm parece ser a mais adequada, pois a inspeção pela visualização das bordas e centro da amostra mostra que a camada de proteína está distribuída regularmente, esta investigação foi feita concomitantemente com XPS (próximo capítulo). O padrão de círculos se repetiu como no caso do substrato estacionário (figuras 3.11 e 3.21) o que indica que este processo não deve interferir de forma apreciável na auto-agregação da proteína. Por outro lado, o uso do substrato hidrofóbico influenciou na maneira com a proteína se depositou sobre ele, a inspeção das imagens de outras deposições indica que a proteína não está desnaturada, figuras (3.18, 3.19 e 3.27), e que não recobre homogeneamente o substrato (figuras 3.21, 3.28 e 3.25). Ela parece adotar uma configuração com sua face menos eletronegativa (lateral) voltada para o substrato.

Capítulo 4

Espectroscopia de Fotoelétrons (XPS) da Proteína GlnB-Hs sobre Silício

Inicialmente será apresentada uma introdução à técnica XPS com as equações necessárias para a compreensão dos resultados experimentais. Em seguida, é apresentada uma discussão dos espectros XPS obtidos da proteína GlnB-Hs depositada por "spin-coating" sobre silício (111) baseada nas noções da eletronegatividade superficial e da estrutura da proteína do capítulo 1. Os resultados dos picos de fotoelétrons do Si2p provenientes do substrato de silício e do N1s da proteína fornecerão uma estimativa da fração de cobertura do substrato em função da velocidade de rotação deste. Um possível mecanismo de adsorção da proteína no substrato de silício será também discutido, baseado na variação em intensidade do pico do fotoelétron proveniente do nitrogênio N1s protonado.

4.1 Introdução à técnica

XPS é uma técnica de análise e caracterização de superfícies bastante utilizada e difundida. Dentre as vantagens da técnica pode-se citar: produz informação sobre ligações químicas, é sensível à superfície, é uma técnica quantitativa e a interpretação e teoria são relativamente fáceis e rápidas. Porém, existem alguns inconvenientes: a amostra deve ser estável sob alto vácuo, a área iluminada não pode ser focalizada, a resolução em energia em torno de 0.1 e 1eV e o carregamento da amostra pode ser um problema para poder se obter as energias de ligação de referência (Andrade, 1985).

Esta técnica é baseada no efeito fotoelétrico. Algumas interações básicas possíveis do fóton com os elétrons da matéria, sem contar o efeito Auger e fluorescência são as seguintes:

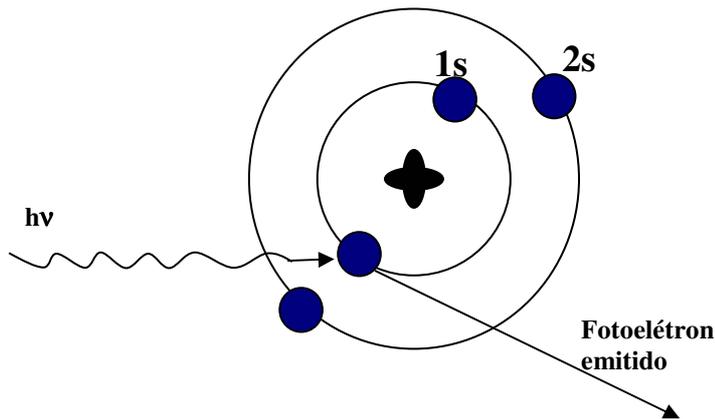


Figura 4.1: Diagrama da interação do fóton de energia $h\nu$ com a matéria criando um fotoelétron de energia cinética $E_k = h\nu - E_b$ (Andrade, 1985).

- O fóton atravessa o átomo sem interagir nem com o núcleo, nem com o orbital atômico significativamente.
- Efeito Compton : o fóton pode atravessar o orbital atômico e interagir com um elétron perdendo energia de forma parcial (espalhamento inelástico).
- O fóton interage com o elétron, no orbital atômico e transfere toda a sua energia para o elétron (espalhamento elástico). Um fotoelétron é emitido. Este processo é o que governa o XPS, a interação que dá origem ao efeito fotoelétrico está esquematizada na figura 4.1.

Usualmente, a energia do fóton é maior do que a energia de ligação do elétron no átomo. A emissão do fotoelétron, então, é produzida com uma energia cinética E_K igual à diferença entre a energia do fóton e a energia de ligação, E_b :

$$E_b = h\nu - E_k - \phi_w \quad (4.1.1).$$

onde E_b é a energia de ligação do elétron emitido no orbital atômico, E_k é a energia cinética medida no detector, $h\nu$ é a energia do fóton incidente, h é a constante de Planck, ν é a frequência da radiação e ϕ_w é a função trabalho do material.

Através da medida da energia cinética pode-se calcular a energia de ligação e relacioná-la com o átomo emissor e suas ligações químicas.

4.2 Descrição de um experimento básico

A amostra sólida é fixada em um porta-amostra de alumínio por meio de uma fita adesiva condutora e transferida para uma câmara de ultra alto-vácuo (10^{-9} milibar). Uma fonte de Raios-X moles, geralmente de magnésio (1253,6 eV) ou alumínio (1486,7 eV), emitindo na raia K_{α} , banha a amostra com a radiação. Os fótons interagem com a amostra e os fotoelétrons emitidos são coletados por um analisador de energia.

O analisador tem o papel de discriminar o número de elétrons emitidos em função de sua energia cinética. Fazendo uso da eq. 4.1.1, a energia dos fotoelétrons é relacionada ao elemento químico e suas ligações químicas. A área integrada sob os picos característicos, quando aplicados os fatores de correção necessários, fornecerá a fração molar deste elemento químico presente na amostra.

4.3 Instrumentação

O número de fótons (**I**) chegando ao detector por unidade de tempo das linhas de emissão do espectro XPS depende de três fatores principais (Nefedov, 1988): características da amostra (**F₁**), seção de choque de fotoionização (**F₂**) e fator instrumental (**F₃**), isto é,

$$\mathbf{I} = \mathbf{F}_1\mathbf{F}_2\mathbf{F}_3 \quad (4.3.1.).$$

A análise quantitativa dos compostos químicos presentes pode ser realizada utilizando as linhas de emissão do espectro fotoelétrico, se levarmos em conta estes fatores. Estes três fatores principais serão descritos nos próximos parágrafos.

Fator de instrumentação F_3

O fator de instrumentação é geralmente fornecido pelo fabricante do aparelho. Ele é definido como sendo (Nefedov, 1988):

$$F_3 = I_0 \left(\frac{A_0}{\text{sen } \alpha} \right) [\Omega_0(E_k) F(E_k)] \quad (4.3.2).$$

$$S = \left(\frac{A_0}{\text{sen } \alpha} \right) \quad (4.3.3).$$

onde S é a área efetiva da amostra vista pelo detector, α é o ângulo entre a superfície da amostra e a direção de detecção dos fotoelétrons, I_0 é a densidade de radiação incidindo por área da amostra, A_0 é a área de entrada no detector definida pelas fendas de recepção, Ω_0 é o ângulo sólido de emissão dos fotoelétrons na direção do detector (este ângulo depende do tipo de detector), $F(E_k)$ é a eficiência do detector.

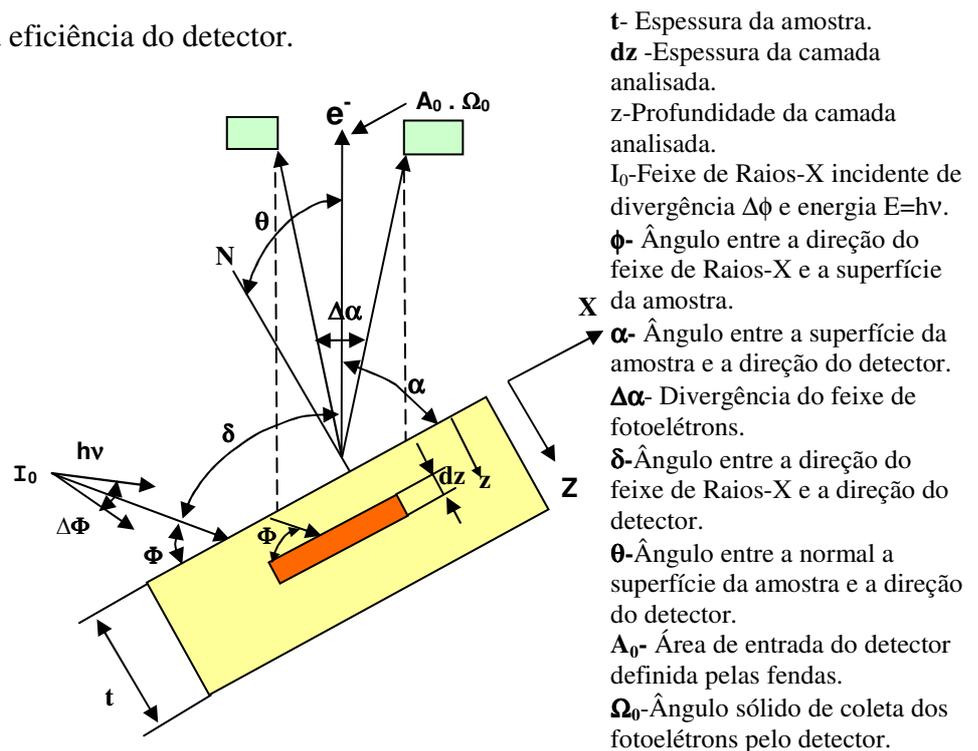


Figura 4.2: Desenho esquemático mostrando os principais parâmetros da geometria de um espectrômetro XPS (Nefedov, 1988).

Seção de choque diferencial de fotoionização F_2

A seção de choque diferencial de fotoionização, que determina o fluxo de fotoelétrons por unidade de tempo e de ângulo sólido como resultado da transição de N -elétrons do estado inicial ao estado final sob o impacto de um fóton $h\nu$ pode ser definida pela seguinte relação:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \left(\frac{c'}{h\nu} \right) \sum_{i,f} \left| \hat{e} \langle \Psi^f(N_k) | \sum \vec{\nabla}_k | \Psi^i(N_k) \rangle \right|^2 \quad (4.3.5).$$

c' é uma combinação de constantes, h é a constante de Planck, ν é a frequência da onda eletromagnética incidente, \hat{e} é o vetor unitário paralelo ao campo elétrico \hat{E} , k é o índice do somatório dos elétrons, e o elemento de matriz é a probabilidade de transição do fotoelétron do estado i (inicial) ao estado f (final).

Realizando os cálculos para esta matriz de transição, chegaremos à expressão final para a seção de choque diferencial (Nefedov, 1988):

$$F_2 = \frac{d\sigma}{d\Omega} = K_e \left(\frac{\sigma_{nl}}{4\pi} \right) \left[1 + \frac{1}{2} \beta \left(\frac{3}{2} \text{sen}^2 \delta - 1 \right) \right] \quad (4.3.6).$$

onde δ é a direção entre os fótons de Raios-X e os fotoelétrons, β é o parâmetro de assimetria característico do orbital atômico, σ_{nl} é a seção de choque total de fotoionização de Scofield, a qual é tabulada, K_e é uma constante que leva em conta o rendimento da linha de emissão nl .

Vale salientar que, para o cálculo dos elementos dessa matriz, utiliza-se o teorema de Koopman. Como o evento de foto-emissão é muito rápido, ocorrendo entre 10^{-16} e 10^{-14} s, durante este período os elétrons do átomo estão fixos em suas posições e o fenômeno de

relaxação pode ser em princípio desconsiderado. Na prática, existem dois mecanismos de relaxação: fluorescência e Auger (Andrade, 1985).

Características da amostra F_1

Seja dN o número de fotoelétrons que sofrem interações inelásticas quando percorrem o caminho dL no sólido. No caso de uma amostra homogênea, este número é proporcional a NdL e inversamente proporcional a Λ , que é livre caminho médio do fotoelétron no sólido sem experimentar colisões inelásticas (Nefedov, 1988).

Neste caso, podemos modelar o número de elétrons como sendo dado pela seguinte expressão:

$$dN = \frac{-NdL}{\Lambda} = -\frac{Ndz}{\Lambda \sin \alpha} \quad (4.3.7).$$

Se integrarmos essa expressão, chegaremos à seguinte relação:

$$N_z = N_0 e^{\left(\frac{-z}{\Lambda \sin \alpha}\right)} \quad (4.3.8).$$

onde N_z/N_0 é a fração de elétrons que saíram da amostra depois de percorrer uma distância $L=z/\sin\alpha$ na amostra.

Esta relação, (4.3.8), também é válida, desde que z seja da ordem de Λ , em um volume Sdz a uma distância z para a superfície da amostra, onde S é área efetiva da amostra:

Do número total de dN_0 fotoelétrons somente dN_z chegam à superfície sem sofrer colisões inelásticas:

$$dN_z = D e^{\left(\frac{-z}{\Lambda \sin \alpha}\right)} dz \quad (4.3.9).$$

$$D = \mathfrak{S} \left(\frac{d\sigma_{n,l}}{d\Omega} \right) \Omega_o n S$$

onde $S d_z$ é o volume analisado da amostra sob o feixe de Raios-X, Ω_o é o ângulo sólido de emissão dos fotoelétrons, n é o número de átomos A por unidade de volume, $\frac{d\sigma_{n,l}}{d\Omega}$ é a seção diferencial de choque de fotoionização, \mathfrak{S} é número de fótons incidentes por segundo e por unidade de área.

$$dN_z = D e^{-\left(\frac{z}{\Lambda \text{sen}\alpha}\right)} dz \quad (4.3.10).$$

Livre caminho médio do fotoelétron

Quando o fotoelétron passa através da matéria, ele pode interagir elasticamente e ou inelasticamente. Se definirmos a seção de choque inelástica de espalhamento como sendo Ξ_i , então o livre caminho médio inelástico será definido pela expressão (Nefedov, 1988):

$$\Lambda_n = \frac{M}{\left(\sum_i \Xi_n^i \right) \rho A_v} \quad (4.3.11).$$

onde A_v é o número de Avogadro, M é a massa atômica molecular, Ξ é a seção de choque inelástica do átomo correspondente e ρ é a densidade.

A equação TPP-2M proposta por (Tanuma et al., 1993) para o cálculo do livre caminho médio do fotoelétron (Λ) em ângstrons em função da energia E do elétron em (eV) e das características do material.

$$\Lambda = \frac{E}{E_p^2 \left[\beta \ln(\xi E) - \left(\frac{C}{E}\right) \right] + \left(\frac{D}{E^2}\right)} \quad (4.3.12).$$

onde os fatores da fórmula são definidos como:

$$\begin{aligned}
\beta &= -0,1 + \frac{0,944}{(E_p^2 + E_g^2)^{\frac{1}{2}}} + 0,069\rho^{0,1} \\
\xi &= 0,191\rho^{-0,5} \\
C &= 1,97 - 0,91U \\
D &= 53,4 - 20,8U \\
U &= \frac{N_V\rho}{M} \\
E_p &= 28,8\left(\frac{N_V\rho}{M}\right)^{\frac{1}{2}}
\end{aligned} \tag{4.3.13}.$$

E_p é a energia de um plasmon criado por um elétron livre em eV, ρ é a densidade em (g/cm³), N_V é o número de elétrons de valência por átomo, no caso de um elemento, e de uma molécula, no caso de um composto, M é o peso atômico molecular, E_g é a energia da banda proibida (eV).

Intensidade de uma linha do espectro de XPS

A intensidade experimental de uma linha de emissão para uma amostra semi-infinita medida num espectro XPS é determinada levando-se em conta os três fatores descritos anteriormente (característica da amostra, fator instrumental e seção de choque diferencial de ionização):

$$I = F_1 F_2 F_3 \text{ onde, } F_3 = \frac{N}{D} n \tag{4.3.14}.$$

$$I = I_0 \left(\frac{A_0}{\sin \alpha} \right) \Omega_0(E_K) F(E_k) K_e \frac{\sigma_{nl}}{4\pi} \left[1 + \frac{1}{2} \beta \left(\frac{2}{3} \sin^2 \delta - 1 \right) \left(\frac{N}{D} \right) n \right] \tag{4.3.15}.$$

onde F_3 é o fator característico da amostra e será dado pela integração da equação(4.3.10) de acordo com as características do filme fino.

No caso em que se tem uma camada de proteína não-homogênea com uma fração de cobertura superficial Y e espessura t , sobre um substrato de silício, podemos modelar o número n de elétrons provenientes do orbital N1s que foram ejetados da seguinte forma.

Integra-se a equação 4.3.10 com respeito a $z/\text{sen}\alpha$ de zero até $t/\text{sen}\alpha$, dando como resultado:

$$\left(\frac{N}{D}\right) = \Lambda_{N1s}^P \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\Lambda_{N1s}^P \text{sen}\alpha}\right) \right] \text{sen}\alpha \quad (4.3.16).$$

onde Λ_{N1s}^P é o livre caminho médio inelástico do fotoelétron N1s com respeito à camada de proteína.

O número de elétrons provenientes do orbital Si 2p do silício será modelado por sua vez da seguinte forma:

$$\frac{N}{D} = \Lambda_{Si2p}^S \left[1 - Y + Y e\left(\frac{-t}{\Lambda_{Si2p}^S \text{sen}\alpha}\right) \right] \text{sen}\alpha \quad (4.3.17).$$

A intensidade I , portanto destes dois termos será então para os dois casos:

$$I(Si_{2p}) = I_0 \left(\frac{A_0}{\text{sen}\alpha}\right) \Omega_0(E_K) F(E_k) K_e \frac{\sigma_{nl}}{4\pi} \left[1 + \frac{1}{2} \beta \left(\frac{2}{3} \text{sen}^2 \delta - 1\right) \right] \Lambda_{Si2p}^S \left[1 - Y + Y e\left(\frac{-t}{\Lambda_{Si2p}^S \text{sen}\alpha}\right) \right] \text{sen}\alpha n \quad (4.3.18).$$

$$I(N_{1s}) = I_0 \left(\frac{A_0}{\text{sen}\alpha}\right) \Omega_0(E_K) F(E_k) K_e \frac{\sigma_{nl}}{4\pi} \left[1 + \frac{1}{2} \beta \left(\frac{2}{3} \text{sen}^2 \delta - 1\right) \right] Y \Lambda_{N1s}^P \left[1 - e\left(\frac{-t}{\Lambda_{N1s}^P \text{sen}\alpha}\right) \right] \text{sen}\alpha n \quad (4.3.19).$$

Para compactar estas equações podemos definir os seguintes fatores:

i_A , fator de sensibilidade para o elemento atômico A, definido pela expressão:

$$i_A = I_0 A_0 \Omega_0 (E_K) F(E_k) \frac{K_e}{4\pi} \left[1 + \frac{1}{2} \beta \left(\frac{2}{3} \text{sen}^2 \delta - 1 \right) \right] \quad (4.3.20).$$

Esta expressão é composta da função de transmissão instrumental, a qual depende da energia cinética, e também é composta das características de fotoemissão do elemento atômico. O parâmetro β é característico do orbital atômico e do número atômico. O termo angular é constante para cada aparelho, mas pode variar de um espectrômetro a outro, ele é o ângulo entre os fótons de Raios-X incidentes e os fótoelétrons (Andrade, 1985). Estes valores são tabulados e fornecidos pelo fabricante do equipamento.

As equações para a intensidade das linhas de emissão dos fotoelétrons para o Si e N serão escritas como:

$$I(N_{1s}) = Y i_N \sigma_{N1s} \Lambda_{N1s}^P \left[1 - e^{\left(\frac{-t}{\Lambda_{N1s}^P \text{sen} \alpha} \right)} \right] n_N \quad (4.3.21).$$

$$I(Si_{2p}) = i_{Si2p} \sigma_{Si2p} \Lambda_{Si2p}^S \left[1 - Y + Y e^{\left(\frac{-t}{\Lambda_{Si2p}^S \text{sen} \alpha} \right)} \right] n_{Si} \quad (4.3.22).$$

Para determinar a concentração relativa destes elementos, utiliza-se então o método de medida da intensidade integral que é uma informação extraída dos espectros experimentais. Dividindo-se as intensidades integradas pelos fatores de sensibilidade correspondentes vamos chegar à expressão final:

$$\frac{n_N}{n_{Si}} = \frac{I_{N1s}/i_N}{I_{Si2p}/i_{Si}} = \frac{I_{N1s}i_{Si}}{I_{Si2p}i_N} = \frac{i_{Si}\sigma_{N1s}Y\Lambda_{N1s}^P \left[1 - e^{\left(\frac{-t}{\Lambda_{N1s}^P \cos\theta}\right)} \right] n_N}{i_N\sigma_{Si2p}\Lambda_{Si2p}^S \left[(1-Y) + Ye^{\left(\frac{-t}{\Lambda_{Si2p}^P \cos\theta}\right)} \right] n_{Si}} \quad (4.3.22).$$

Devido à geometria do espectrômetro do LSI, $\text{sen}\alpha = \cos\theta$, pois o feixe incidente de Raios-X sobre a amostra faz um ângulo de 90° com o detector de fotoelétrons.

4.4 Resultados experimentais

Esta investigação teve como objetivos o estudo da influência da concentração de proteína em solução e o estudo da velocidade adequada do substrato para se ter uma camada regular de proteína e com a melhor fração possível de recobrimento. Esta investigação foi monitorada ao mesmo tempo por microscopia de força atômica.

Protocolo de adsorção da proteína GlnB-Hs no substrato de silício

Utilizaram-se bolachas de silício do tipo p, dopadas com boro e de $450 \mu\text{m}$ de espessura na orientação (111). As bolachas de foram clivadas em peças de 1 cm^2 . Depois da clivagem, os substratos foram limpos segundo o protocolo descrito no capítulo 1. Para tornar o substrato hidrofóbico, mergulhou-se o substrato em HF (ácido fluorídrico) por alguns minutos (Higashi et al., 1990). Água Millipore (MilliQ, $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) foi utilizada nas soluções de limpeza e também na lavagem dos substratos depois do procedimento de limpeza.

A solução de proteína foi diluída como descrita no capítulo 3. Uma gota de $10 \mu\text{L}$ de solução de proteína foi pipetada centralmente no substrato girando a velocidades pré-determinadas. Após a deposição, procedeu-se à lavagem.

Procedimento de medidas

As medidas de XPS foram executadas em um espectrômetro ESCA 3000 V.G. Microtech, no laboratório de Superfícies e Interfaces(LSI)-UFPR, usando a radiação monocromática AlK_{α} (1486,7 eV). Os espectros foram obtidos em passos de 100 eV. As concentrações dos elementos atômicos foram quantificadas após a subtração do “background” utilizando uma função Shirley. O vácuo na câmara foi em torno de 10^{-9} miliBar. Os experimentos XPS foram executados em duas séries. Na primeira série fez-se um estudo de concentração a uma velocidade fixa (3000 rpm). Neste estágio ainda não se sabia que a velocidade de 1000 rpm seria a velocidade mais conveniente para se ter o melhor recobrimento. O objetivo preliminar era ver se a camada de proteína seria detectada pelo aparelho e qual seria a concentração mais adequada para se ter o sinal do N 1s. Três amostras foram analisadas em concentrações diferentes, e os dados são apresentados na tabela 4.1a. Uma quarta amostra de silício sem proteína foi utilizada como referência. Na segunda série, fez-se um estudo com a concentração de proteína fixa (1000 pmol) para diferentes velocidades de rotação do substrato, os dados estão na tabela 4.1b. Uma amostra adicional de silício sem proteína também foi analisada como referência.

Primeira Série (a)		Segunda Série (b)		
Amostra Si (111)		Amostra		Velocidade
Velocidade do substrato 3000 rpm	Concentração (pMol)	Si (111) concentração de proteína 1000pMol	Hidrofilicidade do substrato	substrato (rpm)
1	1000 pMol	1	Hidrofilico	500
		2	hidrofilico	1000
2	100 pMol	3	hidrofilico	1500
		4	hidrofilico	2500
3	10 pMol	5	hidrofóbico	2500

Tabela 4.1: (a). Primeira série: variação de concentração de proteína em função da velocidade do “spin-coater” fixa. (b). Segunda série: variação da velocidade de deposição em função concentração de proteína fixa.

A amostra de referência é necessária para se poder interpretar corretamente o espectro XPS resultante do acréscimo da camada de proteína. Este espectro também é importante por que durante a análise, devido ao efeito de carregamento da superfície das amostras, linhas características de emissão estarão mudadas para valores menores ou maiores de energia de ligação. Esta mudança depende do tipo de amostra, dimensão, espessura, e método de montagem e do tipo de espectrômetro (Andrade, 1985). Portanto, esta amostra exerce o papel também de referência em energia.

A primeira varredura é chamada de panorama ("Survey"), e é apresentada na figura 4.3(a') e 4.3(c')

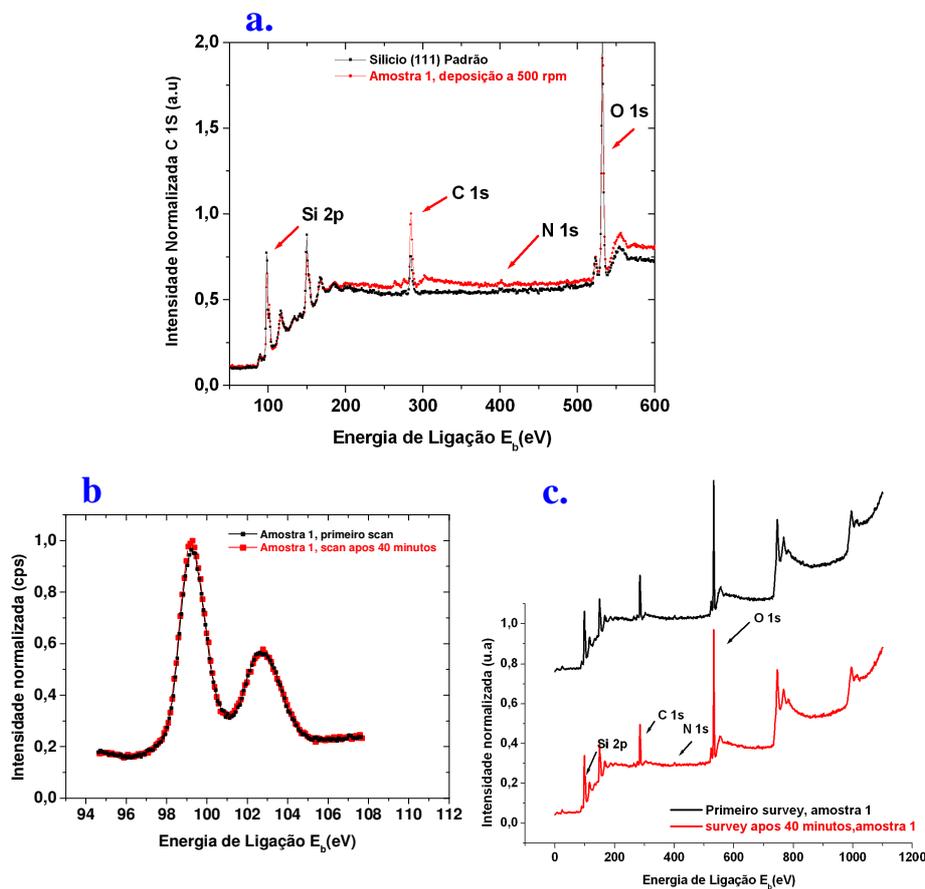


Figura 4.3: (a). Panorama da amostra 1 (500 rpm), mostrando os principais picos analisados e silício (111) padrão. (b). Espectro dos fotoelétrons característicos do Si 2p e Si 2p-SiO₂ da amostra 1 na primeira varredura e após 40 minutos, para investigação da estabilidade da amostra. (c). Panorama correspondente ao caso b.

Nesta varredura, todo o espectro XPS emitido pela amostra é visto em uma análise rápida e qualitativa, as linhas de emissões principais são localizadas e os elementos atômicos de interesse são identificados.

As principais linhas XPS de interesse (energias de ligação) para a investigação da adsorção da proteína GlnB-Hs no substrato de silício estão descritas na tabela 4.2.

Elemento atômico e orbital analisado	Energia de ligação E_b (eV)
Si 2p	99,3
Si 2p proveniente de SiO₂	103,3
N 1s	398,1
C 1s	285
O 1s	531

Tabela 4.2: Linhas de emissão do espectro de XPS analisadas contra energias de ligação correspondentes.

Neste caso, o “survey” foi o resultado da acumulação de 15 espectros. Tendo localizado as linhas de interesse, faz-se uma acumulação maior de espectros somente nas regiões de interesse para se ter uma relação sinal-ruído melhor.

Na segunda série, devido à constatação de que o fator de sensibilidade para detectar fotoelétrons provenientes de N1s era baixa, efetuou-se uma acumulação de 70 varreduras na região onde se encontrava a linha de emissão do nitrogênio N 1s. O tempo de medida por amostra, para a acumulação das 70 varreduras desta linha de emissão, foi de 40 minutos. Foram executadas, também, duas varreduras na amostra 1 dos picos de Si 2p volumétrico e Si 2p proveniente do SiO₂. O objetivo era a detecção de eventual degradação da amostra devido ao feixe de Raios-X, (figuras 4.3 (b) e 4.3 (c)).

Verificou-se que não houve mudanças significativas em intensidade e no perfil dos picos. Uma varredura no início das medidas experimentais e outra no final da coleta do espectro do N 1s também foi realizada para controle de eventual degradação do espectro.

Comparação e discussão de resultados

a. Primeira série

A primeira série foi realizada com o objetivo de investigar o efeito da concentração de proteína em solução na espessura do filme formado. Foram testadas três concentrações diferentes (1000 pMol, 100 pMol e 10 pMol). Estas concentrações foram depositadas com uma velocidade fixa de 3000 rpm (como já foi dito anteriormente, não se sabia ainda, realizando este experimento, que a velocidade de 1000 rpm era a mais conveniente). O ângulo de análise foi de 45°. Os resultados na figura 4.4 mostram uma intensidade decrescente do pico Si 2p correspondente aos fotoelétrons provenientes do substrato à medida que a concentração de proteína aumenta. Este fato significa que os fotoelétrons provenientes do volume do substrato são mais atenuados para uma concentração de proteína maior em solução.

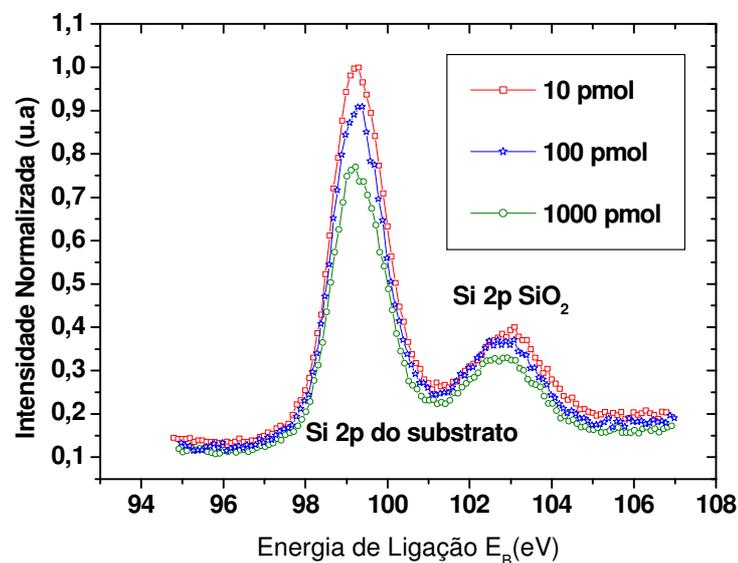


Figura 4.4: Espectro dos fotoelétrons provenientes do substrato de Si (111) Si2p e da camada de óxido Si 2p-SiO₂ para as concentrações de 10 pMol, 100 pMol, 1000 pMol.

b. Segunda série

O estudo da segunda série foi realizado com o objetivo de encontrar a melhor relação velocidade do "spin-coater" e fração de recobrimento do substrato de silício pela camada de proteína. O ângulo entre a normal à amostra e a direção de coleta dos fotoelétrons pelo detector foi de 60° e a concentração de proteína em solução utilizada foi de 1000 pMol. Os outros parâmetros experimentais foram mantidos constantes e iguais ao da primeira série.

Uma idéia geral das principais linhas de emissão oxigênio, carbono, nitrogênio e silício são vistas nas figuras 4.3(a) e 4.3(c). Como oxigênio e carbono provém também de eventual contaminação ambiental, a presença de proteína é detectada através da linha do nitrogênio N1s (Coen, et al., 2001), (Dufrière et al., 1999). A detecção da espessura da camada de proteína por sua vez, é feita através da análise da atenuação dos fotoelétrons provenientes do interior do substrato de silício Si 2p (99,3 eV) em relação ao N 1s.

Devido ao baixo fator de sensibilidade para a linha do nitrogênio N1s e devido à pouca quantidade de proteína adsorvida no substrato de silício, a acumulação de 70 varreduras foram necessárias para se obter uma relação sinal-ruído razoável. A linha de emissão do N1s consiste de duas componentes, elas são mostradas no apêndice A4 para cada amostra. Estas componentes estão relacionadas com o nitrogênio protonado (402,1 eV) e o não protonado (400,2 eV), (DeCupere, et al., 2004).

Como já foi discutido na seção 4.3, considerando que a camada de adsorção da proteína é um filme de espessura t cobrindo uma fração Y da superfície de silício, então a fração molar esperada para **N1s/Si2p** será (Dufrière et al., 1999), (Nefedov, 1988):

$$\frac{N}{Si} = \frac{i_{Si}}{i_N} \frac{\sigma_N}{\sigma_{Si}} \left(\frac{Y \left\{ \Lambda_N^P C_N^P \left[1 - e^{\left(\frac{-t}{\Lambda_N^P \cos \theta} \right)} \right] \right\}}{Y \left\{ \Lambda_{Si}^S C_{Si}^S e^{\left(\frac{-t}{\Lambda_{Si}^P \cos \theta} \right)} \right\} + (1 - Y) (\Lambda_{Si}^S C_{Si}^S)} \right) \quad (4.4.1).$$

onde i_{Si} e i_N são os fatores de sensibilidade para o silício e o nitrogênio respectivamente, σ_{Si} e σ_N são as seções de choque Scofield do silício e nitrogênio respectivamente, Λ é o livre caminho médio inelástico na camada de proteína (Λ^P) e no substrato de silício (Λ^S) relacionado com os fotoelétrons do nitrogênio e do silício, C_N^P é a concentração de nitrogênio na proteína e C_{Si}^S corresponde à concentração de silício no substrato, θ é o ângulo de análise entre a normal à superfície da amostra e a direção de coleta dos fotoelétrons pelo detector.

A atenuação da linha Si-2p também pode ser avaliada pela expressão abaixo, eq. 4.4.2, se a intensidade da linha Si-2p foi medida antes da deposição pelo espectrômetro (silício de referência), (Lebugle, et al., 1995):

$$I_{Si\ 2p}^D = I_{Si\ 2p}^A e^{\left(\frac{-t}{\Lambda \cos \theta} \right)} \quad (4.4.2)$$

onde $I_{Si\ 2p}^A$ e $I_{Si\ 2p}^D$ são as intensidades da linha Si-2p medidas antes e depois da deposição de proteína, Λ é o livre caminho médio inelástico do fotoelétron Si-2p na camada de proteína e θ e t são os definidos acima. Neste caso, a fração de cobertura é considerada 100%.

Das análises de AFM conclui-se que não ocorre 100% de cobertura. Portanto, este parâmetro deve ser visto como espessura mínima limite para se comparar com o modelo onde a fração de cobertura é levada em conta.

Amostra	Espessura para eq.(4.4.2) (nm)	Y para eq.(4.4.1) para t=3nm (%)
500 rpm	1,11	59,2
1000 rpm	1,57	72,5
1500 rpm	2,00	61
2500 rpm substrato hidrofílico	1,44	65
2500 rpm substrato hidrofóbico	0,86	49

Tabela 4.3: Indica a espessura limite mínima calculada pelo modelo 2 e a fração de cobertura superficial calculada pelo modelo 1 considerando 3nm de espessura (monocamada).

Analisando a tabela 4.3, observa-se que a velocidade 1000 rpm corresponde à melhor condição para um recobrimento uniforme se considerarmos uma espessura de camada de 3 nm ($Y = 72,5\%$). Imagens de AFM do substrato no centro e na borda confirmam este recobrimento homogêneo, (figuras 4.5 e 4.6), onde agregados circulares de proteína podem ser vistos em ambas as regiões. Estes grandes agregados de aproximadamente 100-130 nm diâmetro aparente são também formados por unidades de proteína com forma de anéis de diâmetro aparente variando entre 10 nm a 28 nm, mostrado em detalhe na figura 4.6. Considerando uma proteína esférica e como diâmetro aparente o limite inferior medido, então a unidade protéica teria uma largura aparente de $\Omega = \sqrt{d2R}$ (Zenhausern et al., 1992), onde R é o raio de curvatura da ponta (igual a 10 nm neste caso), e d é o diâmetro da unidade de proteína (igual a 5 nm). Este resultado é compatível com os resultados cristalográficos (Benelli et al., 2002). É útil notar que todas as dimensões são afetadas por distorções devido a vários fatores: interação com a ponta de prova, convolução com ponta e tratamento de imagens posterior à aquisição de dados.

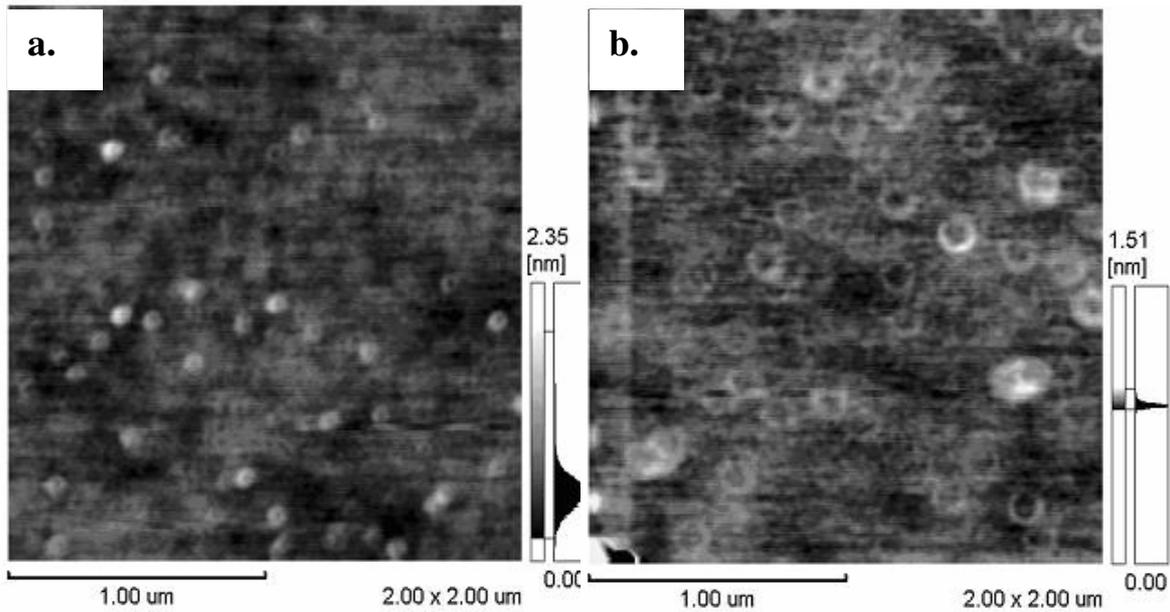


Figura 4.5: Imagens topográficas de AFM em modo dinâmico da amostra de 1000 rpm (melhor fração de recobrimento): (a). Centro da amostra. (b). Borda da amostra. Imagens de dimensões (2,00 x 2,00) μm .

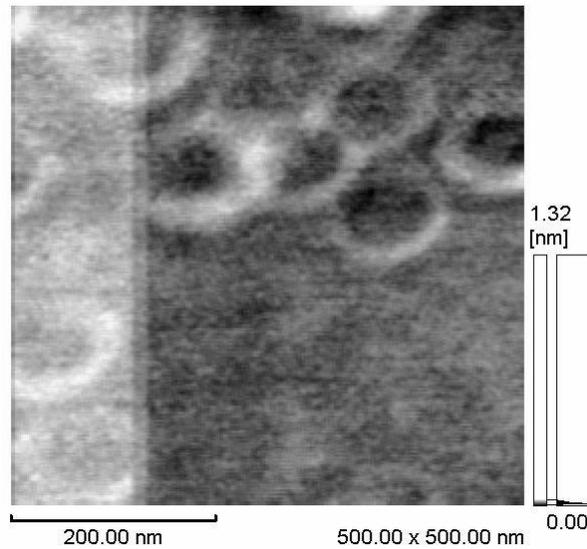


Figura 4.6: Imagens topográficas de AFM em modo dinâmico da amostra de 1000 rpm (melhor fração de recobrimento): Zoom da imagem 4.3b, dimensões (500,00 x 500,00) nm.

Nas figuras 4.7(a) e 4.7(b), pode-se observar que o sinal Si2p, proveniente dos fotoelétrons do substrato de silício com proteínas está atenuado se comparado com o silício de referência. Além do mais, o resultado proveniente da amostra depositada a 1000 rpm corresponde à maior cobertura e ao sinal do Si2p Si mais atenuado. Por outro lado, a intensidade do pico Si2p-SiO₂ aumenta com o aumento da fração de recobrimento pela camada de proteína **Y**, sendo máximo para o maior recobrimento e o mais regular (1000 rpm).

Também se pode notar uma mudança em energia de ligação comparando-se a energia do pico de fotoemissão do Si2p-SiO₂ do silício de referência e os picos de fotoemissão do silício coberto com proteína. Esta mudança em energia em torno de 0,3 eV ocorre em direção a energias de ligação menores, significando que os fotoelétrons Si2p-SiO₂ estão menos ligados. Este fato sugere uma reação química da proteína GlnB-Hs com SiO₂. Também é razoável considerar que, para uma mesma quantidade de proteína depositada em todos os substratos, uma fração maior reagida corresponde a uma contribuição maior de fotoelétrons desta fração reagida para a intensidade do pico Si2p-SiO₂.

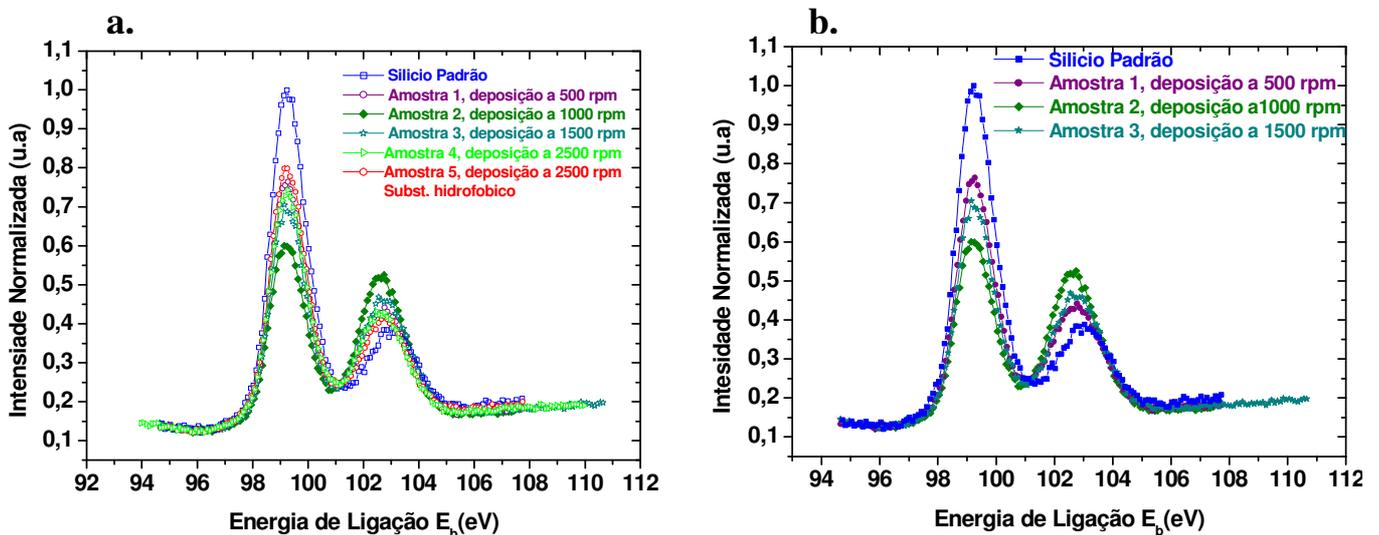


Figura 4.7:(a). Espectro normalizado de fotoelétrons Si2p Si (111) e da camada de óxido Si 2p-SiO₂ de todas as amostras reunidas. (b). Espectro normalizado no caso anterior exceto para as amostras 4 e 5.

No caso da superfície do Si (111) hidrofóbico, as imagens de AFM indicam um claro recobrimento não uniforme estimado em menos de 50%, como é mostrado nas figura 4.8(a) e 4.8(b). Esta figura mostra uma rede compacta de filamentos longos de aproximadamente 5 nm de altura and 85 nm largura. Além do mais, estas imagens não mostram o vazio central claramente visto nas figuras 4.5(a) e 4.5(b), sugerindo que a adsorção destes filamentos segue uma conformação diferente. A cinética de adsorção parece ser basicamente controlada pela configuração onde a proteína é adsorvida sobre o substrato pela

face lateral. O espectro de XPS também indica, (figura 4.9), que o substrato hidrofílico tem um pico de fotoemissão Si2p-Si mais atenuado que o hidrofóbico, consistente com o recobrimento observado por imagens de AFM. Esta observação é uma evidência da adsorção preferencial da proteína GlnB-Hs no substrato de Si(111) hidrofílico, onde um recobrimento mais uniforme é observado através das imagens de AFM.

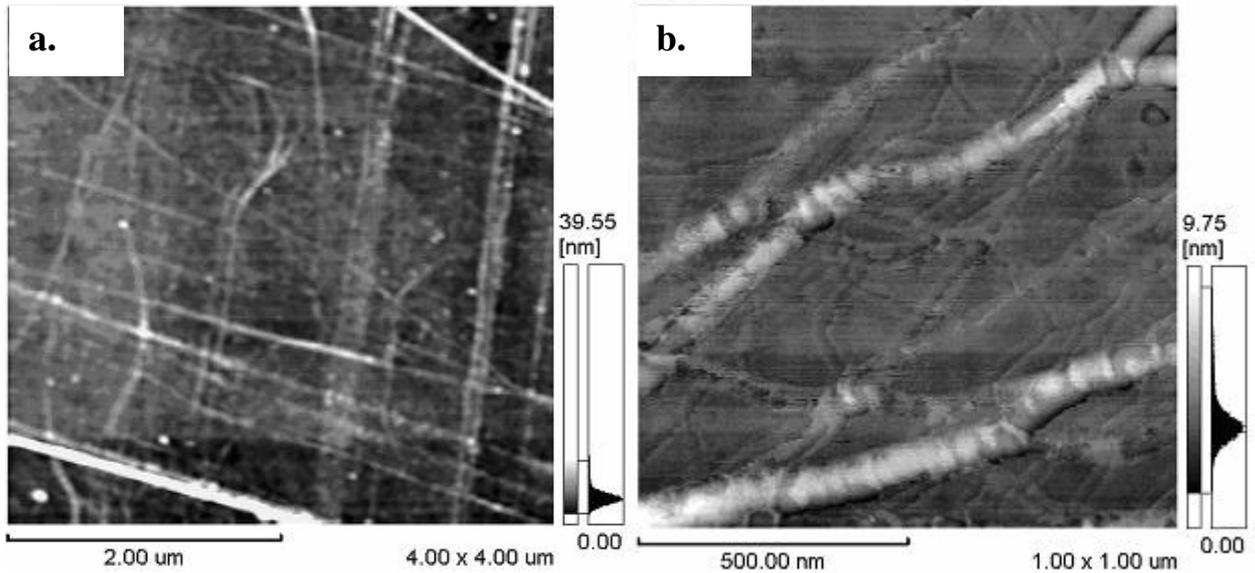


Figura 4.8: Imagens topográficas de AFM em modo dinâmico da amostra de Si (100) hidrofóbico, 2500 rpm **(a)**. Borda da amostra, imagem de dimensões (4,00 x 4,00) μm . **(b)**. Borda da amostra, outra região diferente do caso a. Dimensões da imagem de (1,00 x 1,00) μm .

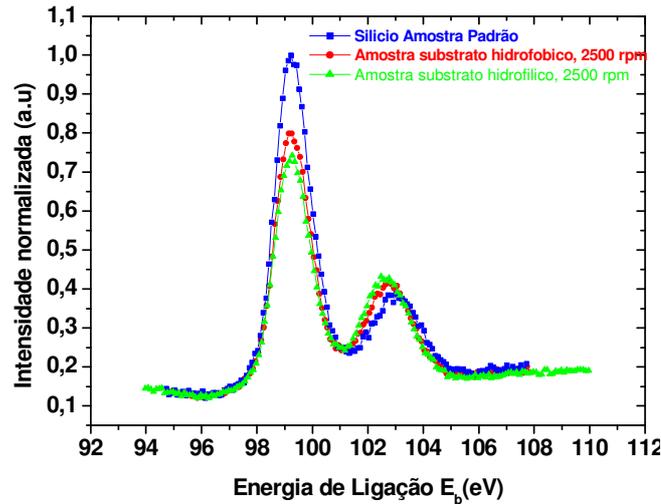


Figura 4.9: Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes da emissão Si2p-Si e da camada de óxido Si2p-SiO₂ das amostras com proteína em substrato hidrofílico e substrato hidrofóbico a 2500 rpm.

Uma explicação simplificada deste processo de adsorção preferencial é descrita nos parágrafos seguintes com a ajuda dos espectros de emissão de fotoelétrons do N 1s. É importante frisar que este mecanismo é simplificado e que outros processos podem estar ocorrendo concomitantemente durante a adsorção.

Comparando-se os espectros contendo as linhas de emissão de fotoelétrons do Nitrogênio N1s, (figura 4.10), para a amostra 2 (maior recobrimento, 1000 rpm), amostra 5 (silício hidrofóbico a 2500 rpm e menor recobrimento), amostra 4 (silício hidrofílico, 2500 rpm), amostra 3 (silício hidrofílico, 1500 rpm), amostra 1 (silício hidrofílico, 500 rpm) observa-se que a amostra 2 possui o sinal de nitrogênio N 1s protonado mais atenuado na série dos substratos hidrofílicos, (figura 4.10(b), cor verde oliva) e, também, se se compara com o silício hidrofóbico, (figura 4.10(a)), observa-se que a amostra 2 possui o pico mais atenuado dos dois espectros. Sugere-se assim que, conjuntamente com o mecanismo de adsorção por polaridade, a proteína é adsorvida em substratos hidrofílicos, terminados por Si-OH preferencialmente com os resíduos superficiais susceptíveis de desprotonar, como a lisina

e a arginina, encontradas majoritariamente na superfície inferior da proteína GlnB-Hs (capítulo 1). A água, neste mecanismo, é também coadsorvida.

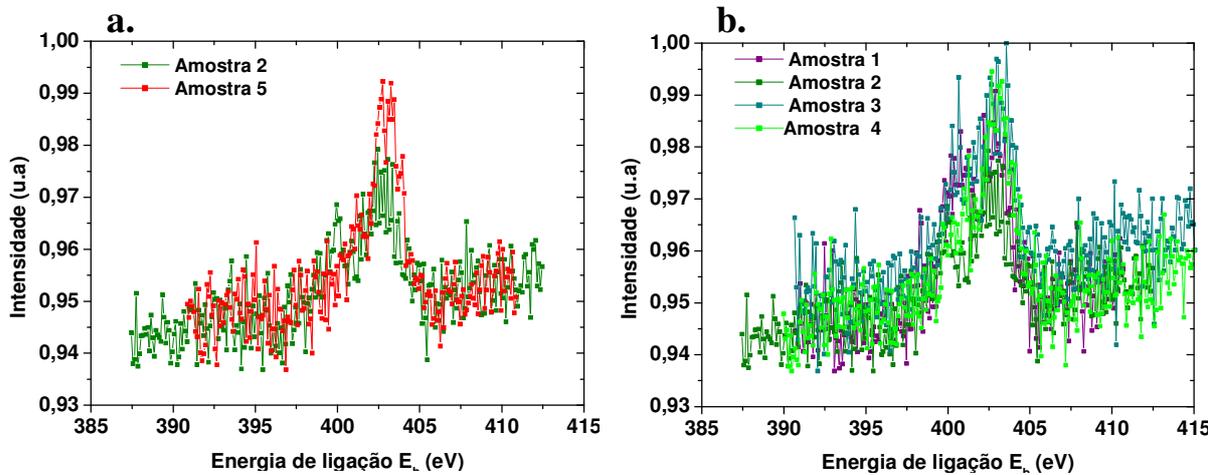


Figura 4.10: (a). Espectro normalizado de fotoelétrons N1s de proteínas depositadas no substrato hidrofílico e hidrofóbico de Si (111). O sinal de N1s protonado é mais intenso para a amostra com substrato hidrofóbico. (b). Espectro normalizado de fotoelétrons N1s da série de substratos hidrofílicos: amostra 2 (1000 rpm, maior cobertura) possui o sinal mais atenuado de N1s protonado.

No caso do substrato hidrofóbico (amostra 5, 2500 rpm), cuja terminação é Si-H e cuja fração de recobrimento foi a menor, vê-se que o sinal do nitrogênio protonado é maior do que o caso da proteína adsorvida em substrato hidrofílico, com melhor fração de recobrimento (amostra 2, 1000 rpm). Neste caso, a proteína se adsorveria preferencialmente de lado, evitando o contato dos resíduos protonados com o substrato, e seria adsorvida através de resíduos como, por exemplo, ácido glutâmico e ácido aspártico.

Observando a tabela 4.4, pode-se notar que existe deslocamento em energia para os fotoelétrons do carbono C 1s e oxigênio O 1s em relação ao silício padrão para todas as amostras. Este deslocamento do carbono 1s estaria relacionado com o sinal predominante proveniente do carbono unicamente ligado ("single bonded"), C-(O, N), ($E_b=286,3$ eV) ligado a oxigênio ou nitrogênio (Dufrene, et al. 1996), incluindo amina e amida. Para amostra número 2, com energia de ligação da ordem de 286,7eV, o sinal predominante seria proveniente de fotoelétrons do carbono duplamente ligado ("double bonded"), $-C_{\alpha}-(C=O)-NH-$

), ($E_b = 286,5 \text{ eV}$), ligado com oxigênio da amida (Dufrêne, et al. 1996), (Lebugle et al., 1995).

Amostra	Carbono	Nitrogênio		Oxigênio
	C 1s	N 1s		O 1s
	E_b (eV)	E_b (eV)		E_b (eV)
1	285,37	400,87	402,95	533,08
2	286,68	399,75	402,78	534,37
3	286,12	400,09	401,16	533,97
4	286,51	399,73	401,55	534,19
5	285,94	401,12	403,02	533,31
Silício padrão	285,22			532,86

Tabela 4.4: Energia de ligação dos fotoelétrons emitidos pelas amostras para C1s, N1s, O1s. Informação extraída dos espectros experimentais. (ver apêndice).

No caso do silício padrão tem-se carbono C-(C, H), ($E_b = 284,8 \text{ eV}$) somente ligado com carbono ou hidrogênio de contaminantes (Dufrêne, et al. 1996), (Lebugle et al., 1995). O deslocamento em energia do O 1s estaria relacionado com a ligação do oxigênio e nitrogênio.

4.5 Programa de simulação da espessura de camada em função da fração de cobertura do substrato

Para o cálculo do livre caminho médio inelástico, de acordo com Tanuma et al., foi usado o programa fornecido pela NIST ("National Institute of Standard"). Com este programa é possível calcular o livre caminho médio inelástico de elétrons para compostos orgânicos, fazendo-se uma estimativa da banda proibida ("band gap") eletrônica que é em torno de 5 eV (DeCupere et al., 2004) para um isolante, a densidade da molécula de proteína ($\rho = 0,26 \text{ g/cm}^3$) e o número de elétrons na banda de valência da molécula. Assim, foram calculados o livre caminho médio inelástico do fotoelétron N1s proveniente da camada de proteína ($\Lambda_N^P = 3,2 \text{ nm}$), o livre caminho médio inelástico do silício Si 2p no interior do substrato de silício ($\Lambda_{Si}^S = 3,17 \text{ nm}$) e do silício Si 2p dentro da camada de proteína ($\Lambda_{Si}^P = 4,1 \text{ nm}$).

Criou-se um programa para a simulação da equação 4.4.1, apêndice A4, cujos dados de entrada necessários foram: a seção Scofield de choque relativa ao C 1s, que é de 13600 Barns em 1487 eV (Scofield, 1976), para o silício Si 2p ($\sigma_{\text{Si}} = 0,817$) e para o N 1s ($\sigma_{\text{N}} = 1,8$) respectivamente, o livre caminho médio inelástico, a concentração atômica dos elementos nitrogênio C_{N}^{P} , silício C_{Si}^{S} e o fator de sensibilidade i_{Si} e i_{N} que depende do espectrômetro.

Conclusão do capítulo 4

Pelos espectros XPS e observações por AFM, nota-se que a deposição por "spin-coating" promove a formação de um filme fino e regular. A melhor velocidade detectada através dessas duas técnicas para obtenção deste filme com o melhor recobrimento possível é 1000 rpm (72,5%) para o substrato de silício hidrofílico. No caso do silício hidrofóbico comparado com o silício hidrofílico (com a mesma velocidade de rotação), a porcentagem de recobrimento foi a menor (49%) dentro da série de ensaios. Além do mais, há evidências de que quando a proteína é depositada sobre o substrato de silício, os fotoelétrons provenientes da linha de emissão $\text{Si}2\text{p-SiO}_2$ ligados com a proteína deslocam-se em energia de aproximadamente 0,3 eV.

A proteína GlnB-Hs forma grandes agregados circulares de aproximadamente 100-130 nm diâmetro aparente, os quais, por sua vez, são também formados por unidades de proteína com forma de anel de largura aparente variando entre 10 nm a 28 nm em substrato de silício (111) hidrofílico. No substrato hidrofóbico, a proteína GlnB-Hs se adsorve preferencialmente formando fios de comprimento da ordem do micrômetro. O provável mecanismo de adsorção seria através da polaridade superficial da proteína nos casos hidrofílico e hidrofóbico e, em especial, desprotonação de resíduos superficiais da face inferior da proteína no caso hidrofílico. Para o caso hidrofóbico, a proteína adsorveria preferencialmente com sua face lateral, evitando o contato dos resíduos protonados com o substrato, como parecem indicar os espectros XPS para N1s.

Capítulo 5

Espectroscopia de Infravermelho da Proteína GlnB-Hs sobre Silício

Utilizou-se a técnica de infravermelho em incidência rasante para investigar possíveis diferenças no espectro de absorção dos arranjos de proteína formados por "spin-coating" em substratos de Si (100) e Si (111) hidrofílicos e hidrofóbicos. O espectro de IV fornece informações sobre a influência da orientação cristalina e do estado hidrofóbico ou hidrofílico do substrato na formação da camada de proteína.

O espectro de absorção IV da proteína GlnB-Hs termicamente desnaturada é comparado com o espectro de absorção da proteína nativa. Uma breve introdução à técnica de infravermelho em incidência rasante é abordada no início deste capítulo.

5.1 Introdução à técnica

A radiação do infravermelho corresponde à parte do espectro eletromagnético compreendida entre as regiões do visível e do microondas (4000 cm^{-1} até 100 cm^{-1}). A região de interesse para investigação de compostos orgânicos está no intervalo ($4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) (Andrade, 1985).

Quando a energia de um fóton de radiação IV é absorvido por materiais orgânicos, a energia é convertida principalmente em movimentos rotacionais e vibracionais. A energia característica da molécula pode ser modelada como um oscilador harmônico e está associada a níveis discretos podendo ser expressa pela lei de Planck:

$$E_n = (n + 1/2)h\nu \quad (5.1.1).$$

n é um inteiro que identifica o nível de energia, h é a constante de Planck e ν é a frequência de oscilação, com comprimento de onda sendo $\lambda = c/\nu$, onde c é velocidade da luz no vácuo.

Da mesma forma que na espectroscopia de fotoelétrons XPS, onde os átomos podem ser identificados pelo seu espectro característico, as moléculas orgânicas têm também um espectro de absorção no infravermelho particular que dependerá dos graus de liberdade

disponíveis da molécula para realizar os movimentos vibracionais. Este espectro depende de vários fatores: massa relativa dos átomos, constante de força das ligações e geometria dos átomos dentro da molécula. Assim, os graus de liberdade de uma molécula e as regras de seleção para as transições permitidas determinam as bandas de absorção (Andrade, 1985).

Alguns fatores reduzem o número de bandas de absorção detectáveis e estão relacionados com a instrumentação, com a superposição de bandas de absorção de substratos, com a resolução do aparelho e também pode ocorrer que a banda de absorção da molécula se situe fora da região do infravermelho.

A energia absorvida pela molécula corresponderá a dois tipos de vibração molecular: deformação axial e deformação angular. A deformação axial é um movimento oscilatório ao longo do eixo de ligação produzindo a diminuição ou o aumento das distâncias interatômicas. A deformação angular está ligada a variações de ângulo da ligação dentro de um grupo de átomos ou com outros grupos de átomos.

As interações dentro da molécula ou entre moléculas, a conformação, a cristalinidade, a orientação e a adesão a substratos podem influenciar nas constantes de força e nos graus de liberdade das ligações correspondentes (Andrade, 1985). Estas mudanças levam a alterações da energia da banda de absorção, alargamento das bandas ou mudanças na intensidade das bandas.

Infravermelho em atenuação total

A determinação da radiação eletromagnética absorvida em função do comprimento de onda transmitido através de uma amostra com espessura da ordem de alguns ångstrons necessita de uma técnica especial de análise. Esta técnica alia a espectroscopia de infravermelho com a técnica de reflexão interna total do campo eletromagnético.

A reflexão total da onda eletromagnética é um fenômeno especial e útil na análise de superfícies e interfaces, uma vez que, nesta condição, a propagação da onda

eletromagnética ocorre ao longo da superfície ou interface. Considerando o meio 1, com índice de refração n_1 , onde a onda incide, e o meio 2 com índice de refração n_2 , onde a onda refrata ($n_1 > n_2$), pode-se determinar o ângulo crítico [$\theta_c = \arcsen(n_2/n_1)$]. Neste caso, a onda eletromagnética é refratada ao longo da interface entre os meios 1 e 2. Pela lei de Snell teremos (Chittur, 1998):

$$n_1 \text{sen} \theta_1 = n_2 \text{sen} \theta_2 \quad (5.1.2).$$

$$\cos \theta_2 = \pm i \left(\frac{n_1}{n_2} \right) \left[\text{sen}^2 \theta_1 - \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (5.1.3).$$

Utilizando as condições de contorno do campo eletromagnético nas interfaces e a condição que o ângulo de refração se torna imaginário na reflexão total, as equações de Fresnel para a reflexão total podem ser estabelecidas para um meio homogêneo, isotrópico, não-magnético e cuja densidade de carga livre e de corrente são nulas.

A radiação eletromagnética não penetra no segundo meio, mas propaga-se ao longo da interface no plano de incidência. No meio 2 existirá uma onda eletromagnética evanescente cuja amplitude decai até zero à medida que a penetração aumenta neste meio.

Esta onda evanescente fornecerá informação estrutural do segundo meio. No caso da reflexão total, a onda incidente não será totalmente refletida na interface entre os meios 1 e 2 devido à absorção da radiação pelo meio 2. Como materiais orgânicos são pouco absorventes é necessário várias reflexões internas dentro do cristal analisador para que o efeito seja amplificado com os pequenos decréscimos de cada reflexão .

A geometria do cristal analisador e o ângulo de incidência da onda eletromagnética determinarão o número de reflexões no meio.

Distância de penetração

O decréscimo da intensidade refletida nas reflexões na interface está associado ao

decréscimo da energia de radiação em função da distância de penetração da onda eletromagnética no meio 2. Desta forma, pode-se associar um comprimento de penetração da onda evanescente, que é definido como a distância que a onda eletromagnética percorre no meio 2 até que sua amplitude seja igual em módulo a $1/e$ da amplitude inicial (Chittur, 1998). O comprimento de penetração será dado pela seguinte relação:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \left[\text{sen}^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}} \quad (5.1.4).$$

No entanto, este comprimento de penetração não é a espessura efetiva da amostra. A espessura efetiva é definida como a espessura de material equivalente que resultaria em condição de transmissão na mesma absorbância.

Na figura 5.1, vê-se uma simulação da dependência do comprimento de penetração em função do número de onda para o caso do cristal ZnSe, levando em conta uma camada de proteína com índice de refração estimado em 1,5 (índice médio de polímeros). Esta simulação mostra que dentro da faixa de 1000 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} a onda evanescente penetrou entre 1 a 2 micrômetros.

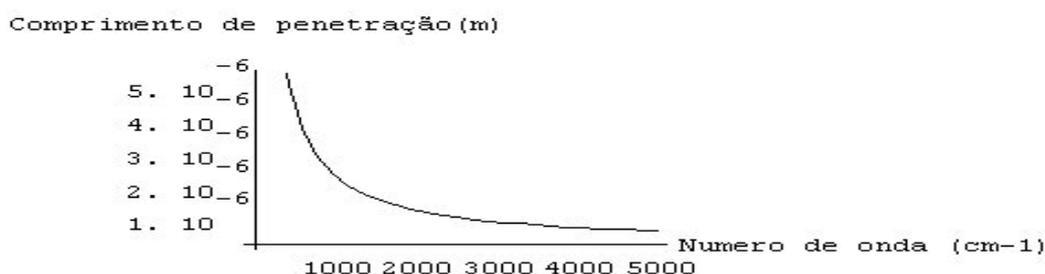


Figura 5.1: Simulação da profundidade de penetração expressa em micrômetros da onda eletromagnética em um cristal de ZnSe com uma camada de proteína de índice de refração de 1,5 em função do número de onda expresso cm^{-1} .

Ângulo de incidência efetivo

O ângulo de incidência efetivo dentro do cristal é dado pela seguinte relação:

$$\theta = \beta - \arcsen\left[\frac{\text{sen}(\beta - \varphi)}{n_2}\right] \quad (5.1.5).$$

onde β é o ângulo das faces do cristal, φ é o ângulo de incidência óptico e n_2 é o índice de refração do cristal.

Número de reflexões efetuadas dentro do cristal analisador

O número de reflexões efetuadas dentro do cristal analisador é dado pela seguinte relação geométrica (Chittur, 1998):

$$n^\circ = \frac{L}{\cot \theta} \quad (5.1.6).$$

Onde, L é o comprimento do cristal e θ é o ângulo efetivo de incidência dentro do cristal. Para o caso do experimento com a proteína GlnB-Hs, o número efetuado de reflexões foi igual a 5.

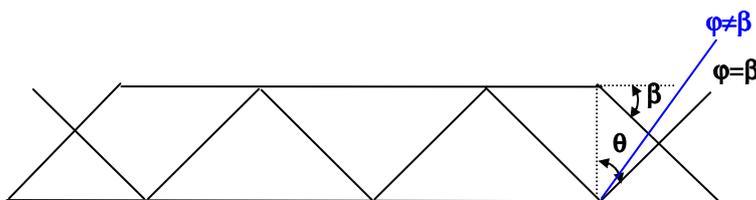


Figura 5.2: Diagrama das reflexões múltiplas dentro do cristal analisador da onda eletromagnética, onde β é o ângulo das faces do cristal, φ é o ângulo de incidência óptico e θ o ângulo de incidência efetivo.

5.2 Análise da conformação estrutural da proteína através do infravermelho

Os resultados experimentais de bandas de absorção de radiação IV em filmes finos de proteínas adsorvidas em substratos sólidos em interface ar-sólido são escassos (Pompa et al., 2003). Os resultados disponíveis na literatura tratam principalmente de bandas

vibracionais de absorção do grupo amida em interfaces sólido-líquido (Green et al., 1999), (Buijs et al., 1996), entre outros.

Estas bandas de absorção são provenientes da cadeia polipeptídica e se dividem em três regiões de absorção principais (Jeon et al., 1994), (Carey, 1992), (Green, et al., 1999), (Buijs, et al., 1996): amida I, região compreendida entre 1600 e 1700 cm^{-1} , amida II, compreendida entre 1450 e 1600 cm^{-1} e amida III, compreendida entre 1100 e 1450 cm^{-1} .

Amida I

Esta banda provém da deformação axial simétrica da ligação covalente carbono-oxigênio, cuja contribuição, neste modo, é maior do que a segunda contribuição que provém da deformação angular no plano do grupo N-H para o caso da trans-amida, (figura 5.3).

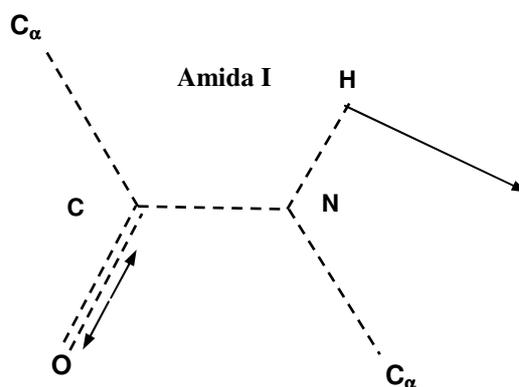


Figura 5.3: Diagrama simplificado dos modos de vibração da trans-amida. No caso da amida I, existirá deformação axial na ligação carbono-oxigênio e deformação angular no plano do radical N-H.

Amida II e Amida III

A absorção é proveniente da interação de deformação simétrica axial do radical $O=C-N$ e da deformação angular no plano do grupo $N-H$. Este tipo de vibração ocorre nas duas bandas, (figura 5.4).

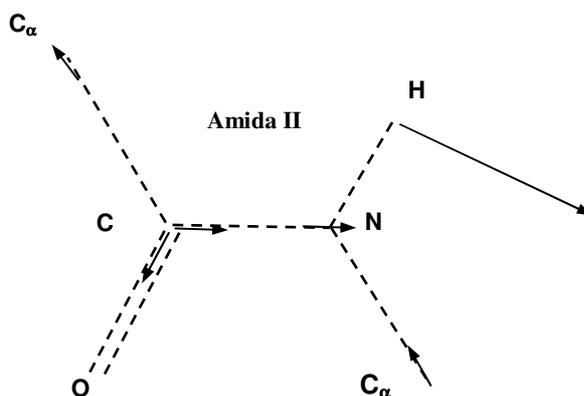


Figura 5.4: Diagrama simplificado dos modos de vibração da trans-amida. No caso da amida II, existirá deformação axial na ligação carbono= oxigênio-nitrogênio e deformação angular no plano do radical $N-H$.

Amida III

Esta banda de absorção é proveniente da deformação simétrica axial do $O=C-N$ como no caso anterior, mas existe ainda a contribuição das deformações axiais dos grupos $C-C$ e $C-N$, (figura 5.5).

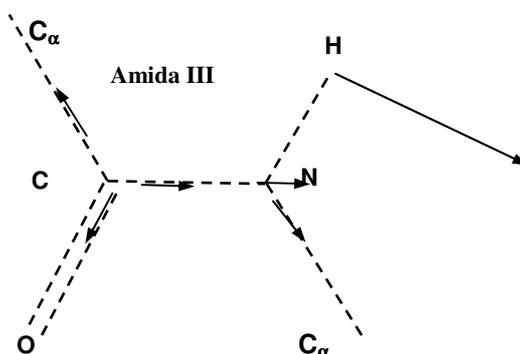


Figura 5.5: Diagrama simplificado dos modos de vibração da trans-amida. No caso da amida III, existirá deformação axial na ligação carbono= oxigênio-nitrogênio e deformação angular no plano do radical $N-H$. Além de contribuições de $C-C$ e $C-N$.

No caso da cis-amida, as deformações angulares (N-H) no plano e axial (C-N), originam bandas que estão localizadas na região do espectro entre 1450 cm^{-1} e 1350 cm^{-1} . Através das bandas da amida I e amida II pode-se inferir a existência de α -hélices e folhas β provenientes da estrutura secundária da proteína. A banda da amida II é usada na avaliação da quantidade de proteína adsorvida na superfície sólida (Jeon et al., 1994), (Chittur, 1998).

5.3 Resultados experimentais

Procedimento de medidas

As medidas foram executas em um espectrômetro Bomem DA8 FT, com fonte de luz global (carbeto de silício) com separador de feixe de KBr. O cristal analisador foi ZnSe (seleneto de zinco) medindo 1cm de largura por 5 cm de comprimento. Sua faixa de transmissão se situa entre $(4000-700)\text{ cm}^{-1}$ e seu índice de refração é de 2,4. Os ângulos da face de entrada e saída (β) do feixe de luz é de 45° com a face do cristal, (figura 5.2). O ângulo óptico de incidência (φ) utilizado durante as medidas foi de 45° , o que leva a um ângulo de incidência efetivo (θ) dentro do cristal de 45° . Para o caso do cristal de seleneto de zinco o ângulo crítico é $38,3^\circ$.

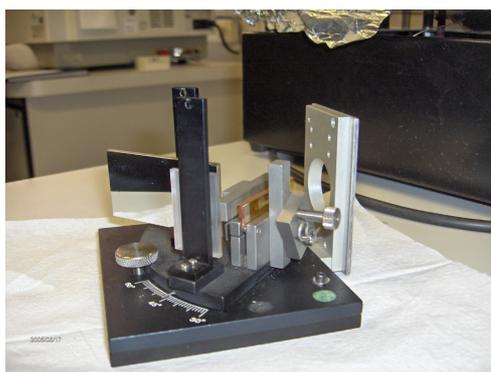


Figura 5.6: Detalhe da célula de medida em ATR do espectrômetro Bomem DA8 FT com o cristal analisador ZnSe no centro da célula.

O espectro analisado é uma média de 125 varreduras entre 449 cm^{-1} e 5000 cm^{-1} com uma abertura de 10 mm e a velocidade do espelho de 0,50 cm/s. O vácuo dentro da câmara era da ordem 0,4 milibar durante as medidas. Todos os espectros foram coletados com uma resolução espectral de 2 cm^{-1} . Foi utilizada a função Bartlett para apodização.

Um espectro de referência do cristal analisador foi coletado, assim como um espectro da solução tampão depositada nas mesmas condições da deposição da proteína. Este espectro serviu de espectro de fundo. O espectro resultante coletado da proteína depositada em silício (100) e silício (111) foi subtraído do espectro de fundo. Espectros do Si (111) e Si (100) sem proteína também foram coletados como referência. Antes e após cada coleta de dados, o cristal analisador era limpo com acetona (p.a).

5.3 Protocolo de adsorção da proteína GlnB-Hs e da solução tampão no substrato de silício

Os substratos de silício (100) e (111) foram limpos segundo o procedimento padrão descrito no capítulo 1. Os substratos hidrofóbicos de silício (100) e (111) foram obtidos mergulhando-os em ácido hidrófluorídrico por alguns minutos, lavados com água Millipore (MilliQ, $18,2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$), procedendo-se imediatamente a deposição da proteína.

Protocolo de deposição da proteína GlnB-Hs

Foram depositados $10\text{ }\mu\text{L}$ de proteína GlnB-Hs no centro do substrato de silício que estava girando a 1000 rpm, deixando-se a proteína adsorver durante 30 segundos. Depois desse período, o substrato foi levado a girar a 2000 rpm para eliminar excessos e para a lavagem com $20\text{ }\mu\text{L}$ de solução de 10mM Tris/HCl pH 8 por três vezes.

Protocolo de desnaturação da proteína

A proteína foi desnaturada termicamente, levando-se $10\text{ }\mu\text{L}$ de proteína a 100°C durante 15 minutos. Os substratos de silício também foram aquecidos antes da deposição.

Após a deposição da proteína, seguindo-se o protocolo acima, as amostras foram levadas para uma estufa onde secaram durante 1h.

Protocolo de deposição do tampão da proteína GlnB-Hs

O substrato de silício foi levado a girar a 1000 rpm e 20 μL de solução foram depositados no centro do substrato. Após 30 segundos, o substrato foi levado a 2000 rpm para se retirar o excesso. Depositou-se a solução tampão da mesma forma que descrita no parágrafo sobre a deposição da proteína em substratos de silício (100) e (111) para substratos hidrofóbicos e hidrofílicos.

Para o caso do tampão da proteína desnaturada, a solução tampão foi aquecida a 100°C durante 15 minutos, logo em seguida, foi depositada em substratos aquecidos de silício hidrofílicos (100) e (111), depois foram levadas a uma estufa para secar durante o mesmo tempo que a proteína.

5.5 Espectro de Absorção do Silício Puro

Silício é um material bastante conhecido por suas propriedades de transmissão no infravermelho. Ele é usado para fabricação de janelas na região espectral do infravermelho médio. As suas bandas de absorção são as seguintes: 600 cm^{-1} , 750 cm^{-1} , 900 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} . Na figura 5.7 são mostradas somente as bandas de interesse do trabalho, entre 1000 cm^{-1} e 2000 cm^{-1} . Entre 1500 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} , este material é transparente.

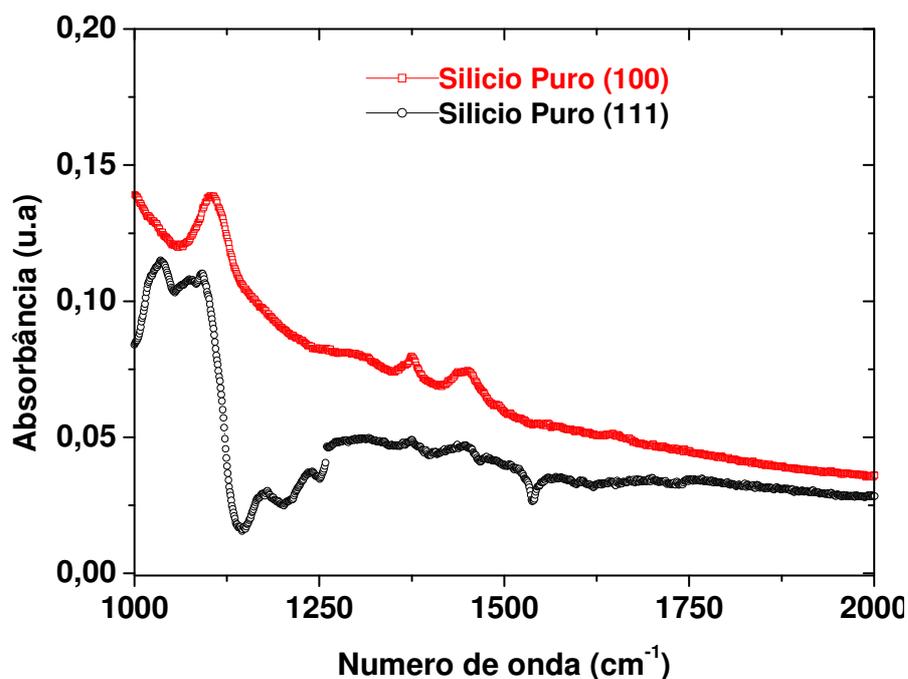


Figura 5.7: Gráfico dos espectros de absorvância do Si (111) e Si (100), apresentando as principais bandas características dos dois substratos. O silício apresenta uma janela de absorção entre 1500 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} .

5.6 Espectros do infravermelho obtidos para Si (111) com a proteína adsorvida

Notam-se diferenças marcantes entre os espectros de absorção para os três modos de deposição da proteína sobre o substrato de silício (111), (figura 5.8). O espectro da proteína desnaturada não mostra picos de absorção nas regiões típicas dos grupos amida entre 1100 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} . Os dois espectros de absorção da proteína sobre a superfície hidrofílica e hidrofóbica possuem claras diferenças entre si. Com a ajuda da tabela 5.1 e também da separação do espectro por bandas, para os casos hidrofílico e hidrofóbico, podem-se ver mais claramente as diferenças acima referidas.

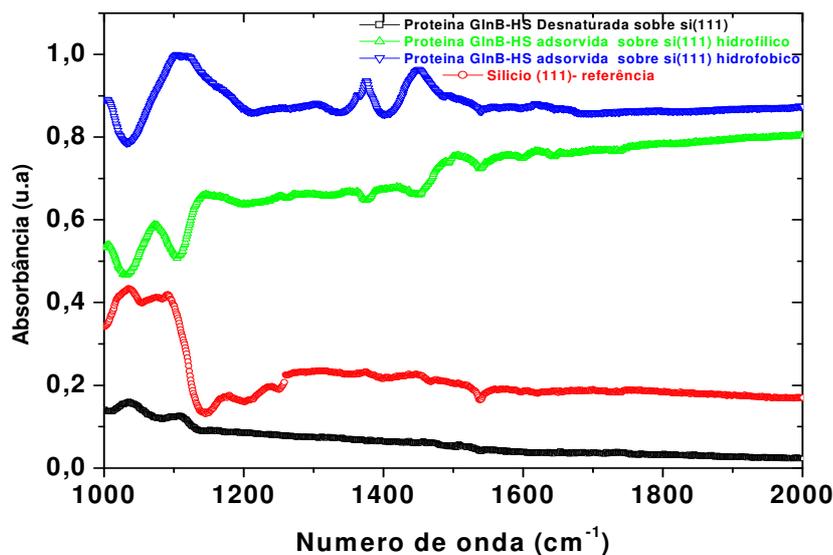


Figura 5.8: Gráfico do espectro de absorvância da proteína GlnB-Hs sobre silício (111), hidrofóbico e hidrofílico, apresentando as principais bandas características nos dois casos. O espectro do silício limpo pode ser utilizado para comparações.

A tabela 5.1 sumariza as bandas de absorção dos grupos amida I, II e III :

Si (111)	Hidrofílico Bandas de absorção (cm ⁻¹)	Hidrofóbico Bandas de absorção (cm ⁻¹)
Amida I	1600-1644,1	1605,5-1644,1
	1644,1-1660,5	1644,1-1676,9
	1660,5-1728	1676,9-1736,6
Amida II	1538 -1596,7	1538- 1677,8
	1492,7 - 1538	1475-1538
	1450 -1492,7	1032,7-1210,1
Amida III	1030,8-1104,1	
	1104,1-1201,5	
	1201,5-1320,1	1210,1-1334,5
	1201,5-1320,1	
	1320,1-1442,5	1334,1-1400

Tabela 5.1 Resumo das principais bandas de absorção da proteína GlnB-Hs, por categoria de absorção da amida para silício (111) hidrofílico e hidrofóbico.

Região da Amida III (1000 cm^{-1} a 1450 cm^{-1})

Estas bandas de absorção possuem estruturas que são formadas pela superposição de modos, (figura 5.9). No caso da proteína adsorvida em substrato hidrofóbico (figura 5.9(b)), o perfil da banda é formado pela convolução de um pico em 1375 cm^{-1} e outro em 1364 cm^{-1} . Esta banda está relacionada com o acoplamento das deformações angulares no plano N-H e da deformação axial C-N (Jeon, 1994) e encontra-se deslocada e mais larga no espectro da proteína adsorvida no substrato hidrofílico, (figura 5.9(a)). Este possui, também nesta região, uma banda larga entre 1100 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} .

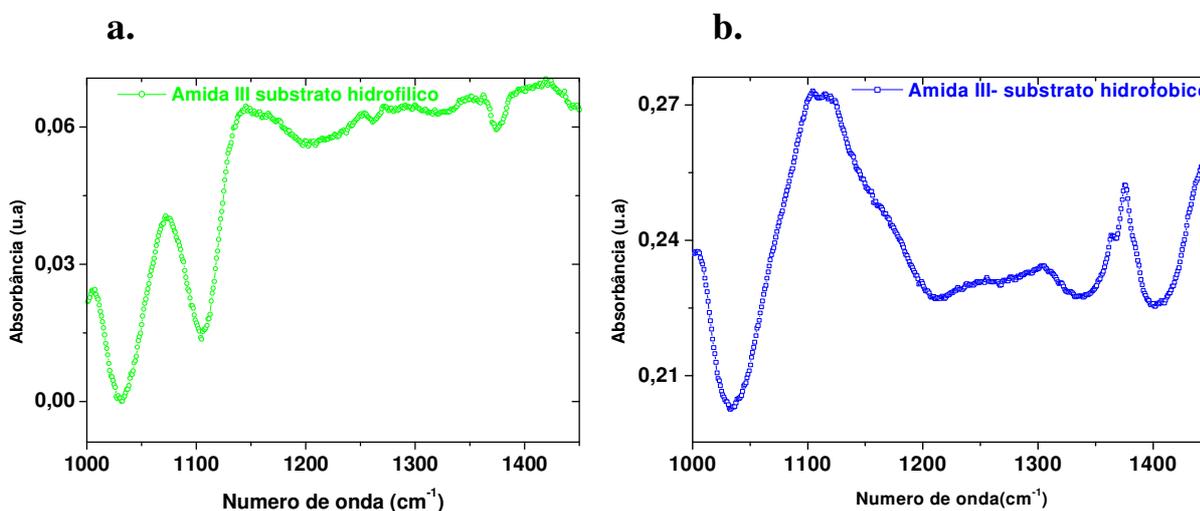


Figura 5.9: Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (111) na região de absorção da banda da amida III (1100 cm^{-1} a 1200 cm^{-1}). (a). Silício hidrofílico. (b). Silício hidrofóbico.

Região da amida II (1450 cm^{-1} - 1600 cm^{-1})

Nesta região do espectro, (figuras 5.10(a) e 5.10(b)), o perfil das bandas para os dois tipos de deposição difere significativamente. Existe uma certa concordância em número de onda para duas regiões de absorção, mas nota-se a ausência da região entre 1450 cm^{-1} - 1492 cm^{-1} para o silício hidrofóbico, (figura 5.10(b)).

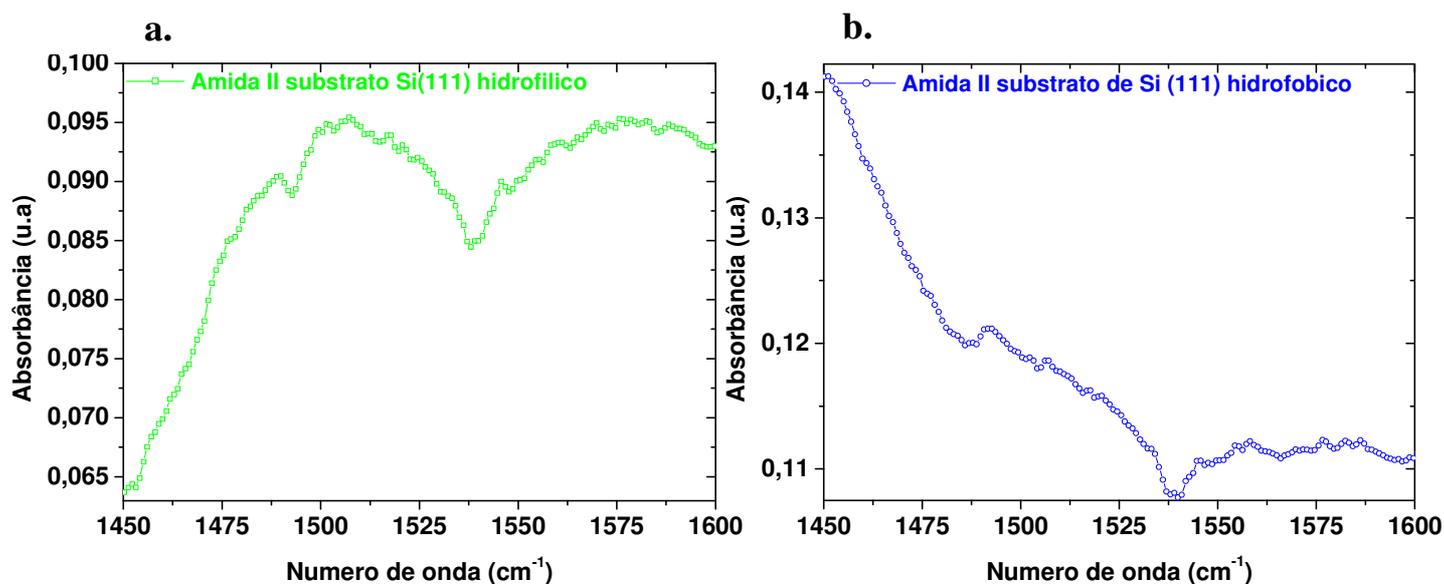


Figura 5.10: Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (111) na região de absorção da banda da amida II (1450 cm⁻¹ a 1600 cm⁻¹). (a). Silício hidrofílico. (b). Silício hidrofóbico.

Região da amida I (1600 cm⁻¹ - 1700 cm⁻¹)

Esta região apresenta alguns picos em comum, (figuras 5.11(a) e 5.11(b)), para os dois tipos de deposição, embora os perfis de absorção deles sejam significativamente diferentes: 1608,4 cm⁻¹, 1635,4 cm⁻¹, 1652,7 cm⁻¹, 1674,9 cm⁻¹. Estes picos fazem parte da estrutura de regiões mais largas de absorção (estão convoluídos com outros picos nestas regiões). Na literatura, picos em 1652 cm⁻¹(1651 cm⁻¹-1657 cm⁻¹) estão relacionados com α -hélice (Byler, et al., 1986), 1635,4 cm⁻¹ (1628 cm⁻¹-1634 cm⁻¹) estão relacionados com folhas β , (Byler, et al., 1986).

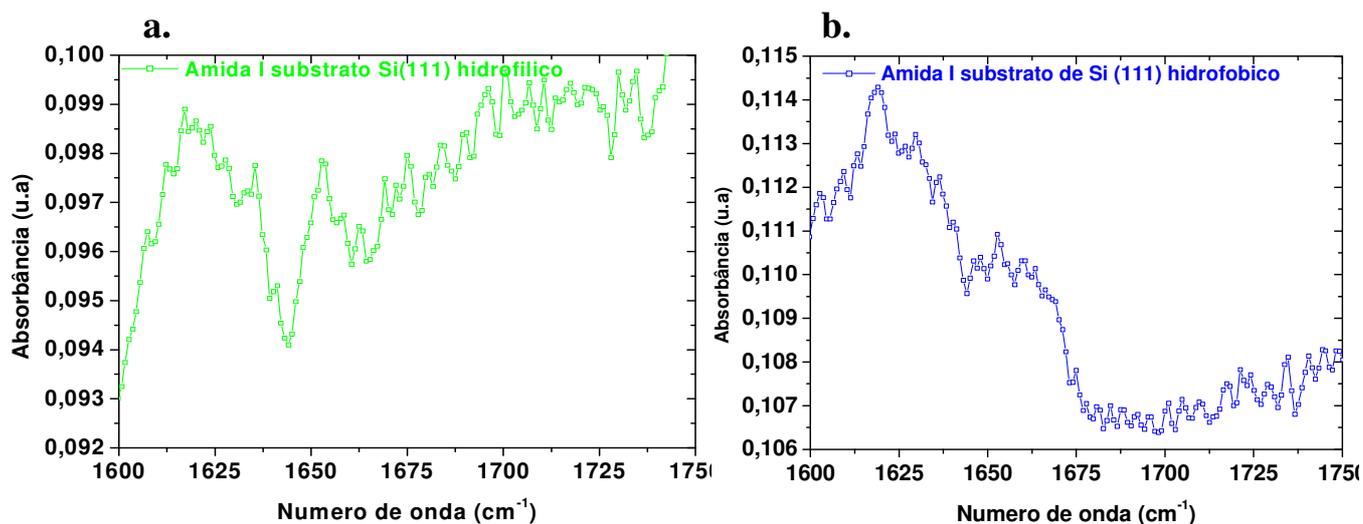


Figura 5.11: Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (111) na região de absorção da banda da amida I (1600 cm^{-1} a 1700 cm^{-1}). (a). Silício hidrofílico. (b). Silício hidrofóbico.

5.7 Espectros do infravermelho obtidos para Si (100) com a proteína adsorvida

No caso do silício (100), os espectros de absorção da proteína GlnB-Hs (figura 5.12), também mostram uma variação em função do estado de hidrofiliicidade do substrato, e não apresentam perfis semelhantes ao da absorção da proteína desnaturada.

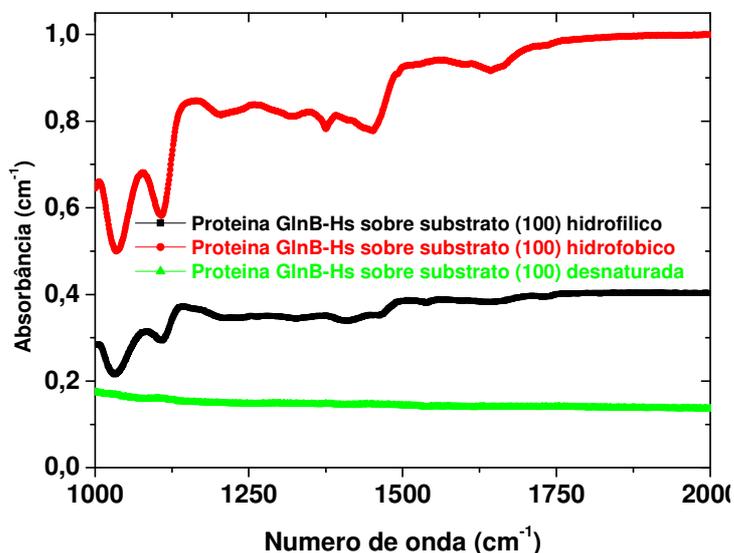


Figura 5.12: Gráfico do espectro de absorbância da proteína GlnB-Hs sobre Si (100), hidrofóbico e hidrofílico, apresentando as principais bandas características nos dois casos.

A tabela 5.2 a seguir, resume as principais bandas de absorção da proteína GlnB-Hs depositada no silício (100):

Si(100)	Hidrofílico Bandas de absorção (cm^{-1})	Hidrofóbico Bandas de absorção (cm^{-1})
Amida I	1612,2-1725,1	1600,7-1643,1
		1643,1-1737,6
Amida II	1460-1500,3	1452,2-1492,7
	1503,3-1513,9	1492,7-1600
	1513,9-1538	
	1538-1596,8	
Amida III	1107,9-1207,2	1107-1203,4
	1207,2-1326,8	1203,4-1318,1
	1326,8-1408,8	1318,1-1375
	1408,8-1460	1375-1452,2

Tabela 5.2: Resumo das principais bandas de absorção da Proteína GlnB-Hs por categoria de absorção de amida para o substrato de silício (100) hidrofílico e hidrofóbico.

Região da amida III (1000 cm^{-1} a 1450 cm^{-1})

Nesta região, ambos os perfis de absorção apresentam picos nas mesmas faixas de número de onda, mas com perfis de absorção diferentes, (figuras 5.13(a) e 5.13(b)), Por exemplo, nota-se um pico largo entre 1107 cm^{-1} a 1207 cm^{-1} , para ambos os perfis, mas com um ligeiro ombro para o caso da superfície hidrofílica. Os picos de absorção relacionados com a deformação angular no plano do grupamento N-H e com a deformação axial do grupamento C-N estão deslocados em número de onda e seus perfis de absorção são apreciavelmente diferentes.

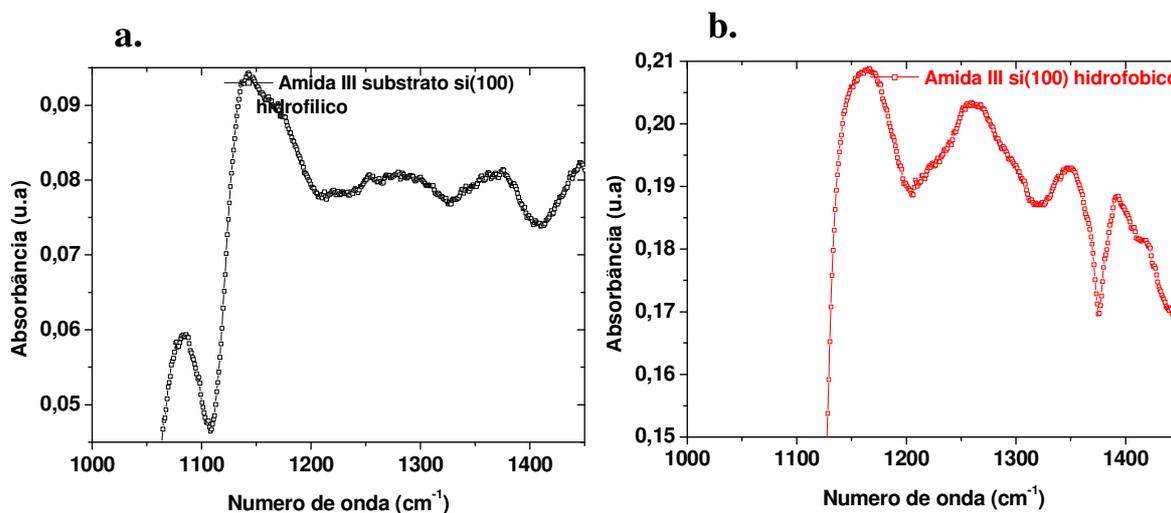


Figura 5.13: Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (100) na região de absorção da banda da amida III (1000 cm^{-1} a 1450 cm^{-1}). (a). Silício hidrofílico.(b). Silício hidrofóbico.

Região da amida II (1450 cm^{-1} - 1600 cm^{-1})

Esta região também é diferente com relação aos perfis de bandas de absorção, quando se comparam os dois substratos. O silício hidrofóbico, (figura 5.14(b)), apresenta uma larga banda de absorção, contrastando com o substrato hidrofílico, (figura 5.14(a)), que apresenta nesta região bandas largas, mas em três regiões distintas.

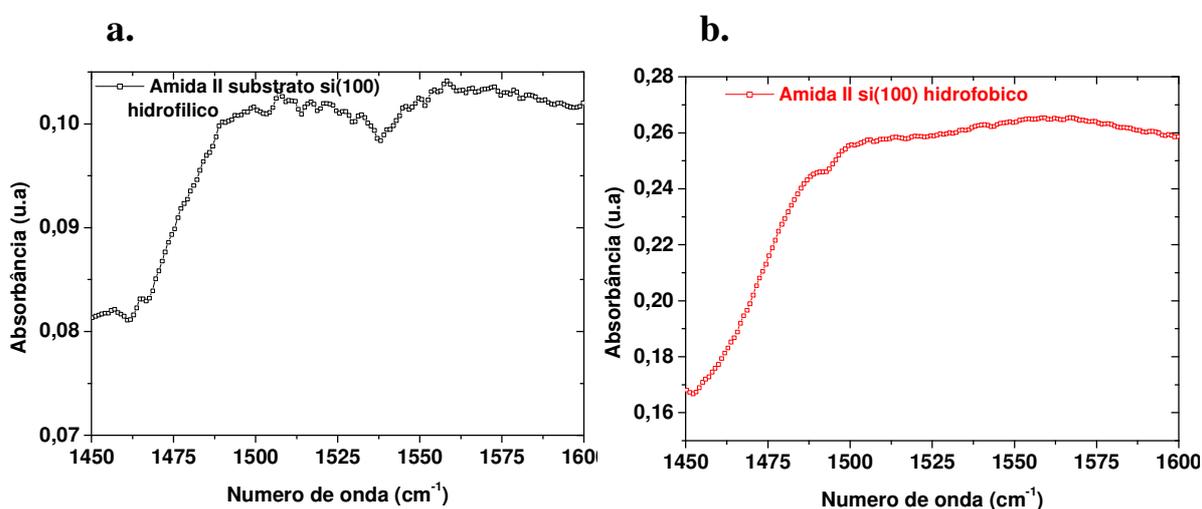


Figura 5.14: Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (100) na região de absorção da banda da amida II (1450 cm^{-1} a 1600 cm^{-1}). (a). Silício hidrofílico. (b). Silício hidrofóbico.

Região da amida I (1600 cm^{-1} - 1700 cm^{-1})

O substrato hidrofílico, (figura 5.15(a)), apresenta uma região com uma elevação mais pronunciada na região entre 1700 cm^{-1} e 1725 cm^{-1} aproximadamente. Excluindo este

fato, pode se concluir que os dois perfis nesta região são qualitativamente semelhantes. Apesar de que, também, o substrato hidrofóbico, (figura 5.15(b)), apresenta um ligeiro ombro mais pronunciado do que o substrato hidrofílico, entre $1643,1-1737,6\text{ cm}^{-1}$. O substrato hidrofílico apresenta picos visíveis em $(1603,7, 1617\text{ e } 1635,4)\text{ cm}^{-1}$ ($1628\text{ cm}^{-1}-1634\text{ cm}^{-1}$), o qual está relacionado com folhas β (Byler, et al., 1986). No entanto, estes picos não se encontram visíveis no espectro para caso hidrofóbico. As bandas para ambos os perfis de absorção estão visivelmente convoluidas com outros picos de absorção.

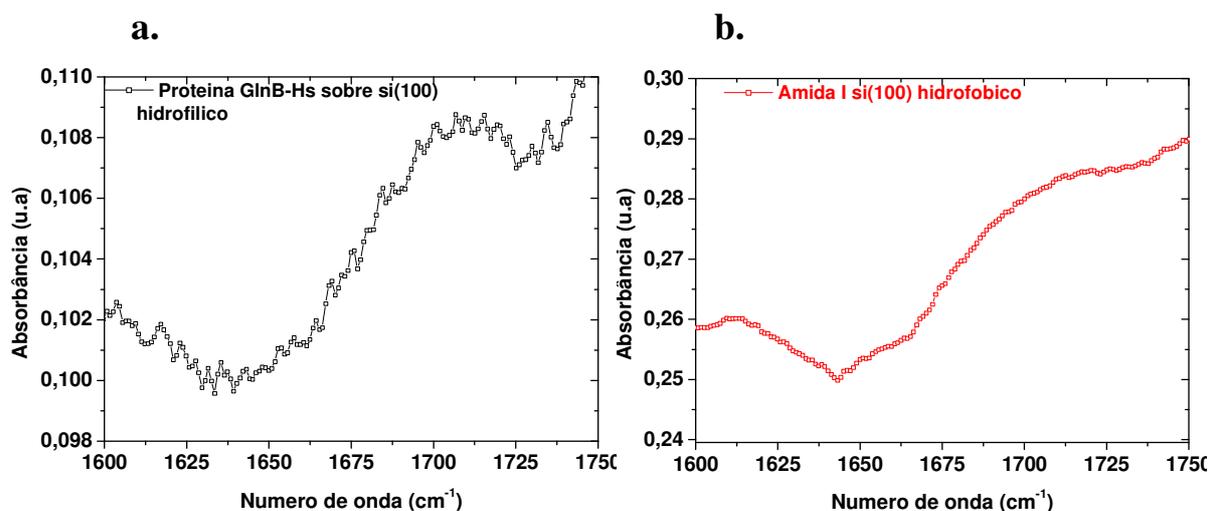


Figura 5.15: Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (100) na região de absorção da banda da amida I (1600 cm^{-1} a 1700 cm^{-1}). (a). Silício hidrofílico. (b). Silício hidrofóbico.

5.8 Comparação entre espectros de substratos com orientação cristalina diferentes

Si (100) hidrofílico e Si (111) hidrofílico

O gráfico 5.16 apresenta uma visão geral do espectro de 1000 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} para os dois casos. Quando se comparam os dois espectros de absorção, nota-se uma semelhança qualitativa. Uma visão mais detalhada por bandas, porém mostra que na região da amida I, o pico de absorção em 1652 cm^{-1} relacionado com a α -hélice (Byler, et al., 1986), (figura 5.16b), não está visível para o silício (100). Porém, ambos possuem o pico de absorção em $1635,4\text{ cm}^{-1}$ característico de estrutura de folhas β (Byler et al., 1986).

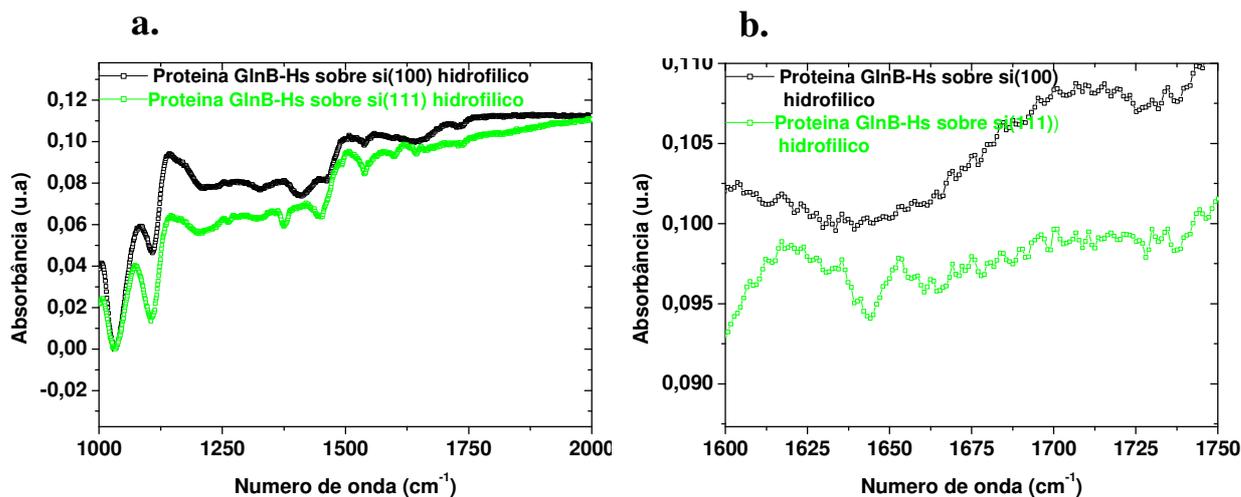


Figura 5.16: (a). Vista geral do espectro de absorção do silício (100) e silício (111) hidrofílico, ambos apresentando características semelhantes. (b). Detalhes do espectro de absorção da proteína GlnB-Hs sobre silício (100) e silício (111) hidrofílicos na região de absorção da banda da amida I (1600cm⁻¹ a 1700 cm⁻¹).

Si (100) hidrofóbico e Si (111) hidrofóbico

Através da figura 5.17 observa-se que o espectro de absorção para o caso do Si (111) e Si (100) hidrofóbicos são apreciavelmente diferentes. Com a retirada da camada de SiO₂, estes substratos diferem pelo empacotamento e pela simetria planar. No caso do silício (111), o empacotamento é mais fechado com simetria hexagonal. No caso do silício (100), o empacotamento é menor, com simetria cúbica. Provavelmente, o fato de se ter espectros de absorção distintos parece evidenciar que a ausência da camada de óxido promoveria a influência da orientação cristalina dos substratos no arranjo das monocamadas de proteína GlnB-Hs. Com a camada de óxido, a proteína passaria a "quase" interagir com os dois substratos como se fossem iguais. No entanto, os espectros apresentam algumas pequenas diferenças de picos de absorbância devido, provavelmente à diferença de espessura de camada de óxido, que é bem menor para Si (100).

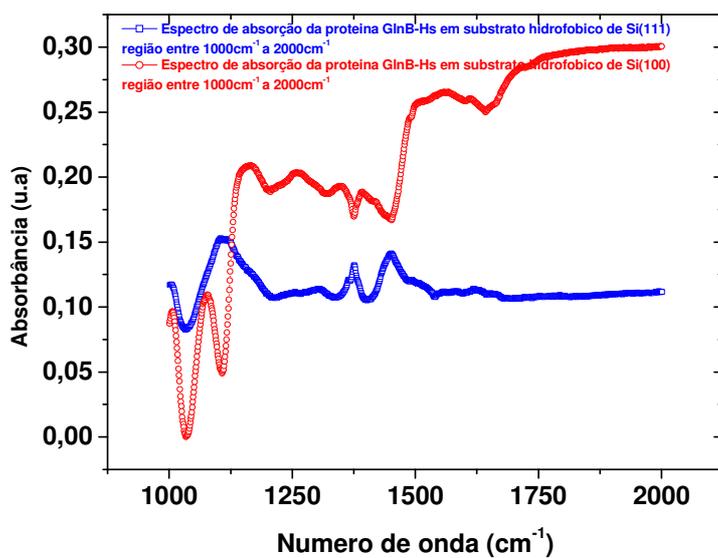


Figura 5.17: Gráfico do espectro de absorvância da proteína GlnB-Hs sobre Si (111) e Si (100) hidrofóbicos, apresentando as principais bandas características nos dois casos.

Conclusão do capítulo 5

Existem significativas diferenças quando se comparam as bandas de absorção entre os substratos de silício (111) hidrofílico e hidrofóbico. Ausência de picos é característica do substrato hidrofóbico. Como por exemplo, o pico de absorbância entre 1450 cm^{-1} - $1492,7\text{ cm}^{-1}$ na banda da amida II e na amida III entre $1201,5\text{ cm}^{-1}$ - $1320,1\text{ cm}^{-1}$ e $1104,1$ - $1201,5\text{ cm}^{-1}$. Existe também alargamento de picos como para o pico entre $1032,7\text{ cm}^{-1}$ - $1210,1\text{ cm}^{-1}$. Por outro lado, olhando-se a banda de absorção da amida I para ambos os casos, foi detectado picos característicos estruturais relacionados com folhas β ($1635,4\text{ cm}^{-1}$) e α -hélice ($1652,7\text{ cm}^{-1}$) para ambos os casos.

Para os casos Si (100) hidrofílico e hidrofóbico, um comportamento semelhante acontece: ausência de bandas, desta vez no caso hidrofílico em $1643,1\text{ cm}^{-1}$ - $1737,6\text{ cm}^{-1}$, para a amida I, e no caso hidrofóbico, em $1513,9\text{ cm}^{-1}$ - 1538 cm^{-1} e 1538 cm^{-1} - $1596,8\text{ cm}^{-1}$, para a amida II.

Observando-se a banda da amida I para ambos os casos, vê-se que em geral, seguem a mesma tendência com relação ao perfil das faixas de absorção. O substrato hidrofílico apresenta um pico visível a $1635,4\text{ cm}^{-1}$, o qual está relacionada com a estrutura folha β .

Quanto aos substratos hidrofílicos de orientações cristalinas diferentes, nota-se uma grande semelhança qualitativa. Na região da absorção da amida I, porém, o substrato Si (100) não apresenta o pico de absorbância em 1652 cm^{-1} relacionado com a estrutura α -hélice. No entanto, ambos apresentam o pico de absorbância em $1635,4\text{ cm}^{-1}$ característico da estrutura folha β .

Quanto aos substratos hidrofóbicos de orientações cristalinas diferentes, observa-se que o espectro é bastante distinto. Esta diferença poderia estar relacionada com a ausência da camada de óxido que promoveria uma maior influência do substrato no arranjo protéico diferenciando-os, e por sua vez, isso se refletiria no espectro de absorção.

Capítulo 6

Raios-X em incidência rasante da Proteína GlnB-Hs sobre Silício

Neste capítulo serão descritas as bases da técnica de Raios-X em incidência rasante e sua aplicação ao estudo da estrutura de um filme fino de proteína globular produzido pela técnica de "spin-coating" em um substrato sólido de silício. Em seguida, os resultados experimentais obtidos serão apresentados e discutidos de acordo com a investigação desta organização em função da velocidade dos substratos e em função das duas orientações cristalinas (100) e (111).

6.1 Introdução à técnica

A superfície de um material está relacionada diretamente com a estrutura atômica deste. A superfície dos materiais sólidos contém tipicamente 10^{15} átomos / cm^2 (Feidenhans'l, 1989), levando a uma baixa relação sinal-ruído e fazendo com que o sinal não seja detectável com técnicas convencionais de Raios-X. Assim, a disseminação de fontes de alta brilhância e colimação, como é o caso dos síncrotrons, vêm se mostrando especialmente útil no estudo de superfícies e interfaces, como é o caso dos filmes de proteína em investigação neste trabalho.

A condição de incidência rasante, com reflexão total, cria uma onda evanescente que se propaga ao longo da superfície com penetração da ordem de 100 Å. Esta técnica permite o exame da ordem cristalina, mesmo em filmes orgânicos, com grande resolução e sensibilidade.

Este método de investigação de filmes finos vem demonstrando bons resultados tanto em substrato líquido como em suporte sólido. No caso de interfaces ar-líquido, arranjos de peptídeos formados de 3 folhas β já foram caracterizados (Rapaport, 2002), além de ser usual a caracterização de longas cadeias anfifílicas (Leveiller et al., 1994), filmes finos surfactantes (Kjaer, 1994) e lipases (Jensen et al., 2001). Esta técnica é bastante difundida em interfaces líquidas com uma bibliografia extensa, citando como um exemplo, (Als-Nielsen, et

al., 1994), que trata do tipo de empacotamento da molécula sobre a superfície líquida, do ângulo de inclinação em relação a cadeias vizinhas, além do cálculo da densidade eletrônica através dos perfis experimentais de refletividade. Já se elucidou, também, através dessa técnica em interfaces líquidas, a estrutura de proteína de uma membrana com 27 kDa (Verclas, et al., 1999). O estudo de monocamadas depositadas em suporte sólido, por sua vez desenvolveu-se primeiramente com moléculas de cadeias anfifílicas em silício (Seul, et al. 1983), em prata (111) (Fenter et al., 1991), em ouro (111) (Samant et al., 1991). Em seguida, em sistemas mais complexos como membranas com lipídeos em silício (Salditt, 1999), proteínas de membranas em substrato de silício (Koltover, 1998), e utilizando a técnica de “spin-coating” com bicamada de lipídeos (Mennicke, 2002).

A difração de Raios-X em incidência rasante

Sempre que a onda eletromagnética atravessa um meio opticamente denso (alto índice de refração) em direção a um meio menos denso (baixo índice de refração) poderá ocorrer o fenômeno da reflexão total. Para Raios-X a densidade ótica do ar é maior do que nos sólidos. Assim, a reflexão total ocorre em condições mais favoráveis do que para o caso da luz visível ou para o infravermelho.

A reflexão total produz uma onda evanescente que se propagará ao longo da interface entre os dois meios. Mesmo que a diferença no índice de refração seja muito pequena, da ordem de 10^{-5} , ocorrerá a reflexão total. Este efeito pode ser usado de forma a realçar o sinal da superfície e diminuir o sinal do volume do material.

O índice de refração n de um material é dado pela seguinte expressão:

$$n = 1 - \delta - i\beta = n_r + in_i \quad (6.1.1)$$

Onde $1-\delta$ é a parte real do índice de refração e β é a parte relacionada com a absorção do meio. α_i , α_r , α_c são os ângulos de incidência, refração e ângulo crítico, respectivamente. A lei de Snell pode ser escrita da seguinte maneira:

$$\cos \alpha_i = n \cos \alpha_r \quad (6.1.2).$$

Na condição de reflexão total $\alpha_r=0$ e α_i se torna o ângulo crítico de incidência α_c . A seguinte relação passa a ser válida, desprezando-se o termo de absorção:

$$\cos \alpha_c = 1 - \delta \quad (6.1.3).$$

Como a refração total irá ocorrer para ângulos muito pequenos de incidência, pode-se expandir $\cos \alpha$:

$$\begin{aligned} \cos \alpha_c &= 1 - \frac{\alpha_c^2}{2} = 1 - \delta \\ \alpha_c &= \sqrt{2\delta} \end{aligned} \quad (6.1.4).$$

A lei de Snell será escrita desprezando os termos de 4ª ordem:

$$\alpha^2_r = \alpha^2_i - \alpha^2_c \quad (6.1.5).$$

O ângulo de refração torna-se imaginário quando α_i for menor do que α_c .

A profundidade de penetração é descrita pela seguinte expressão considerando desta vez o termo de absorção (Feidenhans'l, 1989):

$$L = \frac{\lambda}{2\sqrt{2\pi}} \left[\sqrt{(\alpha_c^2 - \alpha_i^2) + (2\beta)^2} + \alpha_c^2 - \alpha_i^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (6.1.6).$$

Utilizando as equações de continuidade dos campos na interface conjuntamente com as leis de Maxwell podem-se deduzir as amplitudes das ondas refletidas e refratadas (equações de Fresnel). No limite de ângulos pequenos de incidência, R e T são independentes da polarização (Feidenhans'l, 1989).

$$E_r = RE_i \text{ e } E_t = TE_i$$

$$R = \frac{\alpha_i - \alpha_c}{\alpha_i + \alpha_c}, T = \frac{2\alpha_i}{\alpha_i + \alpha_c} \quad (6.1.7).$$

Quando o ângulo de incidência é menor que o ângulo crítico, pela equação 6.1.5, o ângulo de refração torna-se imaginário e $|R|=1$, o que significa que todo feixe de Raios-X incidente sobre a superfície do material é refletido pela superfície, e isto é o que se chama de reflexão total.

Para se obter informações sobre a estrutura do filme fino formado, existem duas geometrias usuais: a informação da estrutura vertical das monocamadas de proteína são obtidas no caso em que o ângulo incidente e o ângulo refletido são os mesmos ($\alpha_i = \alpha_r = \alpha$ e $2\alpha_{xy}=0$), (figura 6.1). O vetor de espalhamento neste caso é $|\mathbf{q}_z|=2k\sin\alpha$, (Jensen et al., 2001).

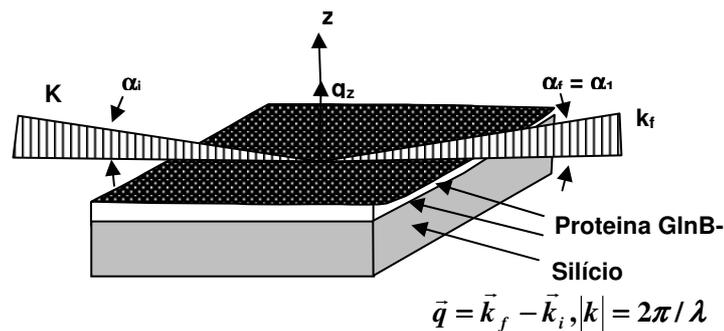


Figura 6.1: Geometria 1, mostrando os vetores de incidência e espalhamento ($\alpha_i = \alpha_r = \alpha$ e $2\theta_{xy}=0$), (Jensen et al., 2001).

A segunda geometria usual para se obter informações da estrutura da monocamada no plano do substrato pode ser vista no diagrama esquemático da figura 6.2, sendo $\alpha_i = 0,85\alpha_c$. A intensidade espalhada é função dos ângulos vertical e horizontal, ou seja, ($2\theta_{xy} \neq 0$) e $\alpha_i \geq 0$. As direções dos vetores incidente e espalhado são $|\mathbf{k}_i| = |\mathbf{k}_f| = k = 2\pi/\lambda$ (Jensen, et al., 2001). Esta geometria foi testada também no LNLS recentemente (fevereiro, 2005) e seus resultados estão sob análise.

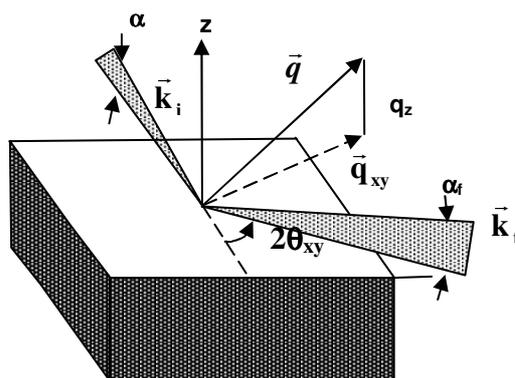


Figura 6.2: Geometria 2, mostrando os vetores de incidência e espalhamento formando o triângulo de espalhamento no espaço recíproco, ($2\theta_{xy} \neq 0$) e $\alpha_f \geq 0$ (Jensen et al., 2001).

6.2 Resultados experimentais

O objetivo desta investigação é o estudo da organização estrutural do filme de proteína GlnB-Hs, depositado por “spin-coating”, através do uso da difração a ângulos rasantes na busca de arranjo(s) organizado(s), cristalinos do filme protéico. Os resultados foram executados em duas fases. Na primeira fase foram utilizadas informações provenientes da espectroscopia de fotoelétrons (XPS) que indicaram a velocidade de 1000 rpm como a mais adequada para um recobrimento homogêneo. A concentração de proteína foi aumentada para 10 nMol com o objetivo de favorecer a detecção do sinal proveniente da proteína. Ainda com o objetivo de aumentar o sinal da proteína, uma variação da deposição a 1000 rpm foi feita através do acréscimo de uma segunda deposição de proteína para aumentar o sinal proveniente das camadas ordenadas formadas. Uma segunda velocidade para substrato também foi utilizada em função de medidas preliminares terem acusado um provável pico de difração com uma amostra preparada com o substrato girando a 2500 rpm. A velocidade de 2.500 rpm também foi escolhida para lavagem do excesso de solução e eliminação das moléculas mais leves que a proteína durante a deposição. Estas moléculas fazem parte da solução tampão. (EDTA (292,2 g/mol, monoclinico, $a=12,032 \text{ \AA}$, $b=7,5704 \text{ \AA}$, $c = 9,33 \text{ \AA}$),

NaCl (58,45 g/mol, cúbico, $a = 5,6402 \text{ \AA}$), Tris-HCl (132,1 g/mol, monoclinico, $a = 16,112 \text{ \AA}$, $b = 5,5774 \text{ \AA}$, $c = 13,287 \text{ \AA}$) e glicerol (92,1 g/mol)). A proteína possui a massa molecular de (35975,5 g/mol).

Há uma grande probabilidade de que moléculas mais leves (maior difusividade na solução), que molécula de proteína, sejam expulsas durante a rotação com grande velocidade angular. Além do mais, os solventes que estabilizam a molécula de proteína são preferencialmente excluídos do domínio protéico, pois existe um raio de exclusão devido ao fenômeno chamado de exclusão estérica. Como resultado, uma zona rica em água é formada em torno da proteína. O motivo básico para esta exclusão é a diferença em tamanho da molécula da água para os co-solventes (Creighton, 1997). O glicerol é excluído por motivos "solvofóbicos" isto é, o contato com a água para a proteína é mais entropicamente favorável do que com a água-glicerol. NaCl é um sal que preferencialmente atua fracamente em grupos carregados ou ligações peptídicas da proteína, sendo também excluído preferencialmente. Portanto, durante os primeiros segundos de rotação, quando as forças inercias dominarão e 90% do solvente será ejetado (Lawrence, 1988), as moléculas mais leves e "excluídas" do contato direto com a superfície da proteína permitirão que a proteína de se adsorva preferencialmente. Somente uma quantidade negligenciável destas moléculas também irá co-adsorver.

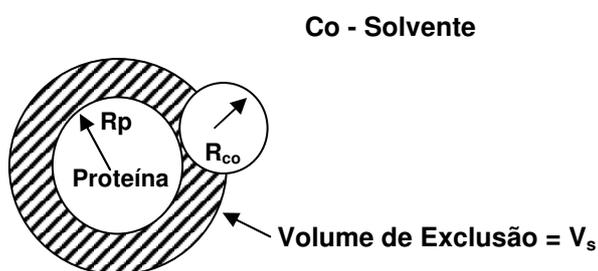


Figura 6.3: Desenho esquemático do raio de exclusão efetivado pela proteína devido ao fenômeno de exclusão estérica.

Protocolo de adsorção da proteína GlnB-Hs no substrato de silício

Foram utilizadas bolachas de silício comerciais do tipo p, dopados com boro na orientação (111) e (100), com 450 μm de espessura como substratos sólidos. Os substratos foram clivados em peças de 1cm^2 e foram limpos segundo o protocolo de limpeza descrito no capítulo 1.

A solução de proteína foi diluída em uma solução como descrita no capítulo 1 e as superfícies de Si (100) e Si (111) foram incubadas com uma gota de 10 μL pipetada centralmente no substrato girante à temperatura ambiente. O excesso foi eliminado lavando o substrato três vezes com uma solução de 20 μl de 10mM Tris/HCl pH 8. As amostras foram deixadas para secar em uma sala com a temperatura (24°C) e a umidade (40%) controladas antes da análise de Raios-X.

Três tipos de depósitos de proteína foram efetuados para cada tipo de substrato como pode ser visto na tabela 6.1.

Amostra	Quantidade de proteína	Quantidade de tampão 3X	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Protocolo repetido
	($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Velocidade de deposição substrato (rpm)	Tempo de adsorção (s)	Velocidade de lavagem do substrato (rpm)	
Si (111) F	35,97	20	2500	não	2500	não
Si (111) B	35,97	20	1000	30	2500	não
Si (111) L	35,97	20	1000	30	2500	sim
Si (100) 1	35,97	20	2500	não	2500	não
Si (100) 2	35,97	20	1000	30	2500	não
Si (100) 3	35,97	20	1000	30	2500	sim

Tabela 6.1: Tipos de depósitos efetuados

No primeiro caso, uma gota de 10 μL de solução foi pipetada com o substrato girando a 2500 rpm, depois o substrato foi lavado com a solução de Tris/HCl por três vezes. No segundo tipo de depósito, um volume igual de solução com proteína foi pipetado, mas a velocidade do substrato foi de 1000 rpm. Deixou-se a proteína incubar por 30 segundos e lavou-se o substrato a 2500 rpm. O terceiro tipo de depósito foi executado da mesma forma que o segundo, com a diferença que, depois da lavagem, o substrato foi desacelerado a 1000 rpm e procedeu-se a uma segunda deposição de 10 μL de solução de proteína que também foi incubada por 30 segundos e lavada a 2500 rpm com Tris/HCl pela segunda vez.

Parâmetros da coleta de dados

O experimento foi realizado em um difratômetro de seis círculos na linha de difração XRD2 (LNLS, Campinas), (Giles et al., 2003). A informação do arranjo da estrutura vertical das monocamadas de proteína foi obtida em uma geometria onde o ângulo incidente e o ângulo refletido foram os mesmos ($\alpha_i = \alpha_r = \alpha$ e $2\theta_{xy} = 0$). O vetor de espalhamento é $|q_z| = 2k \sin \alpha$.

A energia utilizada no experimento foi de 7615 eV com o feixe de área 1mm^2 focalizado na amostra. As fendas verticais e horizontais foram ajustadas para iluminar uma área no substrato de 1 mm de largura e o comprimento total da amostra de silício (1 cm). Os possíveis efeitos da radiação foram minimizados mantendo o “shutter” aberto somente durante a coleta de dados. Os perfis iniciais de espalhamento foram executados em geometria θ - 2θ usando um cintilador "cyberstar" e "image plate". Todas as medidas foram executadas à temperatura ambiente. Perfis de espalhamento do silício (100) e silício (111) também foram obtidos sem a deposição da proteína para serem usados com referência, eles são mostrados nas figuras 6.4(a) e 6.4(b).

Perfis de refletividade do silício(100) e de silício(111) usados como referência

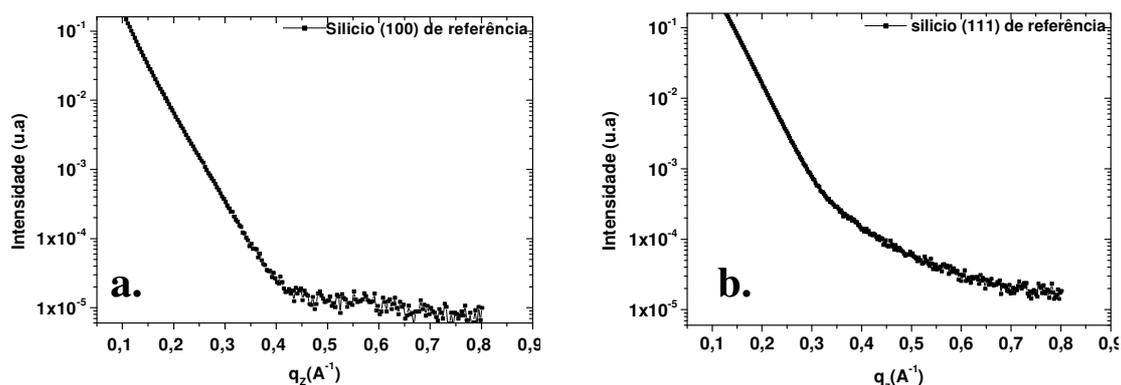


Figura 6.4: Perfis de refletividade (a). silício (100) de referência. (b). Si (111) de referência. Notar a ausência de ombros.

Tratamento dos dados

Todos os perfis de espalhamento foram normalizados levando em conta a corrente no anel e o espalhamento difuso para poder permitir comparações. O perfil de espalhamento do silício de referência foi usado para subtração e o espalhamento incoerente foi modelado com uma função exponencial decrescente e então subtraído dos perfis de difração na região de espalhamento situada entre $0,125 \text{ \AA}^{-1}$ e $0,157 \text{ \AA}^{-1}$.

Resultados

GlnB-Hs, como mostra as figuras 6.5(a) e 6.5(b) na próxima página, e como foi discutido no capítulo 3, forma arranjos circulares de agregados de proteína em forma de anel quando depositado no silício. As dimensões desses agregados variam entre 100 nm e 130 nm de largura com alturas até 3,12 nm. Estes agregados circulares de proteína, por sua vez, são formados também por unidades protéicas em forma de anéis com uma largura aparente em torno de 10 a 28 nm. Seu arranjo em silício (111) hidrofílico é essencialmente na configuração dos anéis com a face para cima (Lubambo, et al., em impressão). No caso em que se deposita somente a solução tampão sobre silício, não existe a formação de anéis característicos da deposição com proteína, como é mostrado nas figuras 6.5(c) e 6.5(d.)

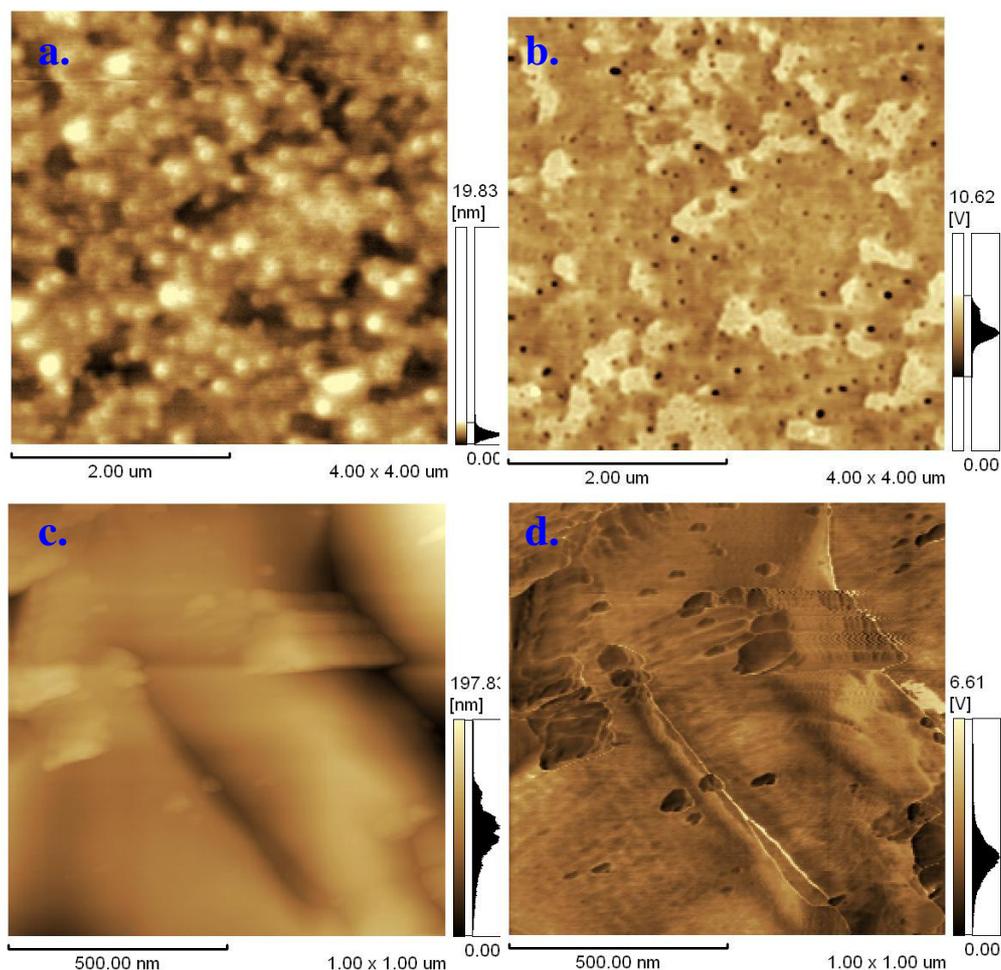


Figura 6.5 (a). Imagem AFM em modo dinâmico da Proteína GlnB-Hs (10 nMol), depositada a 1000 rpm, lavada 3x com Tris/Hcl a 2500 rpm. (b). imagem de fase da figura a. (c). Solução tampão (50 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl, 0,1 mMol EDTA e 10% glicerol) depositado em Si (100). (d). Imagem de fase da figura c. Dimensões das imagens (4, 00 x 4, 00) μm , a e b; (1,00 x 1,00) μm c e d.

Perfis de refletividade da proteína GlnB-Hs sobre Si(111) hidrofílico

Os perfis de difração para o Si (111) apresentam duas regiões de espalhamento características. A primeira região se situa entre $0,125 \text{ \AA}^{-1}$ e $0,194 \text{ \AA}^{-1}$, e é mostrada na figura 6.6. Estes picos foram obtidos após a subtração do “background” para as amostras B e F. Para a amostra L, a subtração não foi necessária. O pico que aparece na amostra L (figura 6.6(b)) tem uma largura à meia altura de $0,97 \text{ \AA}^{-1}$. O que produz, utilizando a fórmula de Scherrer (Guinier, 1963), eq. 6.2.1, um domínio de coerência em torno de $L_z = 60 \text{ \AA}$, o que

equivalaria a um empilhamento de duas proteínas GlnB-Hs se elas estivessem com a face para cima com altura de 30 Å.

$$L_z = 0,88 \left(\frac{2\pi}{FWHM(q_z)} \right) \quad (6.2.1).$$

onde L_z é tamanho aparente do domínio coerente, $FWHM$ é a largura a meia altura em q_z .

Estes perfis de espalhamento do Si (111) possuem uma área larga de difração na região entre $0,2 \text{ \AA}^{-1}$ e $0,6 \text{ \AA}^{-1}$, (figura 6.6). Este ombro largo está relacionado com o filme formado pela proteína, pois ele muda de perfil com o tempo de irradiação sobre a amostra para todos os casos de deposição.

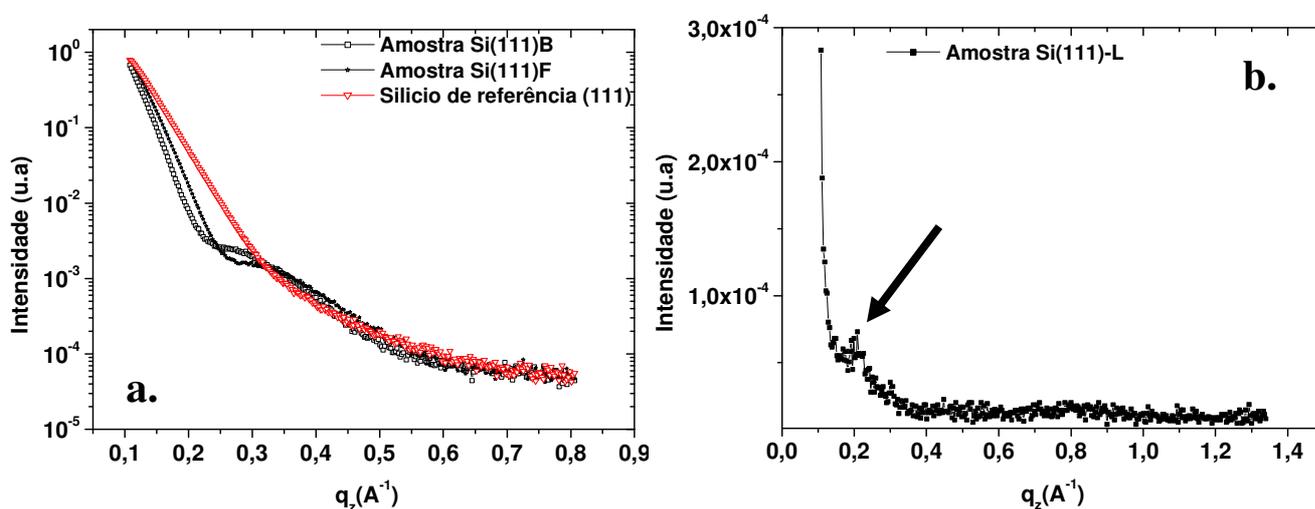


Figura 6.6: Perfis de Refletividade (a). Si (111) em função da deposição e Si (111) de referência. (b). Si (111) L, apresentando um pico de difração em $0,194 \text{ \AA}^{-1}$, $d = 32 \text{ \AA}$, provavelmente está relacionado com a proteína GlnB-Hs.

Perfis de Refletividade da proteína GlnB-Hs sobre Si(100) hidrofílico

Os perfis de difração do Si (100) apresentaram o mesmo comportamento, mostrado na figura 6.7. O primeiro pico de difração para as amostras 2 e 3 depois da subtração do ruído de fundo se situa na região entre $0,130 \text{ \AA}^{-1}$ e $0,157 \text{ \AA}^{-1}$, (figura 6.7). Para a amostra 1 não foi necessária a subtração do ruído de fundo. Usando novamente a fórmula de Scherrer, eq. 6.2.1, o pico na amostra 1, (figura 6.7(b)) corresponde a um domínio de coerência de 246 \AA , o que equivalaria a um empilhamento de 6 proteínas com a face para cima.

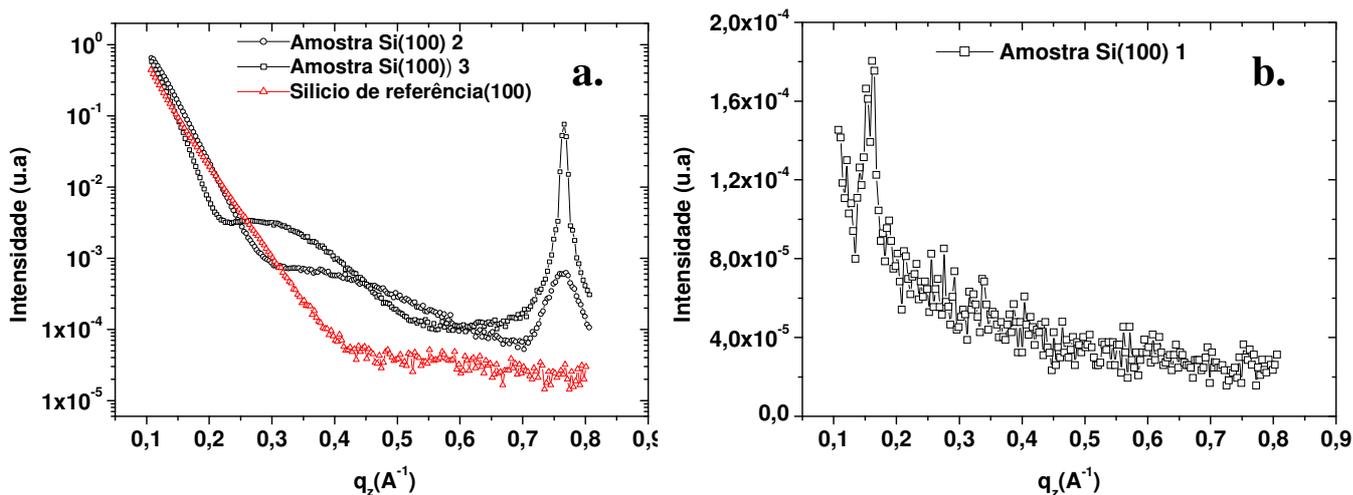


Figura 6.7: Perfis de refletividade (a). Silício (100) em função da deposição e Si (100) de referência. (b). Si (100) amostra 1, apresentando um pico de difração a $0,157 \text{ \AA}^{-1}$, $d = 39,97 \text{ \AA}$. Ele está relacionado com a proteína GlnB-Hs.

A segunda região característica que se repete com um ombro largo, (figura 6.7(a)), se situa na região do perfil de difração entre $0,2 \text{ \AA}^{-1}$ e $0,7 \text{ \AA}^{-1}$ e parece ter um perfil mais largo) do que no caso do Si (111). No caso das amostras 2 e 3, existe uma terceira região característica onde pode se observar um pico intenso situado a $q_z = 0,76 \text{ \AA}^{-1}$, (figura 6.7(a)). Este pico está ausente em Si (111) como pode ser visto nos gráficos das figuras 6.6(a) e 6.6(b). A origem deste pico foi investigada e será descrita na seção seguinte.

Amostra	Posição do pico	Parâmetro de Rede
	$q_z (\text{Å}^{-1})$	$d (\text{Å})$
Si (111) F	0,139	45,28
Si (111) B	0,125	50,34
Si (111) L	0,194	32,4
Si (100) 1	0,157	39,97
Si (100) 2	0,132	47,59
Si (100) 3	0,130	48,33

Tabela 6.2. Lista da posição dos picos de difração e os parâmetros de rede correspondentes.

A tabela 6.2 e as figuras 6.5(a) e 6.5(b), mostram que os parâmetros de rede extraídos dos dados experimentais destes picos de difração estão relacionados com a proteína GlnB-Hs pois, possuem o mesma ordem de grandeza que suas dimensões: 50 Å de diâmetro por 30 Å de altura (Benelli et al., 2002) e estes picos estão ausentes na solução tampão sobre silício que foi usada também como controle, (figuras 6.8(d) e 6.8(d) , na próxima seção).

Perfis de refletividade do tampão, Tris-HCl e EDTA sobre Si(100) hidrofílico

A solução tampão (nas mesmas concentrações e no mesmo volume que é utilizado quando se deposita a solução de proteína, ou seja, 50 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA e 10% glicerol), em seguida, o EDTA (0.1 mMol, puro) e Tris-HCl (50 mMol, puro) foram depositados em Si (100) como perfis de controle, com o objetivo de investigar o pico de difração que aparece em $q_z = 0,76 \text{ \AA}^{-1}$, (figura 6.7(a)), e que não aparece nas deposições de proteína em silício (111). A tabela 6.3 mostra os dados para as deposições.

Amostra	Volume de amostra	Lavagem com Tris-HCl 3x	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Protocolo repetido
			Velocidade de deposição substrato (rpm)	Tempo de adsorção (s)	Velocidade final do substrato (rpm)	
Tampão sobre Si (100)	50 mMol Tris+ 50 mMol Nacl + 0,1mMol EDTA+10% glicerol/10 µL	não	1000	30s	2500	sim
EDTA sobre Si (100)	0,1mMol/ 10 µL	não	1000	30s	2500	não
Tris-HCl sobre Si (111)	50 mMol/20 µL	não	1000	30s	2500	não
Tris-HCl sobre Si 100)	50 mMol/20 µL	não	1000	30s	2500	não
Proteína sobre Si (100) n°4	10 nMol/10 µL	sim	1000	30s	2500	sim

Tabela 6.3: Tabela de depósitos efetuados para tris-HCl, EDTA, solução tampão e proteína sobre Si(100) para controle.

As duas deposições de Tris-HCl mostradas na figura 6.8 (a), apresentam dois picos de difração em $q_z = 0,76 \text{ \AA}^{-1}$ (correspondendo ao plano (1 0-1)) e $q_z = 1,517 \text{ \AA}^{-1}$ (correspondendo ao plano (20-2)). Pode se ver pela figura 6.9, que o Tris-HCl formou um cristal quando foi depositado no substrato de Si (100) e Si (111). Ele cresceu de forma texturizada, na direção vertical, pois somente os picos de difração dos planos (10-1) e paralelos a este apareceram no perfil de difração. É importante observar que a orientação cristalina do substrato não influenciou no crescimento do cristal nessas duas superfícies, ou seja, para esta molécula orgânica leve, se comparada com a proteína, a texturização foi independente da orientação da superfície cristalina. Isso pode significar que a camada de óxido de SiO₂ no substrato é espessa o suficiente para que a molécula não guarde a orientação da superfície cristalina dos substratos Si (100) e Si (111).

Por outro lado, como pode ser observado na figura 6.8 (b), o perfil de difração do tampão seco apresenta um ligeiro ombro na região entre $0,2 \text{ \AA}^{-1}$ e $0,4 \text{ \AA}^{-1}$, mas não apresenta o pico intenso que corresponderia ao Tris-HCl. É muito provável que algum componente na solução tampão esteja impedindo a cristalização do Tris-HCl ou, quando depositado conjuntamente com a proteína, não se deposita em concentração suficiente e em condições ideais para cristalizar (o que já foi discutido na seção 6.2), diferentemente do que acontece quando é depositado sozinho. Observando o gráfico da figura 6.8 (c), onde foi depositado 0,1 mMol de EDTA puro, nota-se que o perfil é muito semelhante ao do Si (100) de referência, (figura 6.8(d), curva preta). Esta semelhança sugere que esta concentração EDTA pode ser muito baixa para detecção por Raios-X ou pode ser que esta molécula não se depositou na superfície de Si (100). Portanto, é muito improvável que esta molécula apresentará um perfil de difração observável quando depositado conjuntamente com a proteína, visto as condições reais que estão sendo utilizadas na deposição da proteína GlnB-Hs.

Em relação à deposição da proteína GlnB-Hs no substrato de silício (100), amostra N° 4, mostrada na figura 6.8(d), iremos notar que esta deposição é uma repetição e equivale a deposição da amostra Si(100) n° 3 (ver tabela 6.3 e tabela 6.1, última linha) . Ao contrário desta amostra 3, medida anteriormente, a amostra 4, não apresenta o pico intenso de difração em $0,76 \text{ \AA}^{-1}$, (figura 6.7(a)). Isto pode significar que este pico intenso apareceu nas duas amostras de Si (100) devido uma concentração maior do que a concentração nominal de Tris-HCl. Pode-se concluir dessa série de experimentos de controle que o pico intenso em $0,76 \text{ \AA}^{-1}$ é provavelmente do Tris-HCl que cristaliza de uma forma texturizada sobre o substrato de silício. Sua cristalização não é influenciada na direção vertical pela orientação do substrato. Quando depositado nas condições da solução de tampão da proteína, os picos de difração do Tris-HCl não aparecem. O EDTA também não apresenta picos de difração nas concentrações usadas de deposição da proteína.

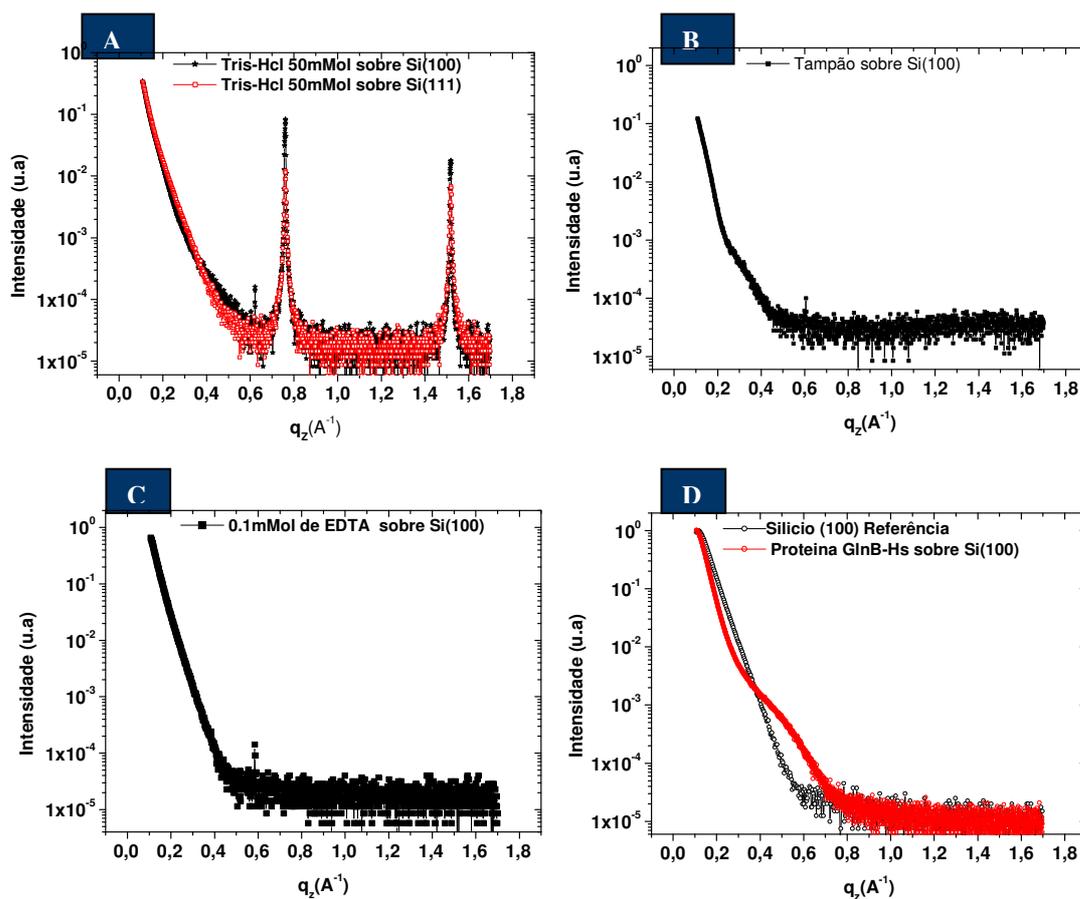


Figura 6.8: (a). Perfil de refletividade de 50 mMol Tris-HCl sobre Si(100),(preto) e Si(111),(vermelho)com analisador de grafite (002). (b). Perfil de refletividade da solução tampão sobre Si (100) com analisador de grafite (002). (c). Perfil de refletividade de 0,1mMol de EDTA sobre Si (100) com analisador de grafite (002). (d). Perfil de refletividade da Proteína GlnB-Hs sobre Si (100), (vermelho) e de Si(100), (preto) de referência.

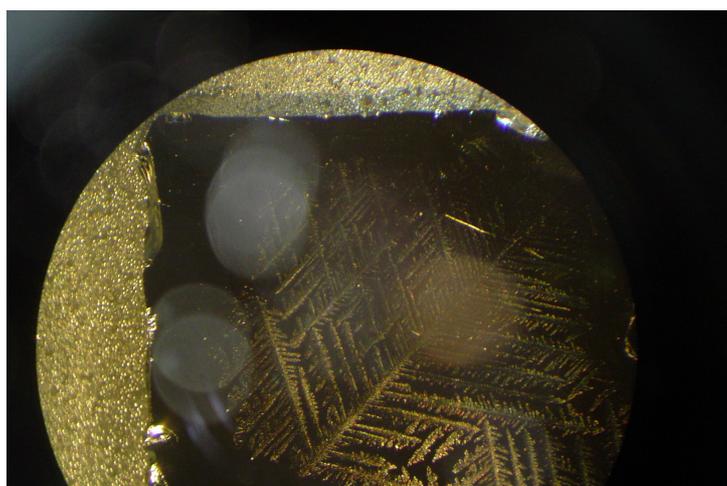


Figura 6.9: Imagem por microscopia ótica da deposição de Tris-HCl 50 mMol sobre silício. As dentritas características de cristalização são visíveis ao centro da imagem.

6.3 Monitoramento da deterioração da proteína por Raios-X

O monitoramento da eventual deterioração do filme de proteína foi executado através da repetição seguida da mesma varredura, na mesma região, com o objetivo de detectar alguma mudança no perfil de difração. O alinhamento da amostra foi otimizado para durar o menor tempo possível com o obturador aberto e o tempo de varredura foi ajustado para dez minutos. Como pode ser visto na figura 6.10 (a), para o caso da amostra Si (111) B, uma pequena mudança foi detectada nos perfil de difração na região do ombro entre duas varreduras seguidas. A coleta de dados nessa situação durou 20 minutos. No entanto, para a amostra Si (100) 3, figura 6.10 (b), uma mudança no perfil do ombro é bastante visível, geralmente o efeito é de tornar o ombro mais menos pronunciado.

No caso da amostra 1 Si(100), varreduras azimutais (φ) com passo de 10 graus, mostradas nas figuras 6.11(a), 6.11(b), 6.11(c) e 6.11(d), foram executadas para analisar um pico de difração situado em $q = 0,31\text{\AA}^{-1}$. Notou-se que este pico era bastante estável sob o feixe.

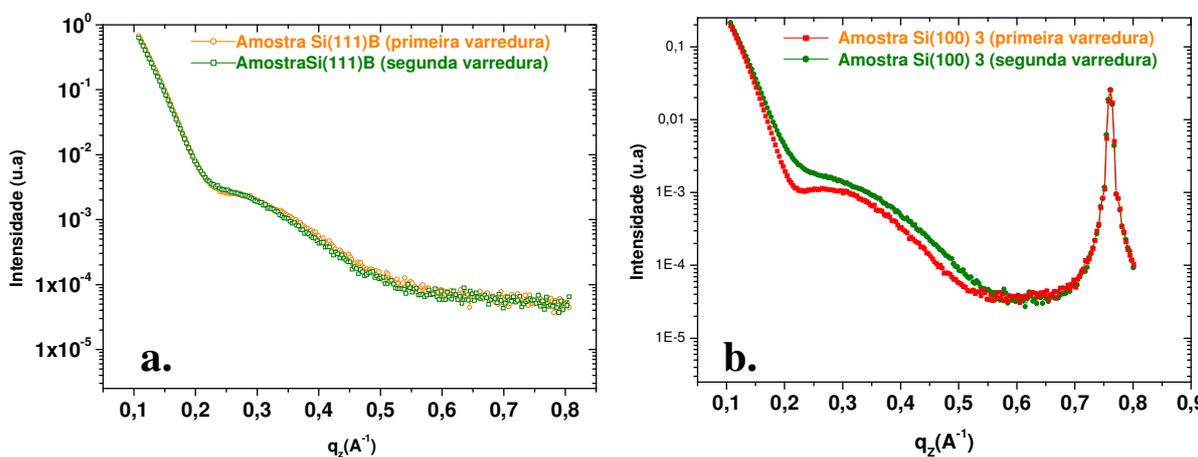


Figura 6.10: (a). Perfil de refletividade para a amostra Si (111)b e a mesma varredura efetuada pela segunda vez. (b) Perfil de refletividade para a amostra Si(100) 3 e varredura correspondente efetuada pela segunda vez.

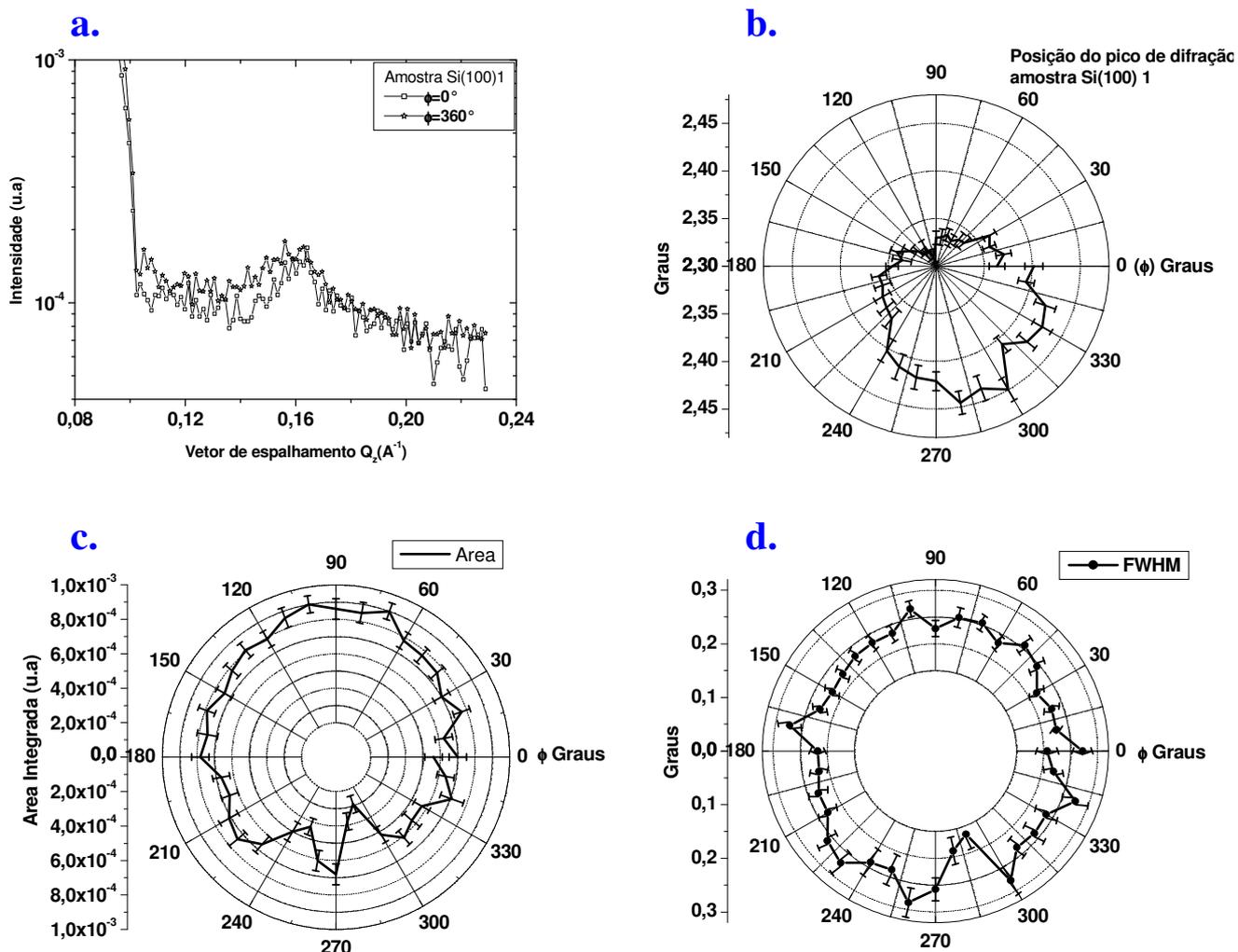


Figura 6.11: (a). Varredura inicial ($\phi=0^\circ$) e final ($\phi=360^\circ$) do pico de difração situado a $q = 0,31 \text{ \AA}^{-1}$. (b). Posição angular de todas as varreduras azimutais. (c). Área integrada relacionada com as varreduras azimutais. (d). Largura a meia altura correspondentes a c.

Como é mostrado na figura 6.11(a), depois de 5 horas de coleta de dados à temperatura ambiente, a intensidade integrada mostrada na figura 6.11(c), diminuiu de 20% e houve somente 1,6% de deslocamento na posição do pico na direção de maior parâmetro de rede (aumento do volume da célula unitária é um dos efeitos característicos de deterioração por radiação), (Ravelli et al, 2000).

É provável que domínios cristalinos sejam muito mais estáveis. O fator determinante da deterioração por radiação é a energia absorvida e não o número de fótons incidentes, desde que sejam preenchidas as seguintes condições: não se deve estar próximo à

uma borda de absorção, a energia devida ao espalhamento Compton deve ser desprezível, a transmissão do feixe de Raios-X deve ser alta e o cristal deve ser pequeno o suficiente para permitir que os fotoelétrons saiam carregando uma quantidade de energia suficiente. De fato, em uma primeira aproximação, quando o livre caminho médio do fotoelétron é maior que o tamanho do cristal de proteína, a dose de radiação absorvida é reduzida devido à ausência do espalhamento Compton que contribui para a emissão de energia incoerente (Nave, et al., 2005).

De acordo com a fórmula de Scherrer, o alargamento do pico de difração é devido ao tamanho finito dos domínios cristalinos. No caso específico deste pico de difração, como foi mencionado na seção perfil de difração para Si (100), o domínio de coerência usando a fórmula de Scherrer é de 246 Å.

Se usarmos a equação 6.3.1 (Ashley, 1980) que prediz o livre caminho médio para elétrons em materiais orgânicos com energia entre 100 eV e 10 keV e com um erro de 10% comparado com medidas experimentais, vamos encontrar um valor de $\Lambda \approx 500$ Å. Este resultado nos mostra que para esta energia (~7 KeV) e para este tamanho de domínio de coerência, a interação do fotoelétron com o domínio é desprezível.

$$\frac{1}{\Lambda} = \left(\frac{\rho N}{ME} \right) \left(13.6 \ln E - 17.6 - \frac{1400}{E} \right) \quad (6.3.1).$$

onde $\rho=0,2674$ g/cm³ é a densidade do material, Λ é o livre caminho médio do fotoelétron em ångstrons, $M=35975,52$ g/mol é o peso molecular, $N= 17214$ é o número de elétrons de valência por molécula ou unidade monomérica, $E = 7$ keV é a energia incidente.

A perda de energia do fotoelétron calculada para uma distância característica utilizando o programa ESTAR, (ver apêndice A6), prediz aproximadamente uma perda de 2,917 eV/Å. Observa-se, por sua vez, utilizando o programa Casino, (figura 6.12(a)), na próxima página, que simula a trajetória de um fotoelétron dentro de um cristal de proteína GlnB-Hs com dimensões de (246x 246) Å que, devido ao pequeno tamanho do domínio, o

fotoelétron criado neste, o atravessa e sai carregando quase toda a energia incidente (figura 6.12(a)). A simulação para um cristal de $1\mu\text{m}^2$, (figura 6.12(b)), por sua vez, mostra que este tamanho já não seria tão favorável como o da situação anterior. Para a energia utilizada neste experimento, o fotoelétron criado dentro do cristal de $1\mu\text{m}^2$ se espalharia mais e teria maior probabilidade de depositar sua energia durante o trajeto. Vale salientar que a probabilidade de se ter domínios cristalinos sem defeitos é maior para domínios menores, neste caso o espalhamento elástico responsável pela difração será predominante. Como consequência direta, ter-se-á menos energia dissipada em cristais pequenos (Murray et al, 2004).

Também é necessário ressaltar que elementos pesados possuem uma significativa seção de choque de absorção. Sabe-se que a radiação primária afeta preferencialmente átomos pesados absorventes (Murray et al, 2004). Mas, não é o caso desta proteína, que possui 2 átomos de enxofre por monômero e nenhuma ponte de dissulfeto. Todos esses fatores citados acima contribuem enormemente para a estabilidade destes domínios cristalinos.

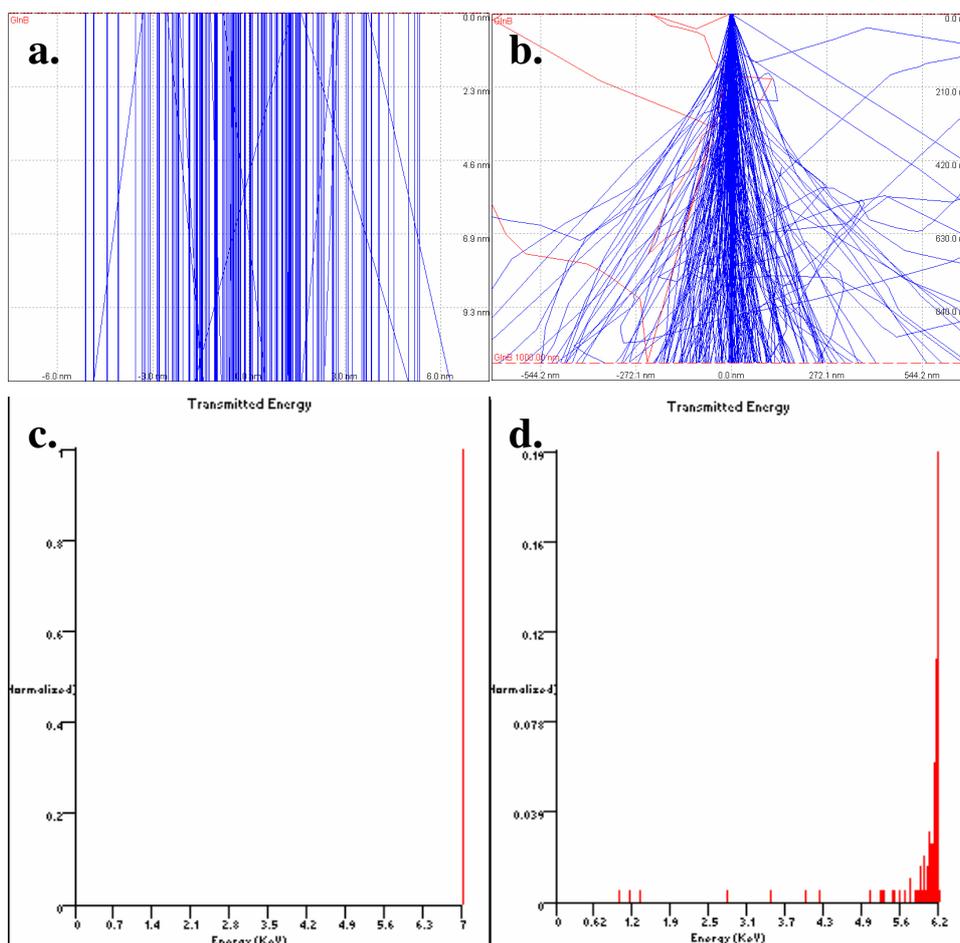


Figura 6.12: Simulação do programa Casino da trajetória de um fotoelétron dentro de um cristal de proteína GlnB-HS com duas dimensões **(a)**. Dimensões de (24,6 x 24,6) nm **(b)**. Dimensões de (1,00 x 1,00) μm . **(c)**. Energia transmitida (KeV) do fotoelétron para caso **a**. **(d)**. Energia transmitida (KeV) do fotoelétron para caso **b**.

Conclusão do capítulo 6

Os resultados de perfis de difração por Raios-X do filme fino de proteína GlnB-Hs formados durante a deposição por "spin-coating" apontam para uma formação de domínios ordenados 2D da proteína em Si (111) e Si (100). Seu arranjo na direção vertical não é influenciado pela orientação do substrato, provavelmente porque a camada de SiO₂ é "suficientemente" espessa para que a informação da orientação cristalina do substrato na direção vertical seja "perdida".

Parâmetros de rede extraídos dos perfis experimentais apontam para um arranjo onde a unidade protéica adsorveria preferencialmente com a face para cima, consistente com os resultados observados por AFM e XPS.

O pico de difração analisado para a amostra de Si (100) 1 aponta para domínios cristalinos estáveis sob o feixe de Raios-X. Estes domínios ordenados poderiam fazer o papel de centros de nucleação para o crescimento de cristais de proteínas e estimular o crescimento e a cristalização de proteínas relutantes. Além do mais, eles permitiriam o estudo do mecanismo de crescimento de cristais de proteínas e forneceriam informações sobre a estrutura da proteína sem a necessidade de utilização dos métodos clássicos, incertos e lentos de cristalização.

A técnica de Raios-X por incidência rasante foi apontada (Boutet et al., 2002) como uma técnica útil e promissora. O fato que a amostra é crescida em um suporte fixo e sólido permite o pronto alinhamento da amostra sob o feixe de Raios-X e o sinal de difração seria realçado devido a dois fatores. Primeiro, pela ausência do espalhamento devido ao substrato. Segundo, há grande áreas iluminadas. No entanto, a vida útil do cristal de proteína e a preparação da amostra não seriam fatores limitantes, como parece demonstrar a estabilidade dos domínios ordenados de GlnB-HS sob o feixe de Raios-X. Esta estabilidade poderia ser

devido ao pequeno tamanho, ordenamento razoável dos domínios e a ausência de átomos fortemente absorvedores na sua estrutura.

Capítulo 7

Conclusão final e Trabalhos Futuros

A grande importância da interação proteína-superfície sólida resulta das inúmeras aplicações nos diversos campos de interesse científico e tecnológico (Gray, 2004). Nos últimos anos, grandes esforços têm sido feitos para o desenvolvimento, não só no campo experimental, como no campo teórico, de experimentos e de modelos que descreveriam o fenômeno de adsorção de proteína em interfaces. O grande objetivo seria poder medir, prever e compreender as interações proteínas-superfície, as conformações adotadas quando em contato com interfaces, ser capaz de quantificar o recobrimento protéico, além de poder descrever a cinética de adsorção através de modelos teóricos (Gray, 2004), não perdendo também de vista a grande vantagem que seria utilizar as propriedades advindas de um arranjo ordenado, onde funções individuais seriam superpostas gerando novas funções de ordem supra-molecular (Adachi, et al., 1997).

Pela sua própria natureza, proteínas são moléculas complexas e não apresentam um comportamento único quando em presença de interfaces. É necessário levar em conta várias interações intermoleculares tais como Van der Waals, eletrostáticas, hidrofóbicas e de solvatação. Portanto, uma teoria rigorosa ainda está faltando (Hlady, et al., 1996). No entanto, o desenvolvimento de experimentos vem permitindo não só o avanço na compreensão teórica desse fenômeno como também, permitindo aplicações diretas em vários campos. Portanto, este trabalho se insere diretamente neste último contexto.

O monitoramento e a caracterização de filmes adsorvidos em superfícies sólidas poderão contribuir para a compreensão deste fenômeno, como também responder a necessidade de controlar a adsorção interfacial através do ordenamento, quantificação de camadas, etc, (Hlady, 1996). No entanto, para ser eficiente, este controle necessita de técnicas de detecção nanométricas. Demonstrou-se neste trabalho que a deposição por “spin-coating”,

conjuntamente com as técnicas de AFM, XPS, Infravermelho e Raios-X, fornecem informações bastante úteis na investigação da camada de proteína formada em silício e são técnicas promissoras na detecção de camadas de filmes finos de proteínas.

Em particular, este trabalho investigou a adsorção da proteína globular GlnB-Hs sobre substrato de silício (100) e (111), hidrofóbico e hidrofílico, depositada em duas situações: em substrato imóvel, com o intuito de observar os auto-arranjos formados, e com substrato girante, com o objetivo de formar uma camada uniforme, homogênea e ordenada.

O conjunto de resultados das diversas técnicas aplicadas para a compreensão da adsorção desta proteína GlnB-Hs em silício (111) hidrofílico mostram a formação de agregados circulares, lineares e outros arranjos complexos de proteínas com forma de anel. Estes anéis parecem ser o motivo básico dos agregados circulares que variam entre 85 nm a 180 nm de largura e com alturas até 3 nm em substrato. Os motivos circulares, anéis estão presentes tanto na deposição por “spin-coating” como na deposição com o substrato estacionário. Neste substrato, ela se deposita preferencialmente com suas partes mais hidrofílicas, superfície inferior ou superior, aparentemente por mecanismo que inclui o efeito de interações não-específicas e por desprotonação de resíduos (como demonstram os espectros do N 1s do XPS). Quando se comparam os espectros de infravermelho da deposição em função da orientação cristalina, para substratos hidrofílicos de silício, observa-se que nos dois substratos existem mudanças de bandas de absorção, tanto no perfil, como no número de onda, mas em geral, seguem a mesma tendência, indicando mudanças estruturais, mas que não seriam mudanças levando a desnaturação completa, pois a banda da amida I está ainda presente. A ausência desta banda é um indicativo de mudanças na estrutura secundária levando à desnaturação total. Porém, a proteína no substrato de Si (100) não apresenta o pico de absorvância relacionado com a estrutura α -hélice. No entanto, ambos apresentam o pico característico de estrutura folha β .

A proteína GlnB-Hs, quando depositada em substrato hidrofóbico por “spin-coating”, tem uma grande tendência a formar fios de comprimento da ordem do micrômetro. Observou-se que estes fios não estão relacionados com a estrutura primária, ou seja, não ocorreu a desnaturação total. Por AFM verificou-se que estes fios possuem um diâmetro maior (56 nm) do que os fios relacionados com a estrutura primária (30 nm). Além do mais, vê-se que são unidades independentes que estão se agregando e não um fio contínuo, como foi verificado no caso da proteína desnaturada. O espectro infravermelho no caso hidrofóbico para ambas as orientações cristalinas mostra que a banda correspondente da amida I, característica da estrutura secundária, está presente para ambos os casos e estes espectros não são característicos de desnaturação total. Por outro lado, quando se comparam os espectros de infravermelho em função da orientação cristalina para substratos hidrofóbicos, verifica-se que eles são bastante distintos, indicando que a exposição da superfície do Si, com a remoção do óxido, provoca interações diferenciadas com Si (111) e com Si (100) como esperado.

A teoria DLVO demonstra que o processo de ordenamento por “spin-coating” com o objetivo de formação de uma camada ordenada de filme fino protéico é favorecido aumentando o tempo de persistência do filme secundário durante a fase de evaporação. Este processo pode ser otimizado através do ajuste dos parâmetros previstos na teoria.

Demonstrou-se por XPS e AFM que a velocidade ideal de rotação do substrato de silício (111) hidrofílico é de 1000 rpm para se obter o melhor recobrimento e regularidade possível nas condições de deposição efetuadas. Além do mais, verificou-se por XPS, que a proteína GlnB-Hs deposita-se preferencialmente e mais regularmente em substratos hidrofílicos (111), haja vista a baixa porcentagem de cobertura (49% para o caso do Si(111) hidrofóbico) quando se comparam os substratos hidrofílico e hidrofóbico a uma mesma velocidade (2500 rpm). Notou-se que existe um deslocamento de 0,3 eV em energia para o pico Si2p- SiO₂ proveniente de substratos cobertos com proteína em relação ao pico Si2p-

SiO₂ do silício de referência em direção a energias de ligações menores. Isto significaria que os fotoelétrons Si2p-SiO₂ estão menos ligados, sugerindo uma reação química da proteína GlnB-Hs com SiO₂.

O ordenamento dos filmes finos formados por “spin-coating” aponta para domínios ordenados no Si (100) e Si (111), na direção vertical, de algumas centenas de ângstrons que parecem ser bastante estáveis sob o feixe de Raios-X.

Parâmetros de rede extraídos dos perfis experimentais sugerem um arranjo onde a proteína seria adsorvida preferencialmente com a face para cima, confirmando os resultados de XPS e AFM.

Algumas sugestões para trabalhos futuros

- Realizar experimentos de Infravermelho em célula líquida e em vácuo com um cristal de silício em ambas as orientações para investigar o grau de mudanças estruturais acarretadas quando a proteína é depositada fora do seu meio fisiológico.
- Investigar a adsorção em função do pH em infravermelho tanto em célula líquida como em vácuo para determinação das mudanças estruturais com a mudança de pH. Este trabalho teria o objetivo de otimizar o depósito da proteína por “spin-coating” através do aumento do tempo de vida útil do “filme secundário”.
- Estudar a variação estrutural do filme de proteína GlnB-Hs depositado por “spin-coating” em função da temperatura por infravermelho, AFM e XPS.
- Investigar em geometria GID os perfis de difração do ordenamento do filme fino formado por “spin-coating” em função da temperatura.
- Utilizar a deposição da proteína por “spin-coating” como centro de nucleação para crescimento de um cristal de proteína através do método da gota pendurada. Correlacionar com a cristalização da mesma proteína por meios clássicos.

- Investigação dos efeitos da radiação nos “nano” domínios ordenados de proteína utilizando a investigação por AFM antes e após a exposição.
- Testar a atividade da proteína GlnB depositada no substrato através da utilização de uma outra proteína pertencente a cadeia de transdução de nitrogênio com a qual ela tem bioafinidade.

Referências

- Acrivos, A.; Shah, M. J.; Petersen, E. E. On the flow of a Non-Newtonian Liquid on a Rotating Disk, *J. of Appl. Phy.*, v.31, p.963-968, 1960.
- Adachi, E. Formation of holoferritin hexagonal arrays in secondary films due to Alder-type Transition, *Langmuir*, v.12, p.1836-1839, 1996.
- Adachi, E.; Nagayama, K. Assembly process of 2D protein arrays in wetting films, *Adv. Biophys.*, v.34, p.81-92, 1997.
- Adamczyk, Z.; Zembala, M.; Siwek, B.; Warszynski, P. Structure and ordering in localized adsorption of particles *J. Colloid Interface Sci.*, v.140, p.123-137, 1990.
- Alder, B.J.; Hoover, W.G.; Young, D.A. Studies in molecular dynamics. V. High-density equation of state and entropy for hard disk and spheres, *J. Chem. Phys.*, v.49, p.3688-3696, 1968.
- Als-Nielsen, J.; Jacquemain, D.; Kjaer, K.; Leveiller, F.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. Principles and Applications of grazing incidence x-ray and neutron scattering from ordered molecular monolayers at the air-water interface, *Physics reports*, v.246, p.251-313, 1994.
- Andrade, J.D. Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers, Plenum Press, New York, 1985.
- Ashley, J.C. Inelastic Interactions of Low-energy electrons with organic solids: Simple Formulae, *IEEE Trans. on Nucl. Scien.*, v.27, p.1454-1458, 1980
- Baldani, J.I.; Baldani, V.L.D.; Seldin, L.; Dobereiner, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.36, p. 86-93, 1986.
- Baldani, V.L.D.; Baldani, J.I.; Olivares, F.; Dobereiner, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, v.13, p.65-73, 1992.

- Benelli, E.M.; Souza, E.M.; Funayama, S.; Rigo, L.U.; Pedrosa, F.O. Evidence for two possible glnB-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*, *J. Bacteriol.* v.179, p.4623-4626, 1997.
- Benelli, E.; Buck, M.; deSouza, E.M.; Yates, M.G.; Pedrosa, F.O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*, *Can. J. Microbiol.*, v.47, p.309-314, 2001.
- Benelli, E.; Buck, M.; Polikarpov, I.; deSouza, E.M.; Cruz, L.M.; Pedrosa, F.O. *Herbaspirillum seropedicae* protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. *Eur. J. Biochem.*, v.269, p.3296-3303, 2002.
- Berger, M.J.; Coursey, J.S.; Zucker, M.A. Estar Pstar and Astar: computer programs for calculating stopping power and range tables for electrons, protons and Helium ions. V 1.2.2., NIST, Gaithersburg, MD, USA, 2000.
- Binnig, G.; Quate, C.F.; Gerber, C.H. Atomic Force Microscope, *Phys. Rev. Lett.*, v.56, p.930-933, 1986.
- Birnie III, D.P.; Mnaley, M. Combined Flow and Evaporation of fluid on a Spinning Disk, *Phys. Fluids.*, v.9, p.870-875, 1996.
- Boutet, S.; Robinson, I. K.; Hu, Z. W; Thomas, B. R.; Chernov, A.A. Surface relaxation in protein crystals, *Phys. Rev. E*, v.66, p.1-7, 2002.
- Branden, C.; Tooze, J. Introduction to Protein Structure, Garland, 1998.
- Byler D.M.; Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR Spectra, *Biopolymers*, v.25, p.469-487, 1986.
- Buijs, J.; Norde, W.; Changes in the secondary structure of adsorbed IgG and F(ab')₂ studied by FTIR Spectroscopy, *Langmuir*, v.12, p.1605-1613, 1996.
- Carey, P.R. Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies, Academic Press, 1982.
- Chittur, K.K. FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial Surfaces, *Biomaterials*, v.19,

p.357-369, 1998.

Coen, M.C.; Lehmann, R.; Gröning, P.; Biemann, M.; Galli, C.; Schlapbach, L. Adsorption and bioactivity of protein A on silicon surfaces studied by AFM and XPS. *J. of Col. and Inter. Science*, v.233, p.180-189, 2001.

Creighton, T.E. Protein structure. A practical Approach, IRL press (Oxford university press), 1997.

DeCupere, V.M.; Gohy, J.-F.; Jérôme, R.; Rouxhet, P.G. Influence of substrate hydrophobicity on the adsorption of a amphiphilic diblock copolymer, *J. of Coll. and Inter. Sci.*, v.271, p.60-68, 2004.

Denkov, N.D.; Velev, O.D.; Kralchevsky, P.A.; Ivanov, I.B.; Yoshimura, H.; Nagayama, K. Mechanism of formation of two-dimensional crystals from Latex particles on substrates, *Langmuir*, v.8, p.3183- 3190, 1992.

DeSouza, C. P.; Andrade, M. S.; Neves, B.R.A. Implementation of Recycling Routes for Scanning Probe microscopy Tips, *Microsc. Microana.*, v.8, p.509-517, 2002.

DeSouza, E.M.; Pedrosa, F. O.; Drummond, M.H.; Rigo, L.U.; Yates, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen, *J. Bacteriol.* v.181, p.681-684, 1999.

Dufrêne, Y.F.; Marchal, T.G.; Rouxhet, P.G. Probing the organisation of adsorbed protein layers: Complementarity of atomic force microscope, X-ray photoelectron spectroscopy and radiolabeling, *Appl. Surf. Sci.*, v.638, p.144-145, 1999.

Dufrêne, Y.; Rouxhet, P. G. X-Ray photoelectron spectroscopy analysis of the surface composition of *Azospirillum brasilense* in relation to growth conditions, *Col. and Surf. B: Biointerfaces*, v.7, p.271-279, 1996.

Fenter, P.; Eisenberger, P.; Li, J.; Camillone, N.; Bernasek, S.; Scoles, G.; Ramanarayanan, T.A.; Liang, K.S. Structure of $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SH}$ self-assembled on Ag (111) surface : An incommensurate monolayer. *Langmuir*, v.7, p.2013-2016, 1991.

Fontana, J.D.; Souza, A.M.; Fontana, C.K.; Torriani, I.L.; Moreschi, J.C.; Gallotti, B.J.; Souza, S.J.; Narciso, G.P.; Farah, L.F.X. Acetobacter cellulose pellicule as a temporary skin substitute, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24, v.25, p.253-264, 1990.

Giegé, R.; Drenth J.; Ducruix A.; McPherson A.; Saenger W. Crystallogensis of biological macromolecules. Biological, microgravity and other physico-chemical aspects, *Prog. Cryst. Growth and charact. of Mat.*, v.30, p.237-281, 1995.

Giles, C., Yokaichiya, F., Kycia, S.W., Sampaio, L.C., Ardiles-Saraiva, D.C., Franco, M.K.K., Neuenschwander, R.T., High-resolution X-ray diffraction beamline at the LNLS for the study of charge, orbital and magnetic structures, *J. Synch. Rad.*, v.10, p.430-434, 2003.

Gray, J. The interaction of proteins with solid surfaces, *Curr. Opi. in Struct. Biology*, v.14, p.110-115, 2004.

Green, R.J.; Hopkinson, I.; Jones, R.A. Unfolding and Intermolecular Association in Globular Proteins Adsorbed at interfaces, *Langmuir*, v.15, p.5102-51610, 1999.

Guinier, A., X-Ray Diffraction, Freeman, 1963.

Haggerty, L.; Lenhoff, A.M., Analysis of ordered arrays of adsorbed lysozyme by scanning tunneling microscopy, *Biophys. J.*, v.64, p.886-895, 1993.

Higashi, G.S.; Chabal, Y. J.; Trucks, G.W.; Raghavachari, K. Ideal hydrogen termination of the Si (111) surface, *Appl. Phys. Lett.*, v.56, p.656-658, 1990.

Hirose, M.; Yasaka, T.; Takakura, M.; Miyazaki, S. Initial oxidation of chemically cleaned silicon surfaces, *Solid State Technology*, p.43-48, 1991.

Hlady, V.; Buijs, J. Protein adsorption on solid surfaces, *Curr. Opinion in Biotechnology*, v.7, p.72-77, 1996.

Hovington, P.; Drouin, P.; Gauvin, D.R. , CASINO: A New Monte Carlo Code in C Language for Electron Beam Interaction — Part I: Description of the Program Scanning, v.19, p.1-14, 1997.

Israelachvili, J. N. Intermolecular & Surface Forces, Academic Press, 1992.

Jap, B. K.; Zulauf, M. ; Scheybani, T. ; Hefti, A. ; Baumeister, W. ; Aebi, U.; Engel, A. 2D Crystallization: from art to science. *Ultramicroscopy*, v.46, p.45-84, 1992.

Jensen, T.R.; Balashev, K.; Bjornholm, T.; Kjaer, K. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part II. Surface sensitive synchrotron X-Ray scattering. *Biochimie*, v.83, p.399-408, 2001.

Jeon, J.S.; Raghavan, S.; Sperline, R.P. Quantitative analysis of albumin adsorption onto uncoated and poly(ether)urethane-coated ZnSe surfaces using attenuated total reflection FTIR technique, *Colloids and Surfaces A*, v.92, p.255-265, 1994.

Johnson, C.A., Lenhoff, A.M. Adsorption of Charged Latex Particles on Mica Studied by Atomic Force Microscopy, *J. Colloid Interface Sci.*, v.179, p.587-599, 1996.

Kim, H.; Garavito, M.; Lal, R. Atomic Force microscopy of three-dimensional crystal of membrane, OmpC porin, *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, v.19, p.347-355, 2000.

Kittel, C. Physique de l'état solide, Dunod, Paris, 1983.

Kjaer, K. Some simple ideas on X-Ray reflection and grazing-incidence diffraction from thin surfactant films , *Physica B*, v.198, p.100-109, 1994.

Koltover, I.; Salditt, T.; Rigaud, J.-L.; Safinya, C.R. Stacked 2D crystalline sheets of the Membran- Protein Bacteriorhodopsin : A specular and Diffuse Reflectivity study, *Phys. Rev. E*, v.81, p.2494-2497, 1998.

Kralchevsky, P.A.; Denkov, N.D. Capillary Forces and Structuring in Layers of Colloid Particles, *Curr. Opi. in Colloid & Interf. Science*, v.6, p.383-401, 2001.

- Larsericdotter, H., *Macromolecules at Interfaces*, Dissertation, Faculty of science and technology, Uppsala, 2004.
- Lawrence, C.J.; Zhou, W. Spin coating of non-Newtonian fluids, *J. of Non-New, Flu. Mech.*, v.39, p.137-187, 1991.
- Lawrence, C.J. The mechanics of spin coating of polymer films, *Phys. Fluids*, v. 31, p.2786-2795, 1988.
- Lebugle, A.; Subirade, M.; Gueguen, J. Structural characteristics of a globular protein investigated by X-Ray photoelectron spectroscopy: comparison between a legumin film and a powdered legumin, *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1248, p.107-114, 1995.
- Lehninger, A.; Nelson, D.; Cox, M. *Principles of Biochemistry*, Worth, 1993.
- Leveiller, F.; Boehm, C.; Jacquemain, D.; Moehwald, H.; Leiserowitz, L.; Kjaer, K.; Als-Nielsen, J. Two-Dimensional Crystal Structure of Cadmium Arachidate studied by synchrotron X-ray diffraction and Reflectivity, *Langmuir*, v.10, p.819-829, 1994.
- Li, H.; Perozzo, M.; Konnert, J.; Nadarajah, A.; Pusey, M. Determining the molecular-packing arrangements on protein crystal faces by atomic force microscopy, *Acta crystallographica D*, v.55, p.1023-1035, 1999.
- Lillehei, P. T.; Bottomley, L. A. Scanning Probe Microscopy, *Anal. Chem.*, v.72, p.189-196, 2000.
- Losche, M. Protein Monolayers at interfaces, *Curr. opi. in solid state and mat. sci.*, v.2, p.546-556, 1997.
- Lowe, C. Nanobiotechnology: the fabrication and application of chemical and biological nanostructures, *Current. Opin. in struct. Biol.*, v.10, p.428-434, 2000.
- Lubambo, A.F.; Ferreira, C.F.G.; Passos, M., Fontana, J.D., Camargo, P.C. Fast Atomic force microscopy cleaning probe tip and image quality control protocol, *Scanning*, v.27, p.98-99, 2005.

Malmsten, M. Formation of Adsorbed Protein Layers, *J. of Col. and Inter. Science*, v.207, p.186-199, 1998.

Marsh, R.; Jones, R.A.L.; Sferrazza, M. Adsorption and displacement of a globular protein on hydrophilic and hydrophobic surfaces, *Col. and Surf. B*, v.23, p.31-42, 2002.

McPherson, A.; Malkin, A.J.; Kuznetsov, Y. G. The science of macromolecular crystallization, *Structure*, v.3, p.759-768, 1995.

Mcpherson, A.; Shlichta, P. Heterogeneous and epitaxial nucleation of protein crystals on mineral surfaces, *Science*, v.239, p.385-387, 1988.

Mennicke, U.; Salditt, T. Preparation of solid-supported lipid bilayers by spin-coating. *Langmuir*, v.18, p. 8172-8177, 2002.

Merrick, M.J.; Edwards, R.A. Nitrogen control in bacteria, *Microbiol. Rev.*, v.59, p.604-622, 1995.

Mirzabelov, A.; Kolchinsky, A. Emerging array-based technologies in proteomics, *Curr. Opinion in chemical biology*, v.6, p.70-75, 2001.

Murray, J. W.; Garman, E.F.; Ravelli, R.B.G. X-Ray absorption by macromolecular crystals: the effects of wavelength and crystal composition on adsorbed dose, *J. Appl. Cryst.*, v.37, p.513-522, 2004.

Nagayama, K. Protein Array Engineering, *Supramolecular Science*, v.3, p.111-122, 1996.

Nagayama, K. Two-dimensional self-assembly of colloids in thin liquid films, *Colloids and Surfaces*, v.109, p.363-374, 1996.

Nakanishi, K.; Sakiyama, T.; Imamura, K. On the Adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon, *J. of Bioscience and Bioengineering*, v.91, p.233-244, 2001.

Nave, C.; Hill, M.A. Will reduced radiation damage occur with very small crystals? *J. Sync. Rad.*, v.12, p.261-267, 2005.

- Nefedov, V. X-ray photoelectron spectroscopy of Solid Surfaces, VsP BV, Netherlands, 1988.
- Nie, H.; McIntyre, N.S-Y. A Simple and Effective method of evaluating atomic force microscopy tip performance, *Langmuir*, v.17, p.432-436, 2001.
- Neill, N.B.; Bouzas, B.H. Objective Image Quality Measure Derived from Digital Image Power Spectra, *Opt. Eng.*, v.31, p.813-825, 1992.
- Ninfa, A. J.; Magasinick, B. Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in Escherichia coli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.83, p.5909-5913, 1986.
- Ninfa, A.; Atkinson, J.M.R. PII signal transduction proteins, *Trends in Microbiol.* v.8, p.172-179, 2000.
- Norde, W., Adsorption of proteins from solution to solid-liquid interface, *Adv. Colloid Interface Sci.*, v.25, p.267-340, 1986.
- Okorn-Schmidt, H. F. Characterization of silicon surface preparation processes for advanced gate dielectrics, *Ultrathin dielectrics films*, v.34, p.351-365, 1999.
- Padilla, J. E.; Colovos, C.; Yeates, T. O. Nanohedra: Using symmetry to design self assembling protein cages, layers, crystals and filaments, *PNAS*, v.98, p.2217-2221, 2001.
- Pechkova, E.; Nicolini, C. Protein Nanocrystallographie : A new approach to structural proteomics, *Trends in Bio.*, v.22, p.117-122, 2004.
- Pechkova, E.; Fiordoro, S.; Fontani, D.; Nicolini, C. Investigating crystal-growth mechanisms with and without LB template: protein transfer from LB to crystal , *Acta cryst. D*, v.61, p.809-812, 2005.
- Pechkova, E.; Sivozhelezov, V.; Tropiano, G.; Fiordoro, S.; Nicolini, C. Comparaison of lysozyme strucutres derived from thin-film-based and classical crystals , *Acta cryst. D*, v.61, p.803-808, 2005.

- Pechkova, E.; Nicolini, C. Accelerated protein crystal growth by protein thin film template, *J. of crystal growth*, v.231, p.599-602, 2001.
- Pimentel, J.P.; Olivares, F.; Pitard, R.M.; Urquiaga, S.; Akiba, F.; Dobereiner, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*, *Plant Soil*, v.137, p.61-65, 1991.
- Pompa, P.P.; Blasi, L.; Longo, L.; Cingolani, R.; Ciccarella, G.; Vasapollo, G.; Rinaldi, R.; Rizzello, A.; Storelli, C.; Maffia, M. Optical characterization of glutamate dehydrogenase monolayers chemisorbed on SiO₂, *Physical Review E*, v.67, p.1-8, 2003.
- Postgate, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation, Cambridge, Cambridge University Press, 1982.
- Rapaport, H.; Möller, G.;Knobler, C. M; Jensen, T. R.; Kjaer, K.; Leiserowitz, L.;Tirrell, D.A. Assembly of Triple-stranded β -Sheet peptides at interfaces, *J.A.C.S.*, v. 124, p.9342-9343, 2002.
- Ravelli,R., McSweeney, S.M. The “Fingerprint” that x-rays can leave on structures, *Structure*, v.8, p.315-328, 2000.
- Rice P.; Longden, I.; Bleashy, A. EMBOSS(The european molecular biology open software source), *Trends in Genetics*, v.16, p.276-277, 2000.
- Rinaldi, R.; Cingolani, R. Eletronic nanodevices based on self-assembled metalloproteins, *Physica E*, v.21, p.45-60, 2004.
- Salditt, T.; Münster, C.; Lu, J.; Vogel, M.; Fenzl, W.; Souvorov, A. Specular and diffuse scattering of highly aligned phospholipid membranes, *Phys. Rev. E*, v.60, p.7285-7289, 1999.
- Samant, M. G.; Brown, C. A.; Gordon II, J.G. Structure of an ordered self-assembled monolayer of Docosyl Mercaptan on Au(111) by surface X-ray diffraction, *Langmuir*, v.7,p.437-439, 1991.

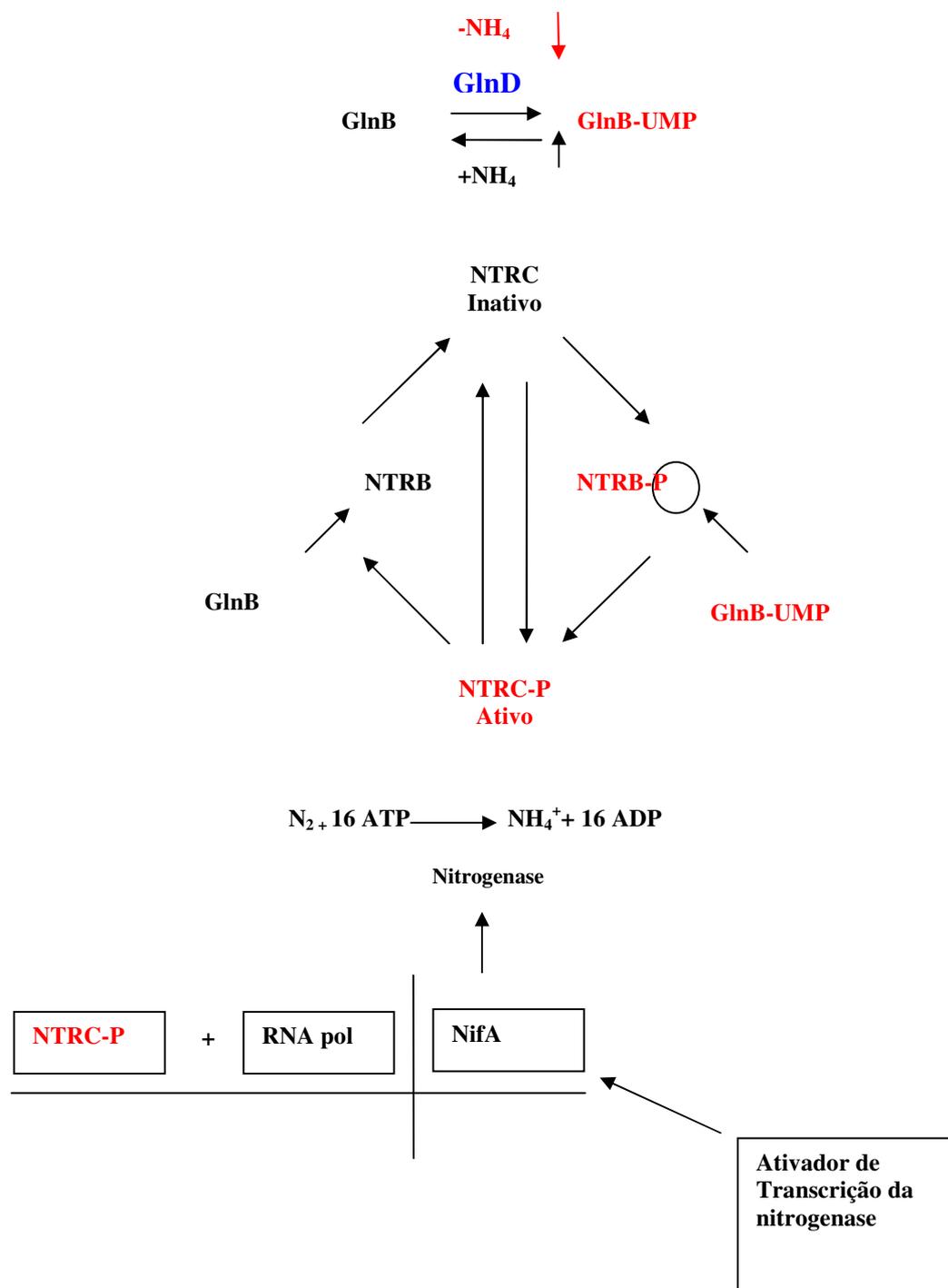
- Santos, N.; Castanho, M.A.R.B. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy, *Biophysical chemistry*, v.107, p.133-149, 2004.
- Sayle, R. RasMol, V2.6, Molecular Graphics visualisation tool, 1992.
- Schaaf, P.; Talbot, J. Surface exclusion effects in adsorption processes, *J. chem. Phys.*, v.91, p.4401-4409, 1989.
- Scheibel, T.; Parthasarathy, R.; Sawicki, G.; Lin, X.-M.; Jaeger, H.; Lindquist, S.L. Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition, *PNAS*, v.100, p.4527-4532, 2003.
- Scofield, J.H. Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV, *J. of Electron Spec. and Rel. Phen*, v.8, p.129-137, 1976.
- Seul, M.; Eisenberger, P.; McCONNELL, H. M. X- ray diffraction by phospholipid monolayers on single-crystal silicon substrates, *PNAS* , v.80, p.5795-5797, 1983.
- Sleytr, U.; Gyrovary, E.; Pum, D. Crystallisation of S-Layer protein lattices on surfaces and interfaces, *Progr. in Org. Coating*, v.47, p.279-287, 2003.
- Takano, K.; Hachisu, S. Pressure of Kirkwood-Alder Transition in monodisperse latex, *J. chem. Phys.*, v.67, p.2604-2608, 1977.
- Tanuma, S.; Powell, C.J.; Penn, D.R. Calculations of electronic inelastic mean free paths, *Surf. And Interf. Anal.*, v.2, p.1165-176, 1993.
- Verclas, S.A.W.; Howes, P.B.; Kjaer, K.; Wurlitzer, A.; Weygand, M.; Buldt, G.; Dencher N.A.; Losche, M. X-ray Diffraction from a single layer of purple membrane at the air/water interface. *J.M.B.*, v.287, p.837-843, 1999.
- Weber, O.B.; Baldani, V.L.D.; Teixeira, K.R.S.; Kirchhof, G.; Baldani, I.; Doberreiner J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in banana and pineapple plants. *Plant Soil*, v.210, p.103-113., 1999.

Yeates, T. O.; Padilla, J. E. Designing supramolecular protein assemblies, *Cur. Opi. in Struc. Bio.*, v.12, p.464-470, 2002.

Zenhausern, F.; Adrian, M.; TenheggerBordier, B.; Eng, L.M.; Descouts, P. DNA and RNA-polymerase DNA complex imaged by scanning force microscopy-influence of molecular scale. *Scanning*, v.14, p.212-217, 1992.

A1. Apêndice do capítulo 1

A1. Diagrama esquemático da cascata de detecção e controle de nitrogênio na bactéria *Herbaspirillum seropedicae*.



A2. Apêndice do capítulo 2

Programa para a simulação do potencial de interação (DLVO)

```

ClearAll[G, eo, er, n, z, e, kbt, ai, ad, t, si, sd, r, P, W, h, K];
eo=8.85*10^-12;"constante dieletrica do vacuo(Fm-1)";
er=80;"constante dieletrica relativa da agua";
n=(6*10^26); "densidade de numero de ions longe da interface(xI)";
z=1; "carga do ion";
n1=n*0.5;
e=1.6*10^-19; "carga eletrica elementar";
kbt=4.1*10^-21; "constante de Boltzman vezes temperaura(J)";
ai=1; "Constante de Hamaker na interface(J) do silicio";
ad=1; "Constante de Hamaker na interface(J) ar/agua";
si=-0.16;"densidade de carga por unidade de area na interface 1 (C/m2)";
sd=-0.16; "densidade de carga na interface 2 (C/m2)";
r=5; "diametro da proteina(nm)";
h=100;"espessura do filme";
q=-30.11;"carga liquida da proteina";
K=(1*10^-9)*Sqrt[(2*n1*z^2*e^2)/(eo*er*kbt)];
P[x_]=q*(((si*Exp[K*h]-sd)*Exp[-K*x]+(si*Exp[-K*h]-sd)*Exp[K*x]))/(eo*er*K*10^9*(Exp[K*h]-Exp[-K*h]));
W[x_]=(-r/6)*(((ai)/x)+((ad)/(h-x)));
Z[x_]=q*(((si*Exp[K*h]-sd)*Exp[-K*x]+(si*Exp[-K*h]-sd)*Exp[K*x]))/(eo*er*K*10^9*(Exp[K*h]-Exp[-K*h]))-((r/6)*(((ai)/x)+((ad)/(h-x))));
Plot[Z[x],{x,0.1,30},AxesLabel->{"Distância(nm)", "V(x)"}];
Plot[-Z'[x],{x,0.1,30},AxesLabel->{"Distância(nm)", "F(x)"}];

```

A4. Apêndice do capítulo 4

Silício 111 Padrão:

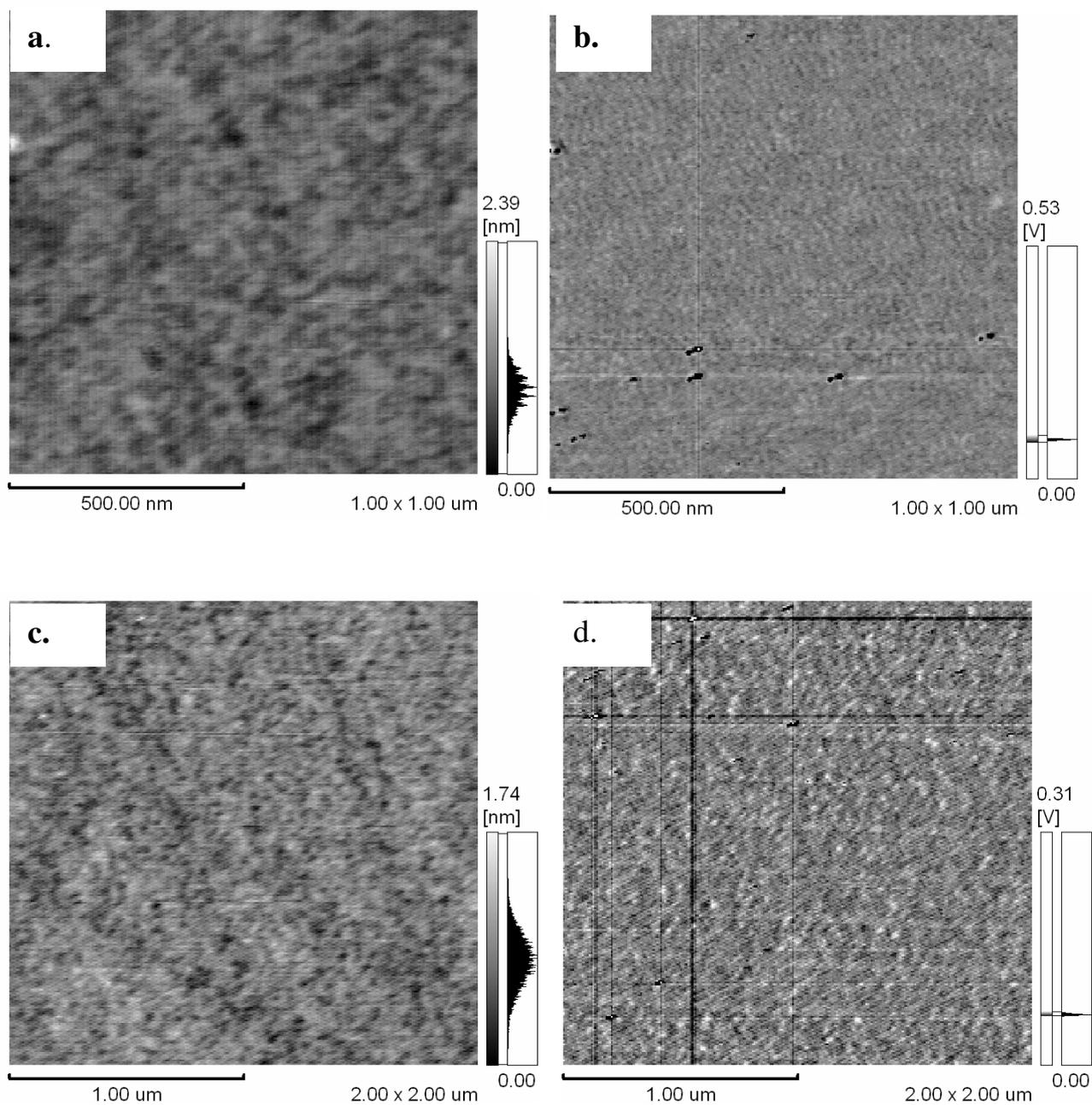


Figura A4.1 : Imagem AFM em modo dinâmico do centro e bordas do silício (111) padrão. **a.** Centro da mostra. **b.** Imagem de fase da imagem a. Dimensões: $1\mu\text{m}^2$. **c.** Borda da amostra. **d.** Imagem de fase da borda da amostra 1. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$.

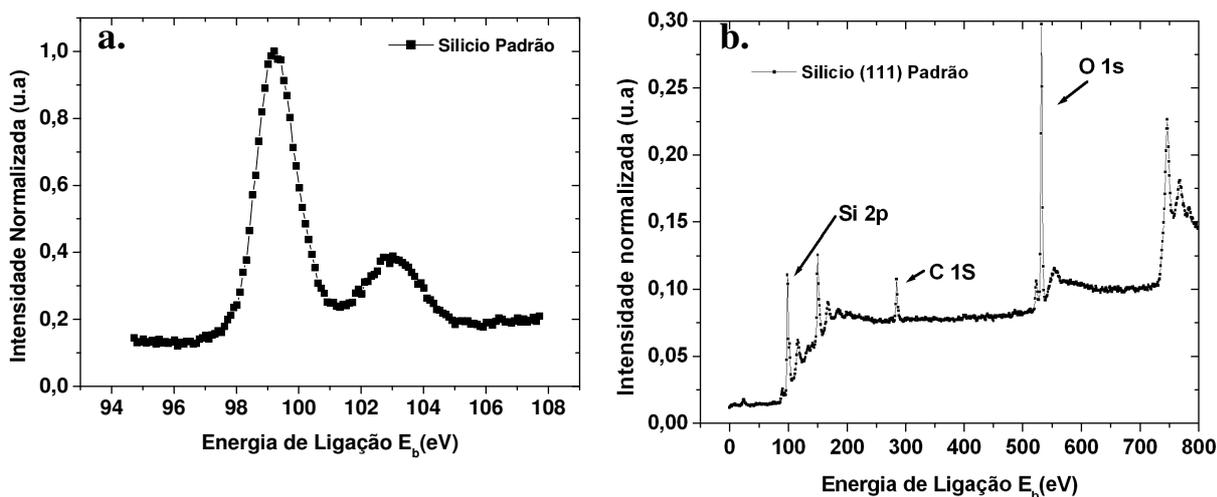


Figura A4.2: **a.** Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes Si2p Si (111) e da camada de óxido Si2p-SiO₂ para o silício (111) padrão. **b.** Panorama do espectro de fotoelétrons do Si (111) padrão.

Tabela A4.1: Resumo dos resultados experimentais (energias de ligação características) extraídos dos espectros da amostra de Silício (111) padrão.

Elemento	Posição E_b (eV)	FWHM (eV)	Área integrada (cps)	Altura (cps)	χ^2
C1s	285,22	2,87	38035,2	10448,3	4,25
O1s	532,86	2,18	43702,2	18013	2,18
Si 2p	99,29	1,50	15824,9	9122	1,84
Si2p-SiO ₂	102,98	2,35	6638,5	2471	1,84

Nota: Os dados das tabelas A4.1- A4.6 foram obtidos utilizando o programa SDP v2.3, utilizando uma gaussiana para modelar os picos de emissão, após a subtração do “background” utilizando uma função Shirley.

Amostra 1

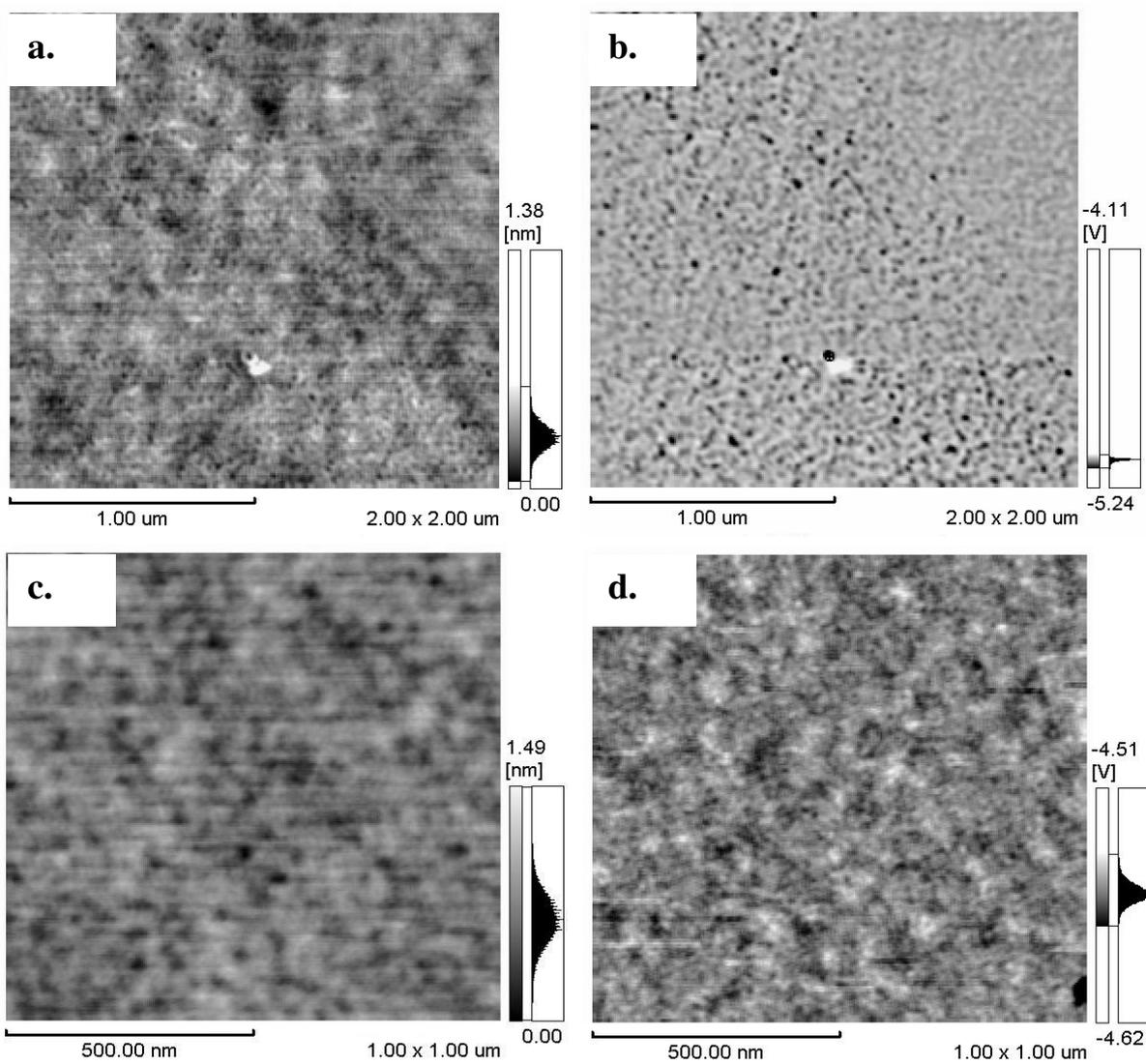


Figura A4.3: 500 rpm. Imagem AFM em modo dinâmico do centro e bordas da amostra 1. **a.** Centro da amostra. **b.** Imagem de fase da imagem a. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$. **c.** Borda da amostra. **d.** Imagem de fase da borda da amostra 1. Dimensões: $1\mu\text{m}^2$.

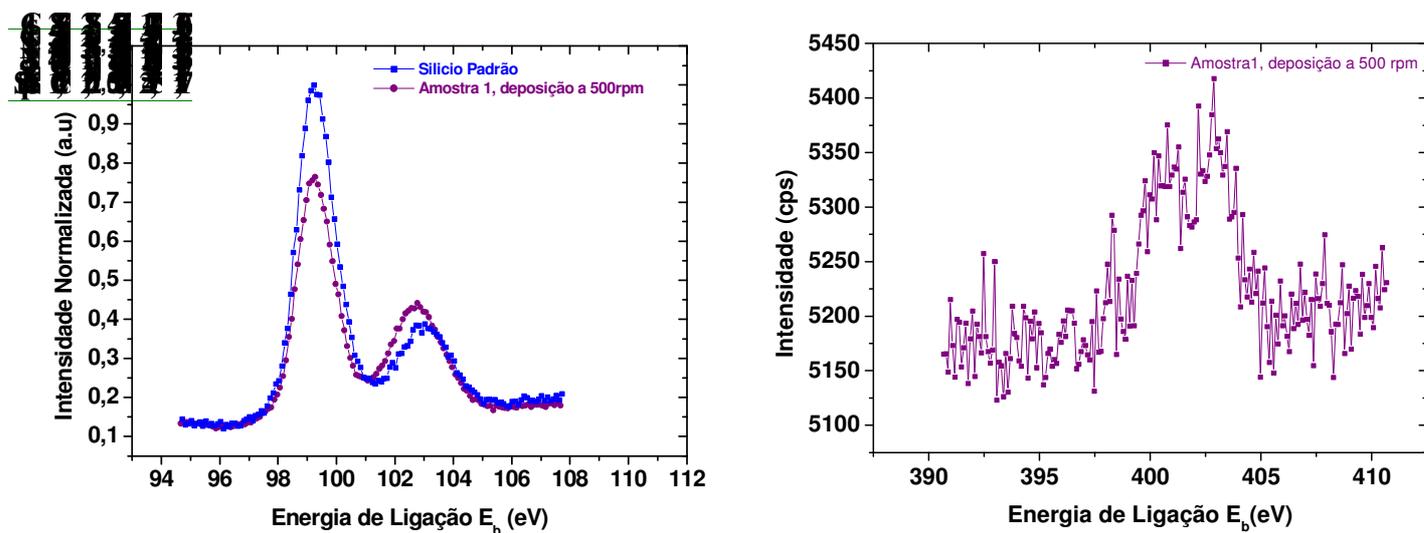


Figura A.4.4: **a.** Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes Si2p Si (111) e da camada de óxido Si 2p-SiO₂ para a amostra 1. **b.** Espectro de fotoelétrons do N 1s para a amostra 1.

Tabela A4.2: Resumo dos resultados experimentais (energias de ligação características) extraídos dos espectros da amostra 1.

Elemento	Posição	FWHM	Área integrada	Altura	χ^2
	E _b (eV)	(eV)	(cps)	(cps)	

Amostra 2

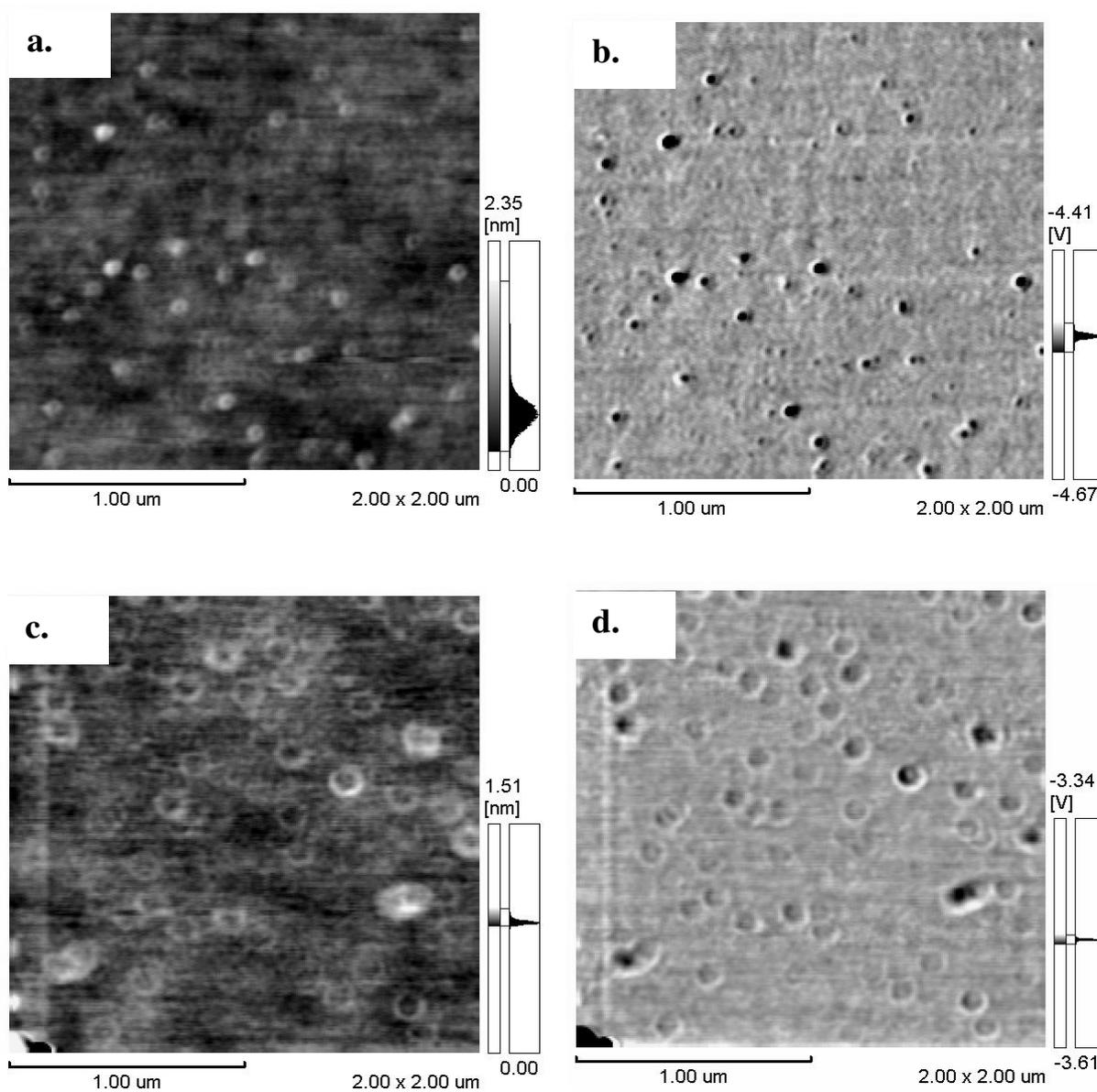


Figura A4.5: 1000 rpm. Imagem AFM em modo dinâmico do centro e bordas da amostra 2. **a.** Centro da mostra. **b.** Imagem de fase da imagem a. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$. **c.** Borda da amostra. **d.** Imagem de fase da borda da amostra 1. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$.

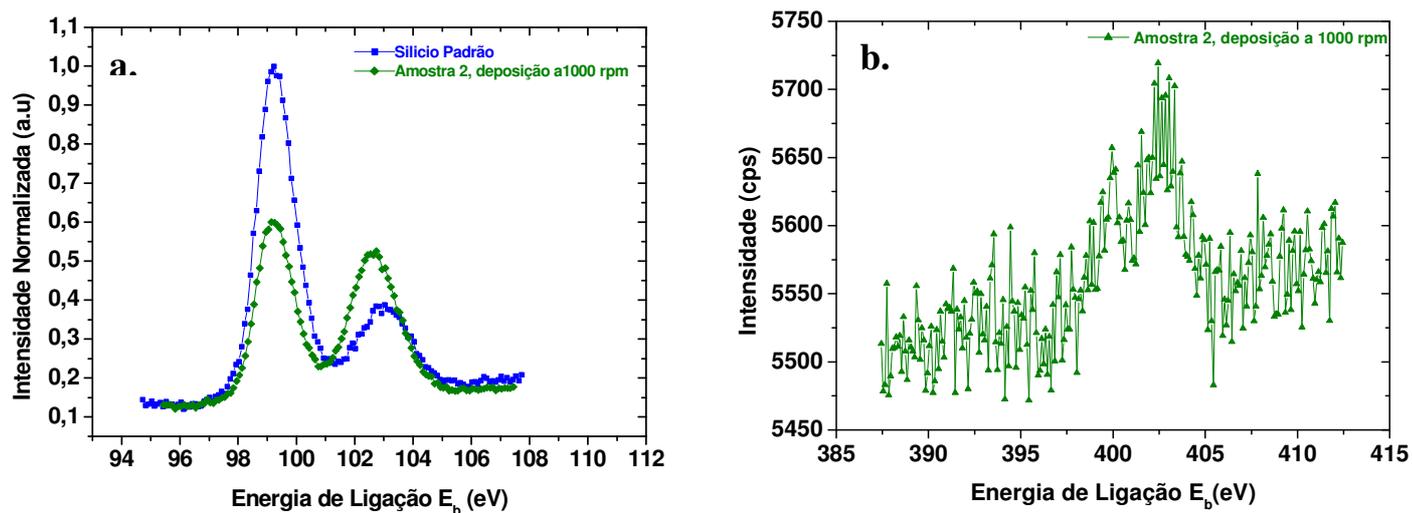


Figura A4.6: **a.** Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes Si2p Si (111) e da camada de óxido Si2p-SiO₂ para a amostra 2. **b.** Espectro de fotoelétrons do N 1s para a amostra 2.

Tabela A4.3: Resumo dos resultados experimentais (energias de ligação características) extraídos dos espectros da amostra 2.

Elemento	Posição E_b (eV)	FWHM (eV)	Área integrada (cps ²)	Altura (cps)	χ^2
C 1s	286,68	2,56	67477,8	21973,4	3,28
O 1s	534,37	2,62	165169	54868,2	4,42
N 1s	402,78	3,05	452,486	139,38	2,95
N1s	399,75	1,70	160,717	84,92	2,95
Si 2p	99,3	1,49	7067,49	4336,1	1,22
Si2p-SiO ₂	102,65	1,91	7191,61	3419,6	1,22

Amostra 3

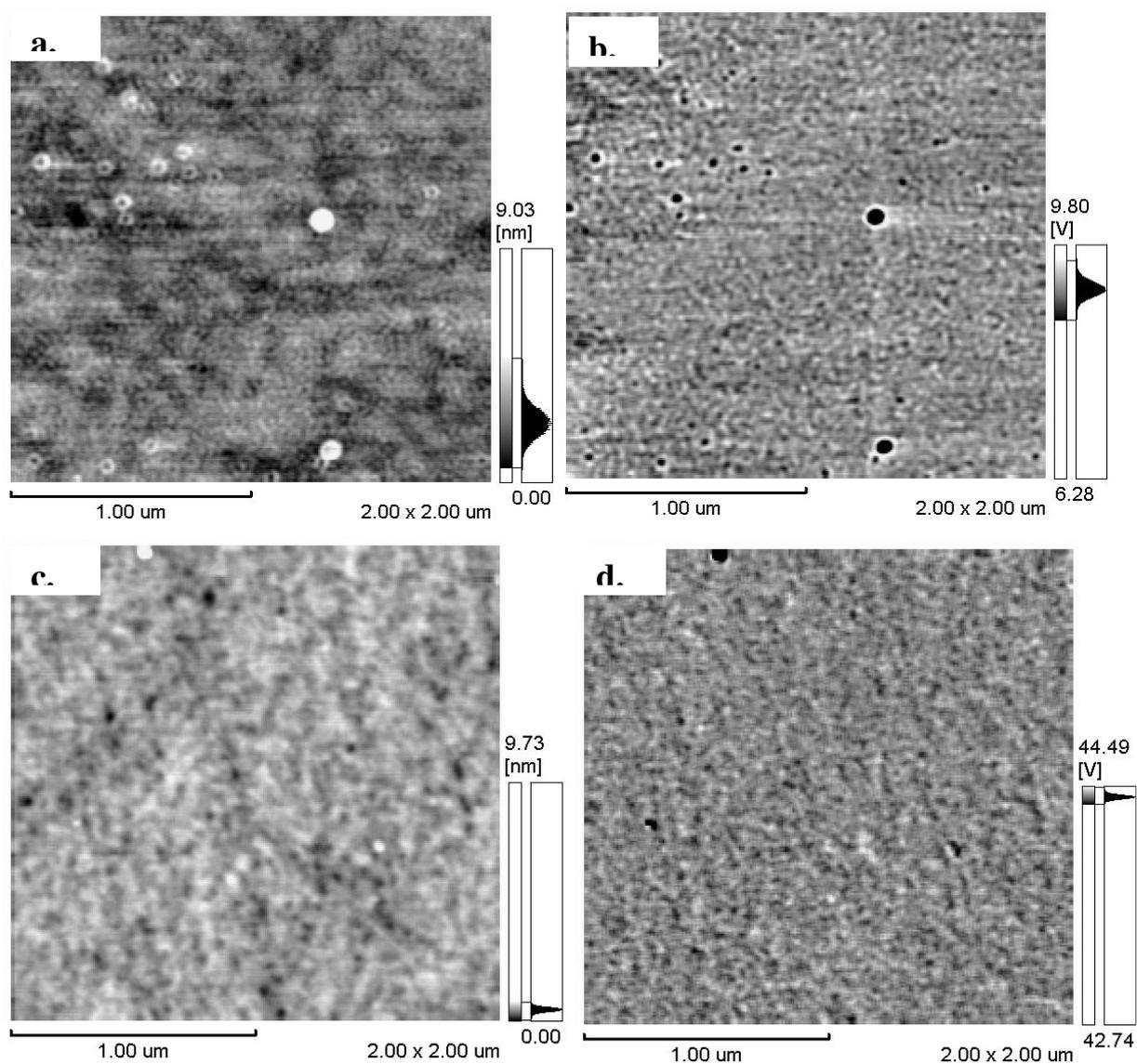


Figura A4.7: 1500 rpm. Imagem AFM em modo dinâmico do centro e bordas da amostra 3. **a.** Centro da mostra. **b.** Imagem de fase. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$. **c.** Borda da amostra. **d.** Imagem de fase da borda da amostra 1. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$.

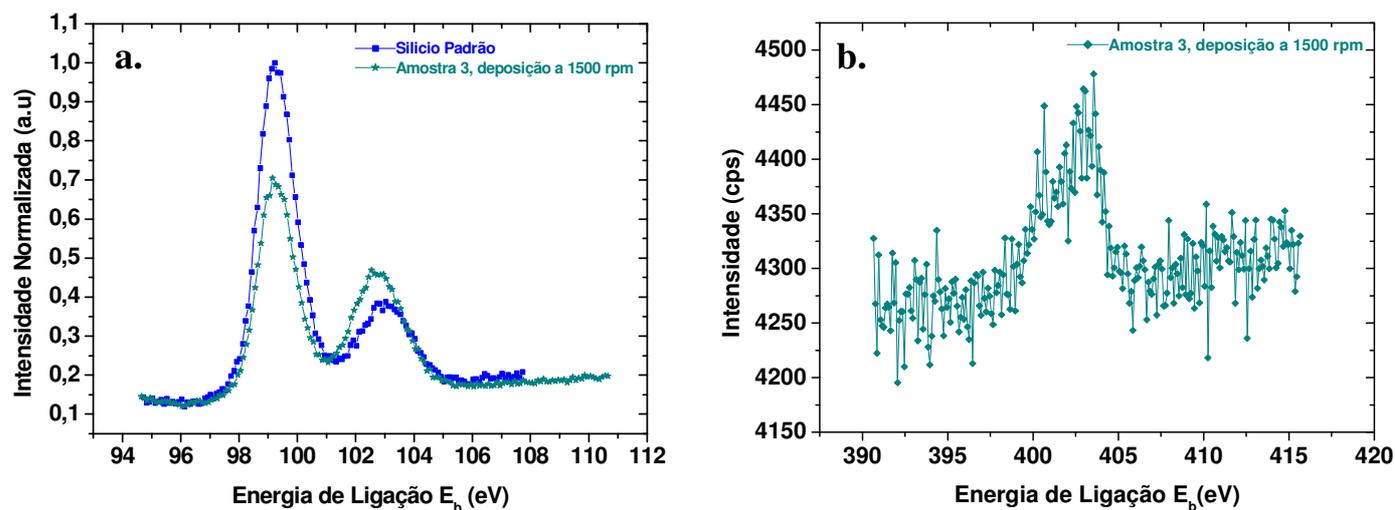


Figura A4.8: 1500 rpm. **a.** Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes Si2p Si (111) e da camada de óxido Si2p- SiO₂ para a amostra 3. **b.** Espectro de fotoelétrons do N 1s para a amostra 3.

Tabela A4.4: Resumo dos resultados experimentais (energias de ligação características) extraídos dos espectros da amostra 3.

Elemento	Posição E _b (eV)	FWHM (eV)	Área Integrada (cps)	Altura (cps)	χ^2
C 1s	286,12	2,86	48761,6	14898	2,77
O 1s	533,97	2,59	128383	41039,9	3,85
N 1s	400,09	3,41	345,33	95,09	3,14
N1s	401,16	2,72	437,61	151,36	3,14
Si 2p	99,3	1,11	5453,35	4371,26	1,43
Si2p- SiO ₂	102,75	1,50	3666,85	2295,91	1,43

Amostra 4

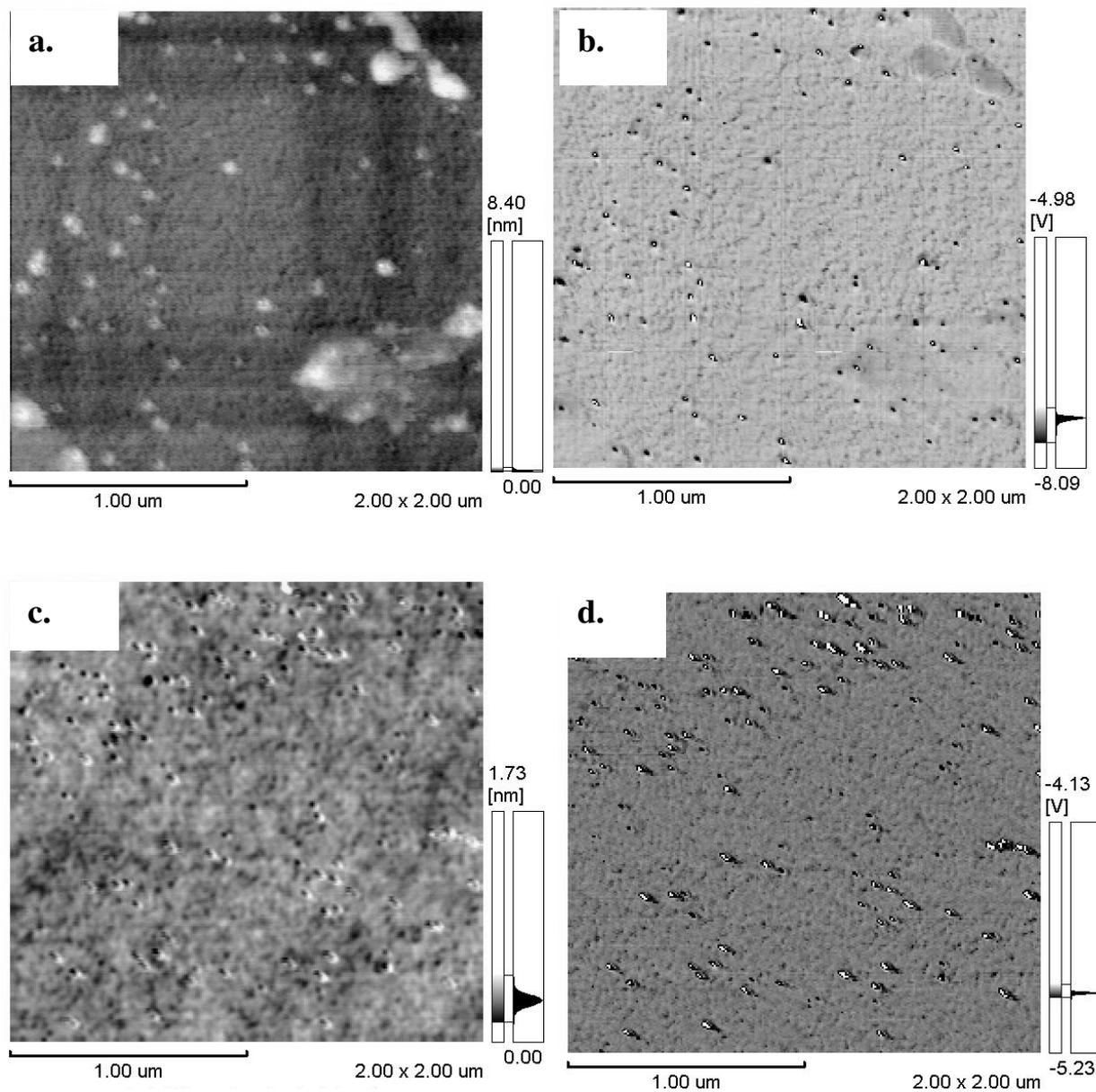


Figura A4.9: 2500 rpm. Imagem AFM em modo dinâmico do centro e bordas da amostra 4. **a.** Centro da mostra. **b.** Imagem de fase da imagem a. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$. **c.** Borda da amostra. **d.** Imagem de fase da borda da amostra 1. Dimensões: $4\mu\text{m}^2$.

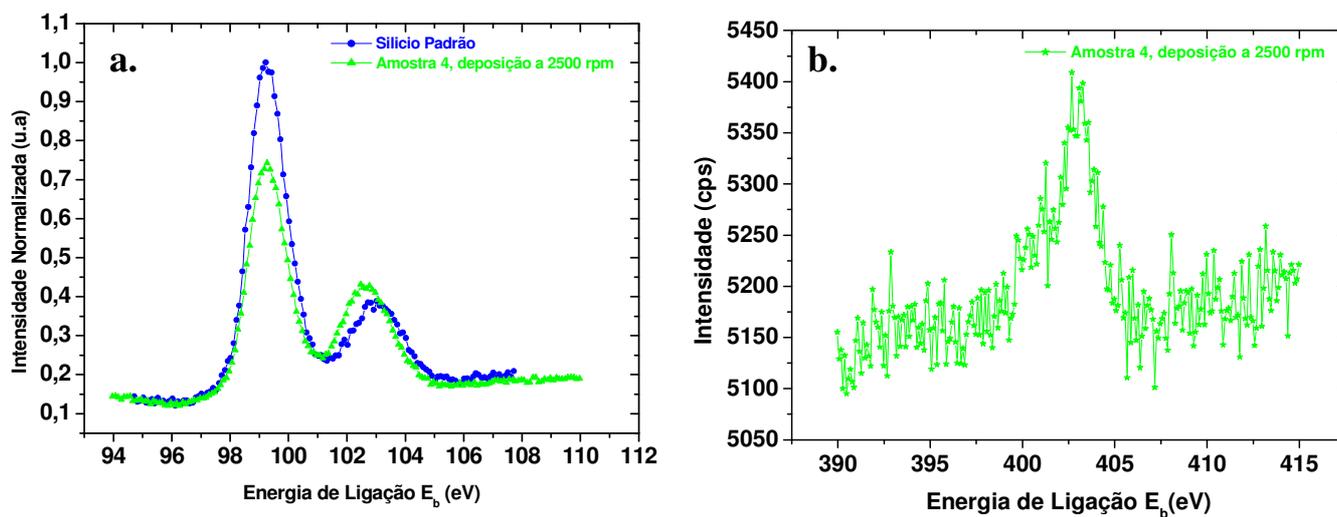


Figura A4.10: a. Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes Si2p Si (111) e da camada de óxido Si 2p-SiO₂ para a amostra 4. b. Espectro de fotoelétrons do N 1s para a amostra 4.

Tabela A4.5: Resumo dos resultados experimentais (energias de ligação características) extraídos dos espectros da amostra 4.

Elemento	Posição E _b (eV)	FWHM (eV)	Área integrada (cps)	Altura (cps)	χ^2
C 1s	286,51	2,63	55849,1	38041,3	4,85
O 1s	534,19	2,68	137375	70191,2	5,08
N 1s	401,55	1,74	374,24	187,42	2,85
N 1s	399,73	2,99	337,053	105,53	2,85
Si 2p	99,3	1,25	7542,81	5501,8	1,17
Si2p-SiO ₂	102,63	1,63	4170,47	2403,0	1,17

Amostra 5

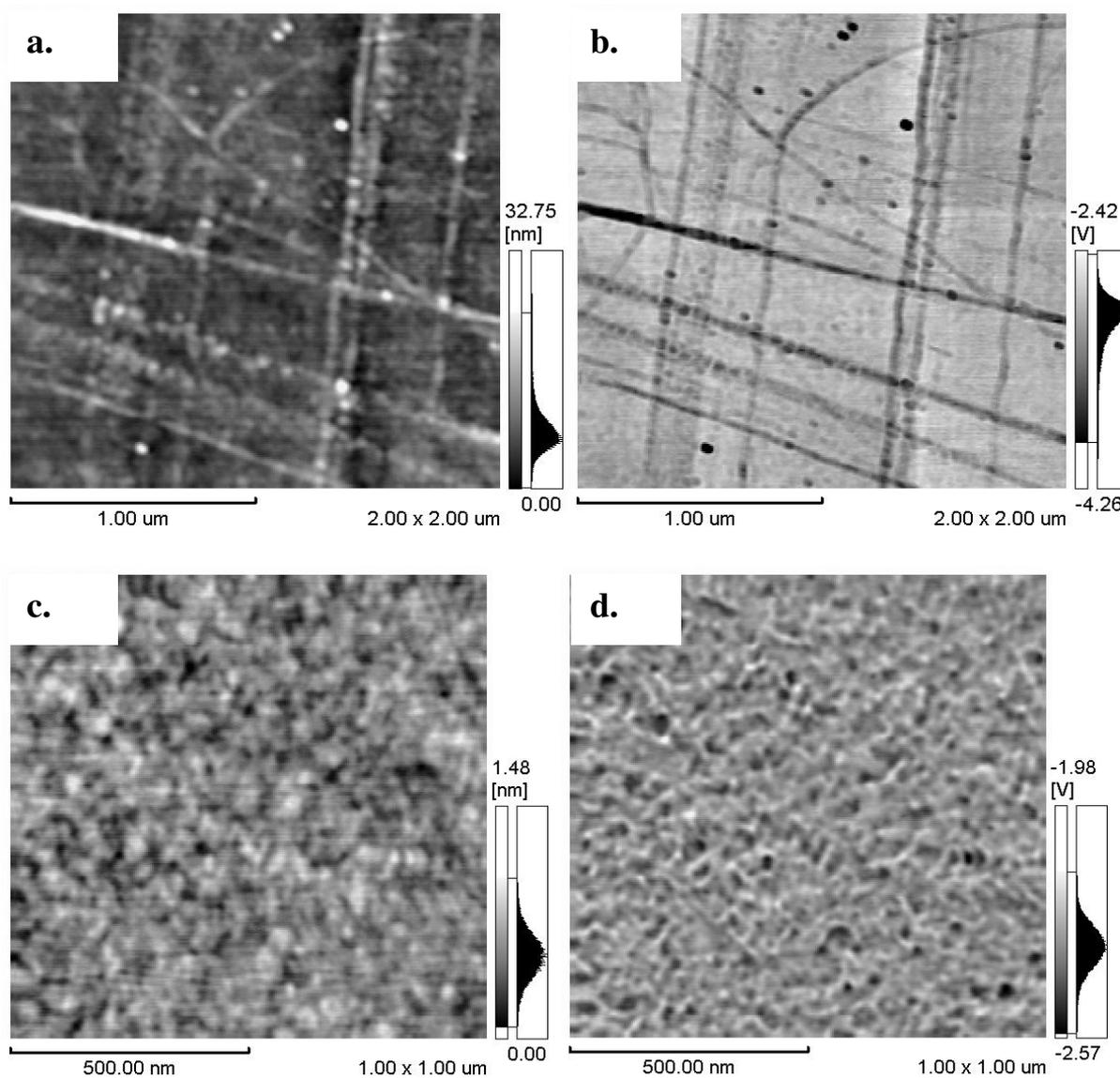


Figura A4.11 : Imagem AFM em modo dinâmico do centro e bordas da amostra 5. **a.** Borda da mostra. **b.** Imagem de fase da imagem **a.** Dimensões: $4\mu\text{m}^2$. **c.** Centro da amostra. **d.** Imagem de fase do centro da amostra 5. Dimensões: $1\mu\text{m}^2$

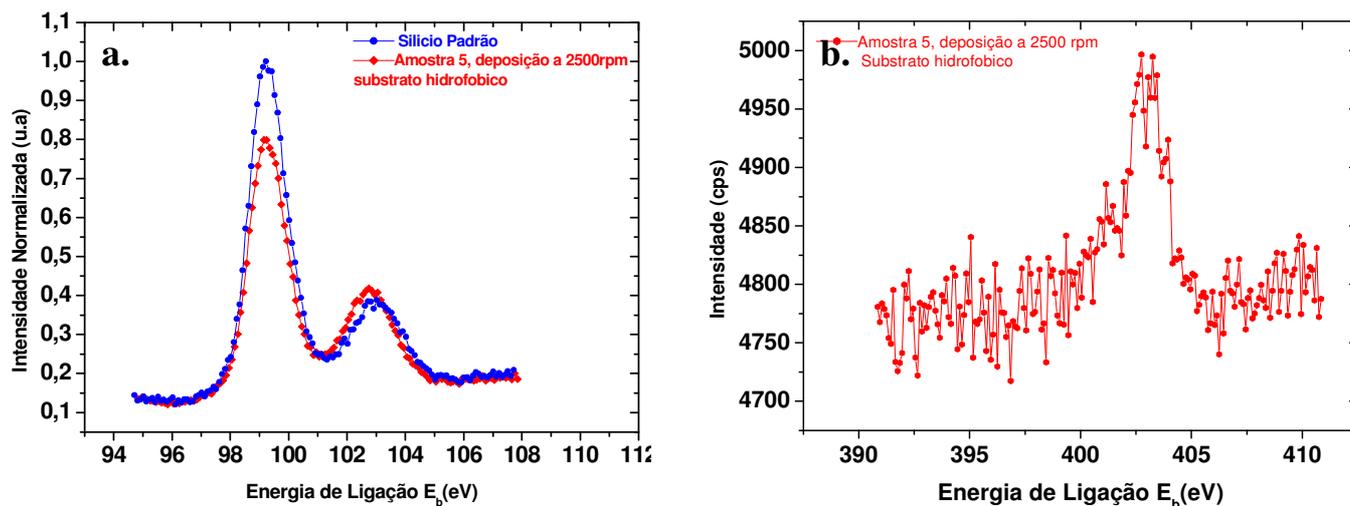


Figura A4.12: **a.** Espectro normalizado de fotoelétrons provenientes Si2p Si (111) e da camada de óxido Si2p-SiO₂ para a amostra 5. **b.** Espectro de fotoelétrons do N 1s para a amostra 5.

Tabela A4.6: Resumo dos resultados experimentais (energias de ligação características) extraídos dos espectros da amostra 5.

Elemento	Posição E _b (eV)	FWHM (eV)	Área (cps)	Altura (cps)	χ^2
C 1s	285,94	2,59	45077,8	15291	2,05
O 1s	533,31	2,71	1258,13	42388	4,55
N 1s	401,12	2,13	221,664	71783	2,35581
N 1s	403,02	1,85	382,27	188,4	2,35581
Si 2p	99,31	1,51	9989,27	5792,1	1,3599
Si2p-SiO ₂	102,74	1,96	4364,47	2082,3	1,3599

Programa escrito para simular a equação f (Y,t)= N/Si

$$\frac{N}{Si} = \frac{i_{Si}}{i_N} \frac{\sigma_N}{\sigma_{Si}} \left(\frac{Y \left\{ \lambda_N^p C_N^p \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_N^p \cos \theta} \right) \right] \right\}}{Y \left\{ \lambda_{Si}^s C_{Si}^s \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{Si}^p \cos \theta} \right) \right\} + (1-Y)(\lambda_{Si}^s C_{Si}^s)} \right)$$

ClearAll[G,J,A,is,sn,in,ss,p1,p2,np,sp,t,si,K,cnp,csi,Z,R];

is=0.283;"Fator de sensibilidade do Si"

in=0.477;"Fator de sensibilidade do N"

ss=0.865;"Scofield cross-section do Si2p"

sn=1.77; "Scofield cross-section do N1S"

np=3.2;"inelastic mean free path of nitrogen photoelectron in protein em nanometros"

sp=4.1;"inelastic mean free path of Si2p photoelectron in protein"

si=3.17;"Inelastic mean free path of Sip photoelectron in Silicon em nanometros"

R=0.047;"valor experimental extraído dos espectros de XPS, relação entre área integrada do pico de Nitrogênio 1s e a área integrada do pico do Si 2p 'bulk'";

t=60 Degree; "take-off angle";

csi=82.5

cnp=3.2

F=(is*sn)/(ss*in);

P1=-1*np*(Cos[t]);

P2=-1*sp*(Cos[t]);

K=cnp*np;

Z=si*csi;

G[x_]=(R*Z)/((F*K)*(1-Exp[x/P1])+(R*Z)*(1-Exp[x/P2]));

Plot[G[x],{x,3,5}]

A6. Apêndice capítulo 6

Saída do programa Estar: cálculo do "collision stopping power" em função da energia incidente para a proteína GlnB-Hs.

