

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ARLEI ROBERTO DE SOUSA

**FORMAÇÃO DE MONOCRISTAIS DE PROTEÍNAS DEPOSITADAS SOBRE
GRADE DE COBRE (GC) REVESTIDA COM FILME DE CARBONO E
ANALISADA AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO**

CURITIBA

2015

ARLEI ROBERTO DE SOUSA

**FORMAÇÃO DE MONOCRISTAIS DE PROTEÍNAS DEPOSITADAS SOBRE
GRADE DE COBRE (GC) REVESTIDA COM FILME DE CARBONO E
ANALISADA AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de
Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos
Materiais, do Setor de Ciências Exatas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César de Camargo.

CURITIBA

2015

S725f

Sousa, Arlei Roberto de

Formação de monocristais de proteínas depositadas sobre grade de cobre (GC) revestida com filme de carbono e analisada ao microscópio eletrônico de transmissão/ Arlei Roberto de Sousa. – Curitiba, 2015.
86 f. : il. color. ; 30 cm.

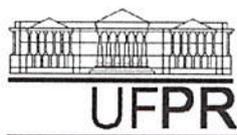
Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2015.

Orientador: Paulo César de Camargo .

Bibliografia: p. 82-86.

1. Cristalização. 2. Proteína. 3. Microscopia eletrônica de transmissão. I. Universidade Federal do Paraná. II. Camargo, Paulo César de. III. Título.

CDD: 572.6



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais- PIPE
Setor de Tecnologia

RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos trinta e um dias do mês de março de 2015, no Auditório do CEHPAR - no Centro Politécnico - UFPR, foi instalada pela Prof.^a Dr.^a Ana Sofia C. M. de Oliveira, coordenadora do PIPE – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, a Banca Examinadora para a ducentésima nonagésima sexta defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais. Estiveram presentes no ato, além do coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, foi constituída pelos professores doutores: Prof. Dr. Paulo César de Camargo (UFPR), Ney Pereira Mattoso Filho (UFPR), Rodrigo Villares Portugal (LCNM). Às 09:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **ARLEI ROBERTO DE SOUSA** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada **“FORMAÇÃO DE MONO CRISTAIS DE PROTEINAS DEPOSITADAS SOBRE GRADE DE COBRE (GC) REVESTIDA COM FILME DE CARBONO E ANALISADA AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca decidiu pela _____ Aprovação _____ do candidato, (de acordo com a determinação dos artigos 68 e 69 da resolução 65/09 de 09.11.2009).

Curitiba, 31 de março de 2015.

Prof. Dr. Paulo César de Camargo
Orientador

Prof. Dr. Ney Pereira Mattoso Filho
Examinador

Prof. Dr. Rodrigo Villares Portugal
Examinador

Prof.^a Dr.^a Ana Sofia C. M. de Oliveira
Coordenadora do PIPE

AGRADECIMENTOS

- ✓ Aos meus pais, Juvêncio de Sousa e Maria Ilma de Sousa, por me fazerem acreditar que sempre é possível.
- ✓ A minha amada esposa Marcia Balzer, por estar sempre ao meu lado me apoiando tanto afetivamente como profissionalmente.
- ✓ Aos meus filhos, Marina A. de Sousa e Arthur B. de Sousa que são a razão da minha vida.
- ✓ Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cesar de Camargo, pela paciência, empenho e dedicação nas valiosas orientações.
- ✓ Ao Prof. Dr. Ney Mattoso pela imensa ajuda na compreensão do processo.
- ✓ A Prof. Dr^a Elaine Benelli, por fornecer a Lisozima e seu laboratório para realização dos experimentos, etapa fundamental para o desenvolvimento desta dissertação.
- ✓ As minhas amigas, Ana Paula Vaz e Fernanda Pavesi pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Nanotecnologia: agregado interdisciplinar de vários campos das Ciências naturais e exatas.....	22
Figura: 3.2 O grupo carboxila de um aminoácido é ligado ao grupo amino de um segundo aminoácido por uma ligação peptídica.....	23
Figura: 3.3 Estrutura geral de um aminoácido.....	24
Figura 3.4 Níveis de organização das proteínas.....	25
Figura 3.5 Complexo enzima – substrato – inibidor	26
Figura 3.6 A estrutura primária da enzima lisozima é a sequência exata da cadeia de polipeptídio de 129 aminoácidos.....	28
Figura 3.7 Célula unitária de um cristal de sal (NaCl).....	30
Figura 3.8 Célula unitária com seus eixos coordenados x,y e z, mostrando os comprimentos axiais(a,b e c) e os ângulos entre os eixos (α , β e γ).....	31
Figura 3.9 Redes de Bravais	32
Figura 4.1 Imagem de uma onda plana espalhada por um obstáculo ou um orifício com dimensões comparáveis ao comprimento de onda.....	36
Figura 4.2 Imagem da difração de raios X.....	37
Figura 4.3 Diagrama da Lei de Bragg, (a) Interferência construtiva. (b) Interferência destrutiva.....	37
Figura 4.4 Imagem representando a lei de Bragg.....	40

Figura 4.5 Relação entre comprimento de onda, espaçamento interplanar e ângulo de difração para interferência construtiva	40
Figura 4.6 Diagrama esquemático da relação entre o espaçamento R de pontos de difração e o comprimento de câmera L.....	40
Fig.5.1 Conjunto de pontos ("spots") brilhantes resultantes da difração de elétrons de uma amostra contendo Lisozima.....	42
Figura 5.2 Esfera de Ewald incluindo os feixes: incidente e difratado, mostrando o raio da esfera de Ewald($1/\lambda$). O vetor S é um vetor da rede recíproca quando $ S = 1/d_{hkl}$, onde d_{hkl} = distância interplanar.....	43
Figura 5.3 Representação dos planos (110), (120) e (130), considerando-se uma origem arbitrária, indicada por 0. Pontos do espaço recíproco com comprimento $1/d_{hkl}$. Cada família de planos paralelos do espaço direto corresponde a um ponto do espaço recíproco.....	44
Figura 5.4 O plano que corta os eixos em a/h , b/k e c/l é o plano (HKL) normalizado.....	45
Figura 7.1 Diagrama esquemático de um MET.....	48
Figura 7.2 Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1200EX-II.(UFPR). Foto: Mariane Mendonça.....	48
Figura 7.3 Grades de Cobre para MET, modelo mesh 300, da empresa Electron Microscopy Sciences.....	49
Figura 9.1 Desenho esquemático do método da "gota".....	52
Figura 9.2 Imagem panorâmica de uma Grade de cobre de MET.....	53
Figura 9.3 (a), (b) e (c), Projeções estereográficas de cristais de lisozima.....	57

Figura 9.4 (a), (b) e (c), Projeções estereográficas de cristais de Centrina.....	57
Figura 10.1 (a) Imagem de difração de um possível cristal de Lisozima, (b) projeção estereográfica da Lisozima considerando a direção de incidência [1 0 0].....	62
Figura 10.2 Imagem de difração de um possível cristal de Lisozima mostrando a direção [0 1 0].....	62
Figura 10.3 Imagem de difração de um possível cristal de Lisozima mostrando a direção [0 0 1].....	63
Figura 10.4 Imagem de difração de um possível cristal de Lisozima mostrando a direção [0 1 3]	64
Figura 10.5 Imagem mostrando o ângulo de 60° que a direção [0 1 0] forma com a direção [0 1 3].....	65
Figura 10.6 Imagem mostrando o ângulo de 30° que a direção [0 1 0] forma com a direção [0 1 1].....	66
Figura 10.7 Imagem de difração mostrando vários hexágonos e retângulos que estão associados a estrutura ortorrômbica. O centro destas imagens poderia ser deslocado para o ponto central girando a GC em relação ao feixe incidente..	66
Figura 10.8 Imagens mostrando as direções escolhidas para se calcular as distâncias interplanares e os ângulos correspondentes. (a) Direção [0 1 0], (b) Direção [0 0 1] e (c) Direção [0 1 3].....	68
Figura 10.9 (a) Imagem mostrando o ângulo de 90° que a direção [0 1 0] forma com a direção [0 0 1], (b) ângulo de 60° com a direção [0 1 3], (c) ângulo de 30° com a direção [0 1 1].....	68

Figura 10.10 A melhor correspondência entre ângulos é observada para a projeção do eixo [1 0 0] da Lisozima. Ao lado das direções estão indicados os ângulos correspondentes.....	70
Figura 10.11 Comparação entre os pontos de difração de um cristal de Lisozima e aqueles gerados a partir de dados experimentais..O círculo representa a região onde os spots não estão visíveis, devido aos baixos índices de Miller e conseqüentemente raios muito pequenos.....	71
Figura 10.12 (a) Imagem de difração de um possível cristal de Centrina, (b) projeção estereográfica da Centrina considerando a direção de incidência [0 1 0].....	72
Figura 10.13 Imagem de difração de um possível cristal de Centrina mostrando a direção [1 0 0].....	72
Figura 10.14 Imagem de difração de um possível cristal de Centrina mostrando a direção [0 0 1]	73
Figura 10.15 Imagem de difração de um possível cristal de Centrina mostrando a direção [3 0 2].....	74
Figura 10.16 (a) Imagem de difração de um possível cristal de Centrina mostrando o ângulo de $63,5^{\circ}$ que a direção [1 0 0] faz com a direção [30 1],(b) ângulo de $45,2^{\circ}$ com a direção [302] , (c) ângulo de 24° com a direção	75
Figura 10.17 A melhor correspondência entre ângulos é observada para a projeção do eixo [0 1 0] da Centrina. Ao lado das direções estão indicados os ângulos correspondentes.....	76
Figura 10.18 Comparação entre a imagem de difração de um possível cristal de Centrina e pontos gerados a partir de dados experimentais..O círculo representa a região onde os “spots” não estão visíveis, devido às pequenas distâncias do ponto de incidência do feixe.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Simetrias das células unitárias	31
Tabela 10.1 Tabela mostrando as posições dos “spots” com os respectivos cálculos do raio e das distâncias interplanares correspondentes a direção [0 1 0].....	63
Tabela 10.2 Tabela mostrando as posições dos spots com os respectivos cálculos do raio e das distâncias interplanares correspondentes a direção [0 0 1].....	64
Tabela 10.3 Tabela mostrando as posições dos spots com os respectivos cálculos do raio e das distâncias interplanares correspondentes à direção [0 1 3].....	65
Tabela 10.4 Relação dos ângulos, da Lisozima, entre os planos (h1 k1 l1) com (h2 k2 l2). As colunas H1 , K1 , L1 , H2 , K2 , L2 correspondem aos índices de Miller sem normalização. As colunas H1N , K1N , L1N , H2N, K2N e L2N correspondem aos índices de Miller normalizados.....	69
Tabela 10.5 Tabela mostrando as posições dos spots com os respectivos cálculos do raio e das distâncias interplanares correspondentes a direção [1 0 0].....	73
Tabela 10.6 mostrando as posições dos spots com os respectivos cálculos do raio e das distâncias interplanares correspondentes a direção [0 0 1].....	74
Tabela 10.7 mostrando as posições dos spots com os respectivos cálculos do raio e das distâncias interplanares correspondentes a direção [302].....	76
Tabela 10.8 Relação dos ângulos, da Centrina, entre os planos (h1 k1 l1) com (h2 k2 l2). As colunas H1 , K1 , L1 , H2 , K2 , L2 correspondem aos índices de Miller sem normalização. As colunas H1N , K1N , L1N , H2N, K2N e L2N correspondem aos índices de Miller normalizados.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

COMPRIMENTO:	Å ångström (10^{-10} m) nm nanometro (10^{-9} m) µm micrometro (10^{-6} m)
MASSA:	DA dalton ($1u = 1,7.10^{-23}$ kg)
GC	Grade de cobre revestida com filme fino de carbono bacteriano
MET	Microscópio eletrônico de transmissão

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 9.1. O gráfico mostrando o maior d possível de se detectar nas condições que foram feitas as medidas. O espalhamento do feixe transmitido apresenta um raio com cerca de 10 mm.....	56
Gráfico 10.1 Relação entre as distâncias interplanares e os planos hkl para a direção [0 1 0] da Lisozima.	63
Gráfico 10.2 Relação entre as distâncias interplanares e os planos hkl para a direção [0 0 1] da Lisozima.....	64
Gráfico 10.3 Relação entre as distâncias interplanares e os planos hkl para a direção [0 1 3] da Lisozima.....	65
Gráfico 10.4 Posições dos spots em relação aos diferentes índices de Miller.....	71
Gráfico 10.5 Relação entre as distâncias interplanares e os planos hkl para a direção [1 0 0] da Centrina.....	73
Gráfico 10.6 Relação entre as distâncias interplanares e os planos hkl para a direção [0 0 1] da Centrina.....	74
Gráfico 10.7 Relação entre as distâncias interplanares e os planos hkl para a direção [3 0 2] da Centrina.....	75
Gráfico 10.8 Posições dos “spots” em relação aos diferentes índices de Miller.....	78

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 Fotografias e imagens de difração da Lisozima da amostra preparada com solução de lisozima a $10\mu\text{M}$, com um tempo de deposição de 5s e lavada em água MiliQ.....58
- Quadro 2 Fotografias e imagens de difração da Lisozima da amostra preparada com solução de lisozima a $10\mu\text{M}$, com um tempo de incubação (tempo para a formação do cristal) de 10s e lavada em água MiliQ. DAS com aumento 500.000 X.....59
- Quadro 3 Fotografias e imagens de difração da proteína Centrina Bcen3 + $50\mu\text{M}$ de tris com um tempo de exposição de 5s.60
- Quadro 4 Fotografias e imagens de difração da proteína Centrina(Bcen3) + $50\mu\text{M}$ de tris com um tempo de exposição de 10s.....61

RESUMO

Mostramos, neste trabalho, que as proteínas Lisozima e Centrina (BeCen3) depositadas diretamente em grades para microscopia de transmissão revestidas com filme fino de Carbono Bacteriano e lavadas imediatamente após um período de deposição de 5s a 10s, quando analisadas pela técnica de Difração de Elétrons em Área selecionada(DAS), mostram padrões de difração consistentes com as estruturas ortorrômicas esperadas. A evidência da cristalização em tempos reduzidos, na fase inicial de cristalização, mostra uma promissora técnica para caracterização de proteínas difíceis de obter-se em dimensões maiores do que centenas de nanômetros.

Além dos padrões de difração, a forma dos monocristais formados é compatível com as estruturas cristalinas das proteínas depositadas. Na configuração utilizada, sendo a energia do feixe de elétrons de 80keV e $L = 60\text{cm}$, para cristais com altos parâmetros de rede, a técnica de (DAS) somente permite a observação de pontos do espaço recíproco associados com altos índices de Miller. Os pontos de difração observados experimentalmente possuem raios maiores que 9mm. Para raios menores não se observa difração devido ao espalhamento resultante do feixe incidente central. Pudemos reproduzir os padrões de difração, admitindo-se a estrutura ortorrômica das proteínas analisadas.

Palavras-chave: Cristalização. Monocristais. Proteína. Grade de Cobre. Filme de Carbono Bacteriano. Microscopia Eletrônica de Transmissão. Índices de Miller. Parâmetros de rede.

ABSTRACT

This work shows that the proteins Lysozyme and Centrin (Becen3) when deposited directly on TEM carbon coted grids and washed after 5s to 10s, when analyzed by Selected Area Diffraction(SAD) technique, show diffraction patterns consistent with the expected orthorhombic structures. The evidences of crystallization after reduced time in the initial crystallization phase, shows a promising technique to characterize proteins difficult to obtain in dimensions larger then hundreds nanometers.

Besides the diffraction patterns, the shape of single crystals is compatible with the crystalline structure of the proteins deposited. The setup used with beam energy of 80keV and camera length of 60 cm, for crystals with large lattice spacing, the DAS technique only allows to visualize diffraction spots associated with large Miller index. The diffraction spots radius observed in this work are larger than 9 mm. The spots closer than 9mm are not visible due to the scattering of the incident central beam. We were able to simulates the experimental diffraction patterns assuming the orthorhombic structures published for both proteins.

Keywords: Crystallization. Single crystals. Protein. Copper grid. Bacterial Carbon Film. Transmission Electron Microscopy. Miller indices. Network parameters.

SUMÁRIO

1	Introdução	17
2	Objetivos	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	Generalidades e contexto deste trabalho	21
3.1	Nanotecnologia	21
3.2	Nanobiotecnologia	22
3.3	Proteínas.....	23
3.4	Enzimas	26
3.5	Lisozima.....	27
3.6	Cristalização de proteínas.....	29
3.6.1	Os seres vivos e os cristais	29
3.6.2	Conhecendo os cristais.....	29
3.6.3	Sistemas cristalinos	30
3.6.4	Planos cristalográficos	32
3.6.5	Cristalização de molécula biológica	33
4	O fenômeno da difração	35
4.1	Difração de raios x	36
4.2	Difração de elétrons	37
4.3	A lei de Bragg.....	38
5	Interpretando uma imagem de difração de elétrons	41
5.1	Pontos brilhantes “spots”	42
5.2	Esfera de Ewald	43
5.3	Espaço recíproco	43
5.4	Índices de Miller	44
6	Revisão bibliográfica	46

7	Materiais e métodos	47
7.1	Materiais	47
7.1.1	Microscópio eletrônico de transmissão (MET).....	47
7.1.2	Grade de cobre revestida com filme fino de carbono bacteriano	49
7.1.3	Filme de carbono bacteriano	49
7.1.4	Proteínas	50
8	Solução estoque de proteínas.....	50
8.1	Lisozima.....	50
8.2	Propriedades da lisozima.....	50
8.3	Propriedades da centrina	51
9	Métodos.....	52
9.1	Deposição das proteínas sobre a grade de cobre (GC).....	52
9.2	Difração por área selecionada (DAS).....	53
9.3	Análise da difração	53
9.4	Indexando pontos de difração em microscopia eletrônica com altos índices de Miller.....	55
10	Resultados e discussões.....	58
10.1	Análises das imagens de proteínas feita no MET.....	58
10.2	Análise da imagem de difração	62
11	Conclusões.....	79
12	Sugestões para trabalhos futuros.....	81
13	Referências bibliográficas	82

1 INTRODUÇÃO

Pensar a vida como um conjunto de fenômenos isolados impede que possamos perceber o grau de complexidade que norteia toda a existência dos seres vivos e sua relação com o mundo químico e físico que o cerca. Em cada uma das milhares de espécies que se inter-relacionam no planeta encontramos um emaranhado de componentes químicos realizando funções simples e funções de alta complexidade.

O mundo macroscópico nem sempre se parece com o mundo microscópico. Na escala nanométrica, muitas propriedades fundamentais, de natureza química, física e mecânica dos materiais, podem mudar radicalmente[1]. Uma destas funções é a cristalização realizada por alguns tipos de moléculas, especialmente as proteínas. A informação estrutural cristalográfica nos dá não só a capacidade de compreender as funções específicas de diferentes materiais, mas também para conceber novas estruturas com propriedades alteradas ou para compensar os defeitos existentes[2]. Conhecer os mecanismos de organização dos componentes celulares e sua capacidade de se auto-organizar nos permite desenvolver uma grande variedade de tecnologias que vão desde sensores até sistemas imunológicos artificiais [3].

Uma das técnicas utilizadas no estudo de nanobiomateriais é o revestimento de superfícies sólidas com monocamadas de materiais orgânicos. A adsorção (fixação) de proteínas, mais especificamente as enzimas, sobre superfícies sólidas vem sendo cada vez mais estudadas, pois estas substâncias possuem a capacidade de se aderir às superfícies sólidas formando monocamadas de cristais estáveis que suportam ser estudados utilizando diferentes tipos de radiações [4].

A visão nanométrica dos compostos biológicos vem ganhando mais espaço com o avanço nas diferentes tecnologias, como o Raio x, o Microscópio Eletrônico de Transmissão e a Ressonância, que são utilizadas para acessar, conhecer e manipular este mundo tão pequeno. Inúmeras informações podem ser obtidas examinando-se a física do espalhamento eletromagnético, porém limitaremos esta discussão ao fenômeno da difração.

A difração é particularmente importante na nanobiotecnologia quando se utiliza raios x ou no uso de microscopia eletrônica. Tanto a difração de raios x como a de elétrons, são muito importantes para um aprofundamento neste campo.

Trabalhar com material biológico ou mesmo orgânico em geral é muito diferente de se trabalhar com material inorgânico, pois vários fatores externos, como temperatura e umidade, interferem na estabilidade deste tipo de material e faz com que o monitoramento da amostra em análise necessite cuidados específicos [5].

A interdisciplinaridade é uma constante na nanociência e deve ser tratada como fator fundamental para o desenvolvimento de qualquer projeto nesta área. Compreender a relação entre as ciências e destas com a tecnologia e sociedade, significa ampliar as possibilidades de compreensão e participação efetiva na produção e divulgação do conhecimento científico.

A formação dos cristais de proteínas, utilizados neste trabalho, foi baseada em um procedimento de cristalização desenvolvido inicialmente na dissertação de mestrado de Vivian Fernanda Pavesi (PIPE-2011). Naquele trabalho constatou-se que o revestimento das grades com celulose bacteriana resultava em superfície rugosa, impossibilitando a observação das proteínas por microscopia de força atômica. No entanto, o uso do MET se mostrou muito eficiente para ser utilizado neste tipo de observação. O tempo necessário para a formação de um micro ou nano cristal, capaz de possuir todas as características da substância que o forma, foi testado e pode ser reduzido a segundos e não a horas ou dias como acontece normalmente para se obter um cristal grande e estável, condição necessária para ser analisado ao difratômetro de raios x. Verificou-se que em concentrações adequadas os tempos de 5 e 10 segundos são ideais para a formação de nano e microcristais.

A análise destes micro e nano cristais é feita exclusivamente com o microscópio eletrônico de transmissão pois, além de incidir uma menor quantidade de energia na amostra, preservando-a, o MET possibilita a difração por área selecionada (DAS), ou seja, a visualização de pequenas áreas escolhidas durante a análise das amostras. A técnica de cristalização utilizada foi desenvolvida levando-se em consideração as fases, já conhecidas, de

cristalização de uma proteína: nucleação, crescimento e cessação do crescimento. Durante a nucleação, fase inicial da cristalização, acreditamos que o cristal já possui todas as informações necessárias para ser caracterizado. O tempo de formação destes micro e nano cristais, utilizados nesta dissertação, foi de 5 e 10 segundos. Estes valores foram determinados por tentativa e erro onde ficou evidenciado que, utilizando-se soluções com concentração de proteína da ordem de nanomolar, para tempos inferiores à 5 segundos não havia formação de cristais e tempo superior à 10 segundos formava uma camada muito espessa de material sobre a GC, impedindo a visualização no MET. A cristalização de proteínas é uma ciência um tanto empírica, e as estruturas de muitas proteínas importantes não são ainda conhecidas simplesmente porque elas se mostraram de difícil cristalização [6].

Esta técnica possibilitará um grande avanço nos processo de cristalização devido à rapidez e a utilização de pequenas quantidades de proteínas, além de contribuir para a determinação de estrutura de proteínas que não se cristalizam facilmente.

O conhecimento cristalográfico teórico, as técnicas laboratoriais para a formação de cristais de proteínas e as técnicas utilizadas nos difratômetros de raios x e no MET, tornam-se pré-requisitos para o estudo das proteínas em escala nanométrica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver um novo protocolo para a cristalização rápida e investigação de monocristais de proteínas depositadas sobre Grade de cobre (GC) revestida com filme de carbono bacteriano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizando-se inicialmente a lisozima, avaliar e comparar o tempo mínimo e máximo necessário para a formação de micro e nano cristais sobre filme de carbono bacteriano em GC, para ser analisado ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.
- Identificar e caracterizar os cristais utilizando-se a técnica de Difração por área Seleccionada (DAS) no Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET).

3 GENERALIDADES E CONTEXTO DESTE TRABALHO

Tratando-se de uma dissertação que envolve métodos de diferentes áreas do conhecimento, esta revisão aborda as ideias gerais da tecnologia correlata, seguida de conceitos essenciais envolvendo nanotecnologia, proteínas, cristalização e interações em superfícies sólidas. A técnica de difração de raios x e de elétrons será descrita brevemente. A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), sendo essencial na caracterização dos monocristais, é tratada com mais detalhes, especialmente nos aspectos da difração de elétrons. Alguns trabalhos recentes sobre difração de elétrons em proteínas são comentados.

3.1 NANOTECNOLOGIA

O estudo das propriedades dos materiais na escala do nanômetro é chamado de nanociência. A nanotecnologia busca se aproveitar das novas propriedades que surgem nos materiais quando em escala nanométrica para, através do controle das dimensões e da forma dos nano-objetos, conseguir a preparação

de novos dispositivos tecnológicos com finalidades específicas [7].

A maior das motivações para o desenvolvimento de objetos nanométricos reside na possibilidade de produção de moléculas inéditas que possuam diferentes e incomuns propriedades físicas e químicas. É papel da nanotecnologia se aproveitar destas novas propriedades que surgem para desenvolver produtos com diferentes tipos de aplicações tecnológicas [8].

A nanotecnologia se tornou um dos mais promissores campos de pesquisa da atualidade e por não possuir uma tecnologia específica e sim interdisciplinar baseada na física, química, biologia, engenharias, computação e medicina, permite que vários campos façam seu uso [1].



Figura 3.1 Nanotecnologia: agregado interdisciplinar de vários campos das Ciências naturais e exatas[1].

As nanopartículas são diferentes da grande maioria dos outros riscos provocados pela industrialização, já que podem tornar parte de sistemas biológicos (o corpo humano, por exemplo), ultrapassando barreiras que são capazes de segurar partículas maiores. Que impacto as nanopartículas estruturadas podem ter no organismo e no meio ambiente? E no campo social as inovações vão servir para a sociedade como um todo ou irão aumentar ainda mais as diferenças [9]?

3.2 NANOBIOTECNOLOGIA

Refere-se à fusão de duas abordagens de tecnologias recentes, a biotecnologia e a nanotecnologia, apresentando enormes inovações e potencialidades. A nanobiotecnologia pode ser, portanto, definida como o estudo, processamento, fabricação e desenho de dispositivos orgânicos, nanomateriais para atuação biológica ou biomateriais, nos quais pelo menos um componente funcional possui tamanho nanométrico. Áreas importantes da nanobiotecnologia incluem a nanomedicina (biologia molecular e genética), a física-médica (diagnóstico), o desenvolvimento de nanofármacos (fármacos encapsulados), além da nanocosmectútica (cosméticos com efeitos farmacológicos consideráveis) [10]. A nanobiotecnologia envolve a manipulação de átomos e moléculas que se acoplam a materiais biológicos, como é o caso de alvos específicos (ligados a distribuição de fármacos pelo organismo)[11] ou mesmo estruturas formadoras de materiais biológicos[12]. O estudo deste tipo

de material é muito complexo e exige um esforço multidisciplinar já que algumas técnicas utilizadas são oriundas de outras ciências além da Biologia.

3.3 PROTEÍNAS

Independente do ser vivo que analisamos a proporção de proteínas que constitui o seu organismo assemelha-se muito a de outro ser vivo qualquer. Isto é um indicativo que estas substâncias desempenham papéis de grande relevância para a manutenção e propagação da vida no planeta.

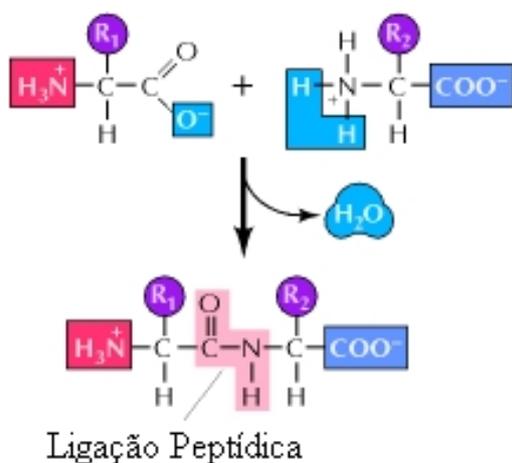


Figura: 3.2 O grupo carboxila de um aminoácido é ligado ao grupo amino de um segundo aminoácido por uma ligação peptídica[13].

A palavra proteína vem do grego protos que significa “ a primeira” ou a “mais importante”. As proteínas são biopolímeros, com alta massa molecular, formados por monômeros denominados aminoácidos que se ligam entre si por um tipo específico de ligação covalente denominada de ligação peptídica. Para que estas ligações peptídicas ocorram é necessário que haja uma desidratação dos aminoácidos. O grupo α amino de um aminoácido liga quimicamente com o grupo α carboxila de um segundo

aminoácido, como mostrado na figura acima [14].

Analisando a estrutura química de uma proteína podemos identificar os diferentes tipos de aminoácidos que a constitui. O número de aminoácidos é relativamente pequeno perto da variedade de proteínas que formam o organismo de um modo geral. Toda a variedade de proteínas existentes deve-se a combinações de 20 tipos de aminoácidos. As proteínas diferem umas das outras por apresentarem três condições diferentes:

- a) Tipos de aminoácidos
- b) sequência dos aminoácidos
- c) Número de aminoácidos

Alterando-se uma destas condições na cadeia polipeptídica modificam-se as características e a estrutura da proteína. As combinações entre os aminoácidos são determinadas pelo código genético estabelecendo o papel biológico de cada proteína.

Este conjunto de 20 aminoácidos possibilita a formação de proteínas com as mais diferentes funções como hormônios, anticorpos, proteínas transportadoras, enzimas, estrutura corporal e mais uma variedade de outras funções.

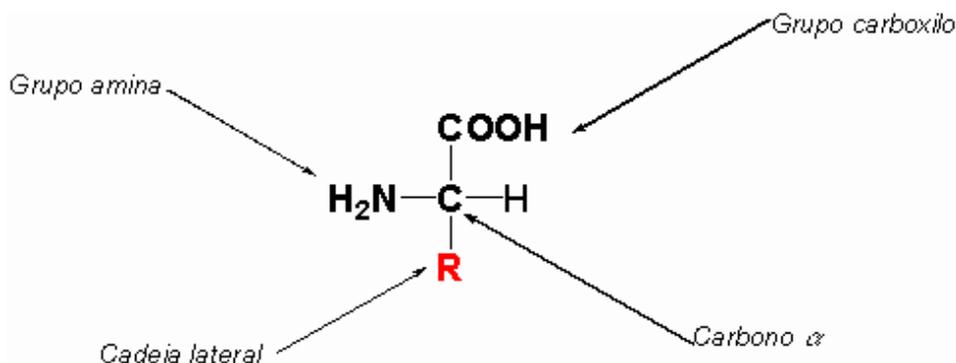


Figura: 3.3 Estrutura geral de um aminoácido

Para que as proteínas possam ser tão versáteis elas precisam se organizar em diferentes níveis estruturais determinados pela sequência de seus aminoácidos e resultantes das interações entre estes, existindo quatro níveis de estrutura como mostrado na figura abaixo estrutura primária, secundária, terciária e quaternária[13,14].

- 1) Estrutura primária: é formada pela sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. Sua estrutura é somente a sequência dos aminoácidos, sem se preocupar com a orientação espacial da molécula. É o nível estrutural mais simples e mais importante, pois dele deriva todo o arranjo espacial da molécula. A estrutura primária é específica de cada proteína sendo, geralmente, determinada geneticamente.
- 2) Estrutura secundária: É dada pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na sequência primária da proteína, ocorre graças à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos alfa dos aminoácidos e os seus grupos amina e carboxila. Os tipos mais comuns de estrutura secundária são a hélice α, onde pontes de hidrogênio formam, entre CO e NH, grupos de ligações peptídicas, separados por

quatro resíduos de aminoácidos e folha β . Em uma folha β , pontes de hidrogênio conectam as duas partes de uma cadeia polipeptídica lado a lado.

- 3) Estrutura terciária: Resulta do dobramento da cadeia polipeptídica como resultado das interações entre as cadeias laterais de aminoácidos que se encontram em diferentes regiões da seqüência primária.
- 4) Estrutura quaternária: consiste na interação entre diferentes cadeias polipeptídicas da proteína.

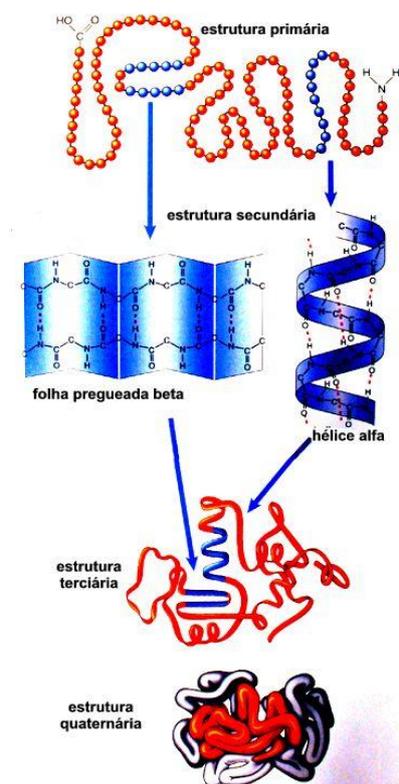


Figura 3.4 Níveis de organização das proteínas[10].

Apesar dos diferentes níveis estruturais, nenhuma generalização pode ser feita com relação as suas funções ou aos seus pesos moleculares pois existem proteínas de tamanhos variáveis desempenhando diferentes funções dentro do organismo.

Dentre todas as funções realizadas pelas proteínas, a função catalítica é a que apresenta a maior variedade e especialização. Esta função é desempenhada por um tipo de proteínas denominadas, enzimas.

3.4 ENZIMAS

As Enzimas são biocatalizadores proteicos especializados na catálise das mais diferentes reações biológicas. Como todos os catalisadores, diminuem a energia de ativação e aceleram a velocidade de uma reação química, porém não são consumidas durante o processo.

Outra característica das enzimas é que elas possuem alta especificidade e por isso agem sempre sobre um mesmo tipo de substrato. Esta especificidade ocorre devido a presença de uma região de encaixe na estrutura da enzima denominada de sítio de ligação do substrato. Este sítio de ligação é capaz de reconhecer especificamente um determinado substrato e ali catalisar a reação química. Alguns fatores, como a temperatura e o pH podem influenciar na velocidade de uma reação enzimática.

Reação enzimática expressa pela equação proposta por Michaelis-Menten:

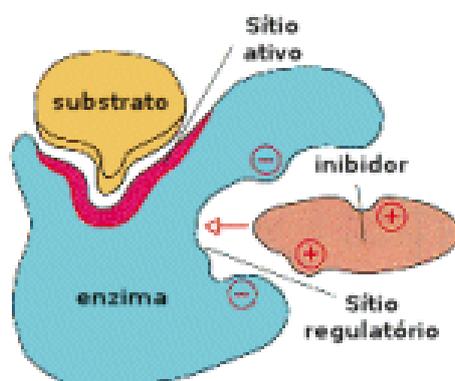
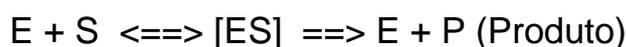


Figura 3.5 Complexo enzima – substrato - inibidor

A nomenclatura das enzimas mais utilizada é feita pela adição do sufixo ase ao nome do substrato, ou seja, a molécula na qual a enzima exerce sua ação catalítica. Como exemplo, a fosfatase catalisa a hidrólise de ésteres de fosfato. Mas com a descoberta de novas enzimas esta nomenclatura não tem se mostrado eficiente e por isto foi proposta uma nova classificação sistemática. A classificação das enzimas é relativamente extensa mas de acordo com a união internacional de bioquímica (IUB) seis classes foram estabelecidas: Oxirredutases, Transferases, Hidrolases, Liases, Isomerases e ligases. Cada uma destas classes catalisam diferentes reações químicas.

Para algumas reações apenas a enzima não é suficiente, por isso ela requer uma molécula denominada de cofator que, geralmente, é um íon metálico ou uma coenzima. Estas moléculas se ligam as enzimas para ativar a reação química[6].

3.5 LISOZIMA

A lisozima é uma enzima amplamente estudada pois é de fácil biodisponibilidade e de simples purificação e cristalização e pode ser encontrada em muitos seres vivos desde bactérias até seres humanos.

Esta proteína possui massa molecular de cerca de 14,6 kDa, ponto isoelétrico aproximadamente igual a 11,35 e está presente na clara do ovo, lágrima, saliva, leucócitos e no soro humano[15].

Foi descoberta pelo médico escocês Alexander Fleming em 1922, com sua estrutura tridimensional definida por David Chilton Phillips e colaboradores em 1965. A lisozima foi a segunda estrutura de proteína e a primeira estrutura de enzima a ser resolvida por métodos de difração de raios x, e a primeira enzima a ser completamente sequenciada, que contém todos os vinte aminoácidos aminados. Foi primeiramente cristalizada em condições ácidas por Alderton e Fevold (1946) em cloreto de sódio e posteriormente em sulfato de amônio contendo tampão acetato. Porém, tem sido sugerido que esta cristalização da lisozima em sulfato de amônio ocorreu pela presença de acetato e não do sal sulfato de amônio[16].

A lisozima é assim chamada porque pode “lisar” ou degradar as paredes celulares protetoras de algumas famílias de bactérias, atuando como agente bactericida[6]. A lisozima é responsável pela quebra ou clivagem hidrolítica de polissacarídeos complexos presentes na parede celular de algumas famílias de bactérias. Essa característica lhe confere uma ação bactericida que protege os organismos do ataque de muitos tipos de bactérias gram-positivas[17].

Ela desempenha este papel catalisando a inserção das moléculas de água em determinados pontos das cadeias polissacarídeas das bactérias, mais concretamente nos locais onde os dois amino-açúcares que compõem as cadeias (N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico) se ligam. Pertence, portanto, à classe funcional enzimática das hidrolases.

A estrutura primária da lisozima consiste numa única cadeia polipeptídica constituída por 129 aminoácidos. Ao longo da cadeia existem quatro pares de cisteínas (aminoácidos hidrofóbicos que contêm um grupo tiol: - SH) ligados por uma ponte dissulfídica. Em relação à estrutura secundária da lisozima, sabe-se que ela tem cinco regiões helicoidais, sendo três delas alfa hélices e as restantes intermediárias. Nas alfa hélices, há extensão dos radicais dos aminoácidos para fora e extensão dos grupos carbonilo de cada ligação peptídica paralela ao eixo da hélice, apontando para o grupo NH do aminoácido da cadeia que se situa numa posição de quatro aminoácidos antes desse, formando com ele uma ponte de hidrogênio. A lisozima apresenta ainda cinco regiões de camadas beta. Estas consistem em pares de cadeias que se situam lado a lado (frequentemente antiparalelas), sendo estabilizadas por pontes de hidrogênio entre os átomos de hidrogênio ligados aos nitrogênios de cada ligação peptídica e o átomo de oxigênio carbonílico das ligações peptídicas da cadeia peptídica adjacente[18].

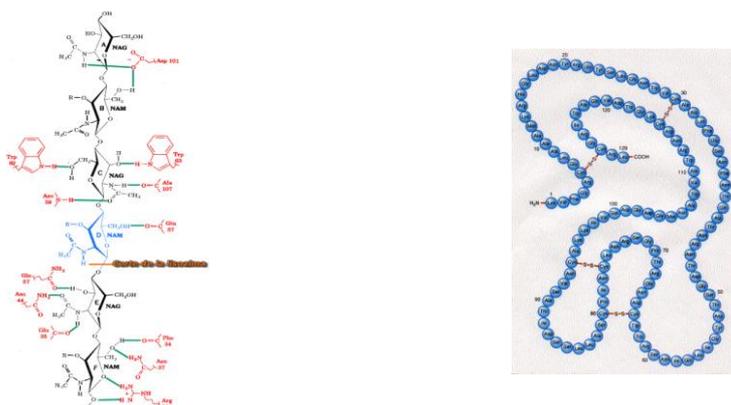


Figura 3.6 A estrutura primária da enzima lisozima é a sequência exata da cadeia de polipeptídeo de 129 aminoácidos[19].

3.6 CRISTALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

3.6.1 OS SERES VIVOS E OS CRISTAIS

Considerando que todos os seres vivos são formados por diferentes tipos de matéria e que esta se organiza de forma muito semelhante nos diferentes tipos de seres vivos então é imprescindível que possamos conhecer a estrutura da matéria e suas mais variadas propriedades. Uma das formas de se obter este conhecimento é fazendo análise de cristais de macromoléculas, mais especificamente das proteínas e a partir deste conhecimento podemos comparar estruturas saudáveis com aquelas que se encontram alteradas por algum motivo e desenvolver técnicas que nos permitam corrigir estes erros ou impedir que eles aconteçam[2].

3.6.2 CONHECENDO OS CRISTAIS

Em um material cristalino os átomos estão posicionados em um arranjo periódico ou repetitivo ao longo de grandes distâncias atômicas; isto é, existe uma ordem de longo alcance, tal que quando ocorre solidificação, os átomos se posicionarão entre si num modo tridimensional repetitivo, no qual cada átomo está ligado aos seus átomos vizinhos mais próximos. As estruturas cristalinas, podem ser conveniente subdivididas em pequenas unidades que se repetem, chamadas células unitárias. Nesse sentido a célula unitária é a unidade estrutural básica, ou bloco construtivo, da estrutura cristalina e define a estrutura cristalina por meio da sua geometria e das posições dos átomos no seu interior. Em um sólido cristalino, quando o arranjo periódico e repetido dos átomos é perfeito ou se estende por toda a amostra sem interrupções, o resultado é um monocristal. Todas as células unitárias interligam-se da mesma maneira e possuem a mesma orientação. A maioria dos sólidos cristalinos, no entanto, são materiais policristalinos sendo compostos de muitos pequenos cristais ou grãos que possuem diferentes orientações cristalográficas[21].

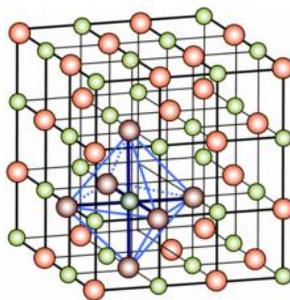


Figura 3.7 Célula unitária de um cristal de sal (NaCl).

A forma e tamanho da célula unitária de cada cristal dependem das dimensões, valência química e estado de ionização dos átomos ou moléculas que o compõem e das condições em que o cristal se formou.

A mesma substância, sob condições de pressão e temperatura distintas, pode formar cristais com células unitárias totalmente diversas. Um exemplo clássico é o Carbono, o qual pode, dependendo das condições, cristalizar sob centenas de formas, indo desde o diamante à grafite, passando pelos fullerenos e pelas inúmeras variantes da fibra de carbono. Também as substâncias orgânicas, dos açúcares às proteínas e ao DNA, cristalizam em formas complexas em resultado do seu elevado peso molecular e complexidade estrutural. Na realidade, cada cristal é constituído pela repetição de milhões de milhões de células unitárias semelhantes, agrupadas de forma regular, que, funcionando como autênticos blocos construtivos do cristal, acabam por determinar a sua macroestrutura.

Muitas das propriedades da matéria podem ser entendidas a partir da sua análise cristalográfica. A informação estrutural cristalográfica nos dá não só a capacidade de compreender as funções específicas de diferentes materiais, mas também para conceber novas estruturas com propriedades alteradas ou para compensar os defeitos existentes[2].

3.6.3 SISTEMAS CRISTALINOS

Como existem muitas estruturas cristalinas diferentes é conveniente dividi-las em grupos, de acordo com as configurações das células unitárias e/ou arranjo dos átomos. Um desses enfoques está baseado na geometria da célula unitária, isto é, na forma do paralelepípedo apropriado para representar a

célula unitária, independente das posições dos átomos na célula. Neste contexto, é estabelecido um sistema de coordenadas x , y e z que tem sua origem localizada em um dos vértices da célula unitária. cada um dos eixos x , y e z coincide com uma das 3 arestas do paralelepípedo que se estendem a partir deste vértice. A geometria da célula unitária é completamente definida em termos de seis parâmetros: os comprimentos das três arestas a , b e c , e os três ângulos entre os eixos α , β e γ . Algumas vezes são denominados parâmetros de rede cristalina de uma estrutura cristalina[20].

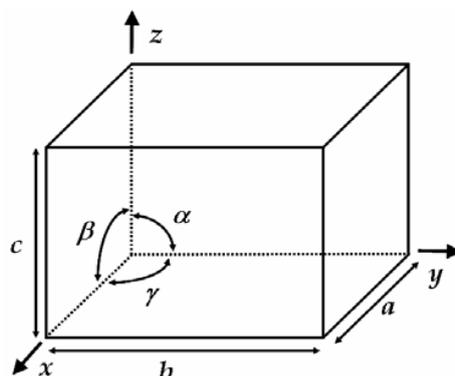


Figura 3.8 Célula unitária com seus eixos coordenados x, y e z , mostrando os comprimentos axiais (a, b e c) e os ângulos entre os eixos (α, β e γ).

Qualquer material sólido cristalino pode ser construído a partir de sete tipos diferentes de simetria para células unitárias: cúbica, tetragonal, ortorrômbica, romboédrica (ou trigonal), hexagonal, monoclinica e triclínica, adicionados das posições dos átomos que compõe o sólido[21].

Sistema de cristalização	Eixos	Ângulos entre os eixos
Cúbico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Ortorrômbico	$a \neq b \neq c \neq a$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$
Romboédrico ou Trigonal	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
Monoclinico	$a \neq b \neq c \neq a$	$\alpha = \gamma = 90^\circ; \beta \neq 90^\circ$
Triclínico	$a \neq b \neq c \neq a$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma$ (todos $\neq 90^\circ$)

Tabela 3.1 Simetrias das células unitárias[22].

Estes sete tipos de simetria podem gerar quatorze tipos diferentes de estruturas denominadas redes de Bravais como mostrado na tabela 3.8

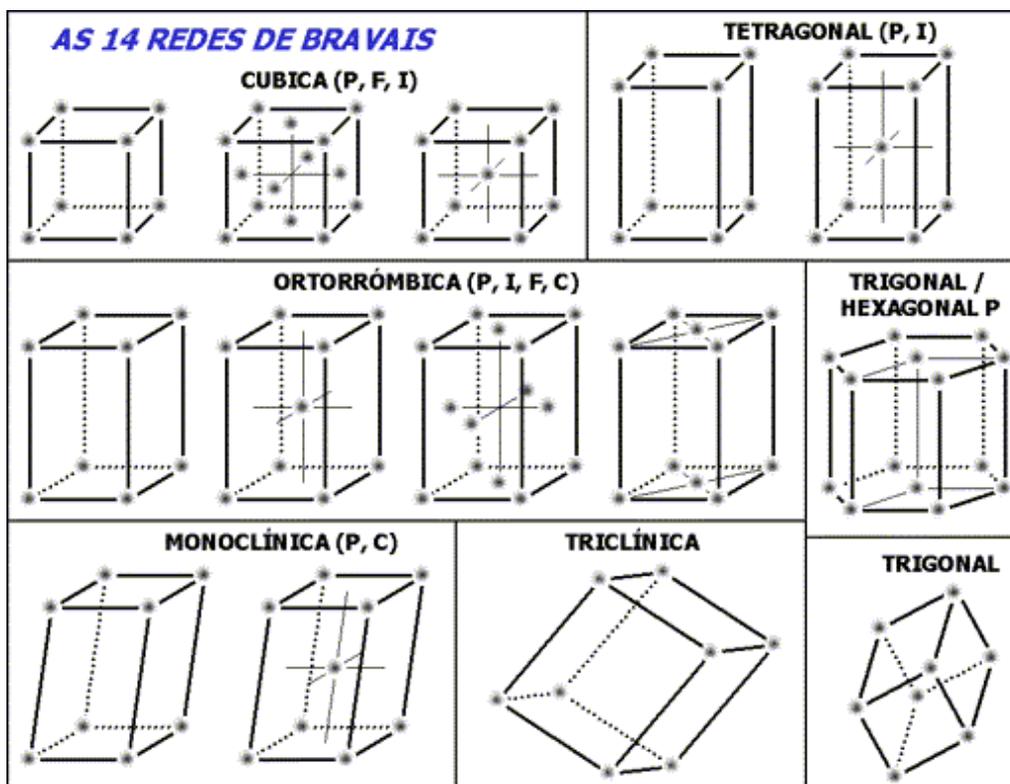


Figura 3.9 Redes de Bravais[22].

3.6.4 PLANOS CRISTALOGRÁFICOS

Com exceção do sistema hexagonal todos os sistemas cristalinos tem seus planos especificados por três índices de Miller (hkl). Quaisquer 2 planos paralelos entre si são equivalentes e têm índices idênticos. O procedimento empregado na determinação dos números dos índices h , k e l é o seguinte:

1. Partindo-se de um sistema de três eixos ortogonais (x, y, z) representa-se a célula unitária. Os planos que delimitam a célula unitária podem ou não cortar os eixos de referência.
2. Assim, ou o plano cristalográfico intercepta ou ele é paralelo a um dos três eixos; o comprimento da interseção planar a cada eixo é determinado em termos dos parâmetros da rede a , b e c .

3. Calcula-se os recíprocos dos números a, b e c . Um plano paralelo a um eixo pode ser considerado como tendo uma interseção no infinito, e, portanto, um recíproco igual a zero.

4. Estes três números são mudados para resultarem em um conjunto de menores inteiros pela multiplicação ou divisão por um fator comum.

5. Finalmente, os índices inteiros, serão os índices de Miller (hkl) do plano.

Uma interseção no lado negativo da origem é indicada por uma barra ou sinal de menos posicionado sobre o índice apropriado. Além disso, a inversão das direções de todos índices especifica um outro plano, que é paralelo e esta do lado oposto e de maneira equidistante à origem. Uma característica interessante e exclusiva dos cristais cúbicos é que planos e direções tendo os mesmos índices são perpendiculares entre si; entretanto, para outros sistemas cristalinos não existem relações geométricas simples entre planos e direções índices iguais[20].

3.6.5 CRISTALIZAÇÃO DE MOLÉCULA BIOLÓGICA

A cristalização de molécula biológica, como qualquer cristalização, é um processo de múltiplos parâmetros, que envolve os três passos clássicos da cristalização, que são: nucleação, crescimento e cessação de crescimento. A nucleação é a formação dos primeiros agregados ordenados da substância e requer uma supersaturação da solução, ou seja, é preciso usar mais substância a ser cristalizada do que a condição de equilíbrio com solvente no qual ela esta diluída. “Quanto maior a supersaturação, o mais rápido desta fase sólida é exibida. No entanto, a precipitação muito elevada impede a cristalização”[2]. A fase de nucleação é a mais estudada, pois é neste momento que o cristal começa a se formar. Dois tipos diferentes de nucleação podem ser distinguidos, a nucleação homogênea, quando o início da cristalização ocorre intrinsicamente no interior da solução e a nucleação heterogênea, quando os núcleos se formam na presença de um substrato. Esta fase é seguida pelo crescimento, onde o cristal aumenta de tamanho e define sua estrutura cristalográfica. A cessação de crescimento de uma macromolécula biológica pode ter diversas causas, desconsiderando as triviais, como remoção da

macromolécula do meio de cristalização, temos causas tais como, defeitos de crescimento, envenenamento das faces, ou envelhecimento da macromolécula. O que faz com que o processo de cristalização de macromoléculas biológicas seja diferente é que o mesmo envolve um número de parâmetros, muito maior do que aquele envolvido no crescimento de cristais de pequenas moléculas, e as propriedades físico-químicas peculiares destes compostos. Por exemplo, a estabilidade ótima das macromoléculas biológicas em um meio aquoso está restrita a uma faixa estreita de pH. Mas a principal diferença entre crescimento de cristais de pequenas moléculas e cristais de macromoléculas biológicas é a flexibilidade conformacional e a versatilidade química dessas macromoléculas e, conseqüentemente, sua maior sensibilidade às condições externas. Para um planejamento racional das condições de cristalização é necessário o controle dos parâmetros físicos e biológicos[2]. Os cristais de macromoléculas são muito diferentes dos cristais de moléculas inorgânicas ou pequenas, devido à sua natureza. Cristais inorgânicos possuem forças significativas de interação, o que lhes proporciona uma maior dureza e resistência, assim como a ordem interna, pode ser exposto ao ar e são facilmente manipulados. Por outro lado, os cristais de proteína são compostos de proteínas no estado nativo, que são solvatadas pela solução, assim entre 25 % e 90 % do cristal compreende solvente. Os cristais são frágeis, sensíveis à desidratação e à temperatura, eventualmente, são danificados após a exposição prolongada à radiação. No entanto, a solvatação dos cristais de proteínas também é responsável pela utilidade da cristalografia de raios x em macromoléculas, permitindo que estas, sendo cercadas por camadas de água, mantenham uma estrutura semelhante a esperada em solução, conseqüentemente, os mecanismos de ligação, as propriedades enzimáticas e espectroscópicas e outras características bioquímicas são as mesmas dos cristais de biomolécula em solução[23]. Muitos desafios existem neste ponto, pois a cristalização de macromoléculas biológicas é muito delicada, possuem ligações fracas como as ligações de hidrogênio e possuem também uma grande quantidade de solvente. Cristais de proteínas podem ter conteúdo de solvente de até 75 % do volume em alguns cristais, como da Purina Nucleosídeo Fosforila humana[24]. Por esta razão, os cristais de macromoléculas biológicas devem ser mantidos em um ambiente saturado de solvente, caso contrário, a desidratação conduzirá à quebra destas

ligações fracas e, conseqüente, a destruição dos cristais[25]. Uma outra característica dos cristais de macromoléculas biológicas são as grandes dimensões de suas celas unitárias, se comparadas com as dimensões das celas unitárias das pequenas moléculas. Cristais de macromoléculas biológicas podem ter parâmetros de cela unitária de até algumas dezenas de milhares de ângstrons[26].

A resolução da estrutura tridimensional de proteínas, por meio da técnica de cristalografia por difração de raios x gerou uma grande quantidade de informação estrutural sobre as proteínas. Na tentativa de armazenar a estrutura dessas proteínas foi criado em 1977 uma base de dados. Essa base de dados chamada *Protein Data Bank* (PDB), armazena as coordenadas atômicas de quase todas as proteínas e outras macromoléculas biológicas determinadas até hoje. Tal base de dados é disponibilizada no *site* www.rcsb.org/pdb . O acesso é público o que propiciou a disseminação das informações contidas no site. Para preservar os autores de estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas o PDB permite que as coordenadas atômicas sejam depositadas e só liberadas após um ano, o que, normalmente, é tempo suficiente para a publicação do artigo científico descrevendo a estrutura[26].

4 O FENÔMENO DA DIFRAÇÃO

A difração ocorre quando uma onda encontra uma série de obstáculos capazes de dispersar a onda, e possuem fendas ou espaçamentos comparáveis em magnitude ao comprimento de onda[20]. As ondas espalhadas podem sofrer interferências construtivas ou interferências destrutivas. Nas interferências construtivas suas amplitudes são somadas e elas se reforçam mutuamente, já nas interferências destrutivas as amplitudes correspondentes se cancelam ou se anulam mutuamente. Interações parciais também podem ocorrer.



Figura 4.1 Imagem de uma onda plana espalhada por um obstáculo ou um orifício com dimensões comparáveis ao comprimento de onda[27].

O efeito da difração é observado facilmente em ondas onde o comprimento de onda é grande, porém na radiação eletromagnética onde os comprimentos de ondas são pequenos, somente obstáculos ou fendas pequenas geram espalhamento observável.

4.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os Raios x possuem altas energias e tem comprimentos de onda que vão de 0,05 ângstrom (5×10^{-10} m ou 5 pm) até dezenas de ângstroms (nm). Quando um feixe de raios x incide sobre um material sólido, uma porção deste feixe é espalhada em todas as direções pelos elétrons associados com cada átomo ou íon que fica no caminho do feixe. Os raios x ao atingirem um obstáculo podem ser espalhados elasticamente sem perda de energia pelos elétrons de um átomo, isto é chamado de espalhamento elástico. Após a colisão, o fóton de raios x muda sua trajetória, no entanto, mantém a mesma fase e energia do fóton incidente. Se os átomos (obstáculos) que geram este espalhamento estiverem em uma estrutura com distâncias regulares (cristalina) apresentando entre eles distâncias próximas ao do comprimento de onda da radiação incidente, verifica-se que as relações de fase entre os espalhamentos tornam-se periódicas e efeitos de interferência construtiva podem ser observados em vários ângulos. A figura 4.2 ilustra a difração resultante de um feixe de raios x com vários comprimentos de onda, à semelhança da luz branca, incidente em um monocristal. Os pontos na tela correspondem a planos cristalográficos que satisfazem a lei de Bragg[25].

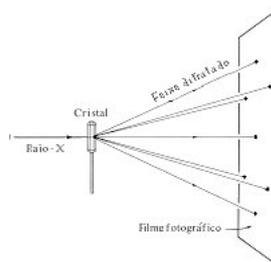


Figura 4.2 Imagem da difração de raios x[28].

As figuras 4.3 são uma ilustração da lei de Bragg que está descrita na secção 4.3

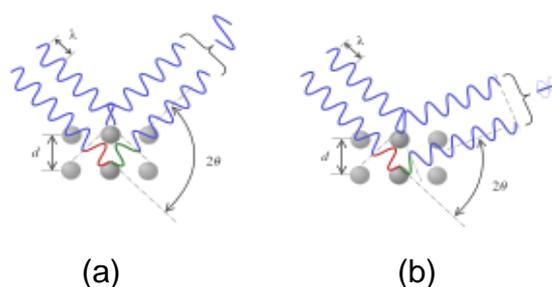


Figura 4.3 Diagrama da Lei de Bragg, (a) Interferência construtiva. (b) Interferência destrutiva. [22]

4.2 DIFRAÇÃO DE ELÉTRONS

A Física como outras ciências, se utiliza de modelos para explicar os fenômenos naturais. Em torno do século XX, o modelo clássico da física em relação ao comportamento da matéria e das ondas, divergia em resposta a diversos experimentos. Alguns novos modelos foram propostos para adequar este modelo clássico a uma nova realidade. Um dos modelos foi proposto por Louis de Broglie, sobre a existência de ondas de matéria. O caráter ondulatório do elétron foi detectado pela demonstração de que eles podem ser difratados. Durante os experimentos, um feixe de elétrons foi direcionado sobre um monocristal de níquel, e percebeu-se um padrão de difração como fossem ondas eletromagnéticas. Há, no entanto, diferenças no tratamento a ser dado à difração de raios x e à difração de elétrons. A principal e fundamental diferença resulta do fato do elétron ser uma partícula carregada, podendo receber energia continuamente aumentando-se a voltagem a que estiverem

submetidos, enquanto os fótons (radiação eletromagnética) não possuem carga sendo normalmente geradas pela emissão da radiação característica de materiais, com os tubos convencionais geradores de raios x ou em aceleradores de partículas, como é o caso dos Síncrotrons. Isto faz com que a intensidade espalhada possa ser, no caso dos elétrons, da ordem de 10^4 vezes maior do que para os raios x[29].

4.3 A LEI DE BRAGG

A lei de Bragg foi desenvolvida pelo físico Sir William Lawrence Bragg em 1912 e lhe rendeu o Prêmio Nobel de Física em 1915, quando ele tinha apenas 25 anos. A lei de Bragg pode ser utilizada para se obter o espaçamento de rede de um determinado sistema cristalino. Embora simples, a lei de Bragg confirmou a existência de verdadeiras partículas em escala atômica, bem como o fornecimento de uma nova e poderosa ferramenta para o estudo de cristais na forma de raios x e difração de elétrons. Sabemos que o comprimento de onda dos raios x é muito menor que o da luz visível sendo da ordem de 0,1 nm enquanto que o da luz visível gira em torno de 400 a 500 nm. É muito difícil se construir uma tela com uma ou duas fendas com distâncias tão pequenas. Mas para a distância ser desta ordem de grandeza temos que falar de um arranjo no qual os centros espalhadores são átomos formando um cristal. Analisando este tipo de cristal percebemos que eles possuem átomos espaçados regularmente e quando um feixe de radiação incide sobre estes átomos ocorre o fenômeno do espalhamento da onda. Na prática podemos imaginar que os elétrons do átomo onde a onda incide vão absorver a energia da onda e depois transmití-la com a mesma frequência que eles receberam. Existem centros espalhadores em um cristal que refletem a energia das ondas incidentes e estas ondas só estarão em fase se o caminho óptico percorrido por cada uma delas for o mesmo, ou for um múltiplo inteiro do comprimento de onda. Para ocorrer interferência construtiva os ângulos de entrada e de saída com a superfície, chamado de teta(θ), devem ser iguais. Se isto ocorrer podemos dizer que os raios difratados em fase resultam em interferência construtiva. Se compararmos os caminhos ópticos dos raios que atingem a camada superficial do cristal com os raios que ultrapassam esta camada

superficial e atingem outro plano espalhador mais abaixo da superfície, podemos perceber que para estes raios que foram espalhados pelos centros espalhadores da primeira camada interferiram construtivamente com os raios que foram espalhados pelos centros espalhadores da segunda camada é necessário que a diferença de caminhos ópticos seja múltiplo inteiro do comprimento de onda. O caminho que o segundo raio percorreu a mais que o primeiro é a soma das distâncias entre os átomos da primeira e da segunda camada. Podemos relacionar esta diferença de caminhos ópticos com o espaçamento d entre os planos, então a diferença de percurso é o dobro do cateto, do triângulo retângulo, formado pelas linhas que evidenciam estes planos e isto pode ser representado por $2d\sin\theta$, lembrando que o ângulo θ se forma entre o raio incidente e a superfície dos átomos do cristal. Então para que haja interferência construtiva é necessário que esta diferença de caminhos ópticos seja um múltiplo inteiro do comprimento de onda da radiação. Acrescentando esta informação a nossa equação teremos $2d\sin\theta = n\lambda$. Teremos interferência construtiva para vários valores de n diferentes, por exemplo, $n=1$, $n=2$, etc. Em geral só o $n=1$ tem importância, pois os outros máximos são muito menores que o primeiro e este primeiro é chamado de primeiro máximo de Bragg e para ele teremos a relação $2d\sin\theta = \lambda$. A identificação da presença deste máximo é que finalmente levou à conclusão que o raio x é uma radiação eletromagnética e caracteriza um fenômeno ondulatório. Para alguns cristais é relativamente fácil medirmos o espaçamento entre os planos espalhadores(d), mas para estruturas cristalinas desconhecidas, isto não é tão simples, pois, elas podem possuir vários conjuntos de planos espalhadores. A utilização da relação de Bragg para a caracterização de novos materiais foi uma técnica que possibilitou a identificação, em 1953, por Watson e Crick, de uma estrutura biológica extremamente importante, o DNA. Esta técnica serve para a identificação de novos materiais, para a aplicação fundamental em física, como também para a identificação de estruturas de interesse biológico.

Considerando que os materiais sólidos cristalinos podem ser representados por arranjos de pontos regularmente distribuídos em três dimensões do espaço, a periodicidade do cristal faz com que existam planos separados por distâncias fixas (d_{hkl}) em diferentes direções (θ_{hkl}). A relação entre estrutura cristalina e a

condição para ocorrer difração é definida pela equação, conhecida como lei de Bragg :

$$n\lambda = 2 d_{hkl} \text{sen}\theta_{hkl}$$

onde, $n\lambda$ = número inteiro de comprimento de onda, d_{hkl} = distância interplanar e θ_{hkl} = ângulo de Bragg. Conhecendo um pouco de trigonometria podemos ver, na figura, que a diferença de caminhos é $2d\text{sen}\theta$, onde θ é o ângulo entre a direção dos raios x e o plano de átomos do cristal. A interferência será construtiva e, portanto, haverá um feixe difratado apenas no caso em que essa diferença de caminhos for um número inteiro de comprimentos de onda do raios x, isto é, se $2d\text{sen}\theta = n\lambda$ (n = inteiro), haverá um feixe difratado[25].

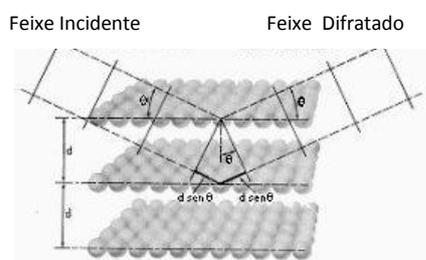


Figura 4.4 Imagem representando a lei de Bragg[66].

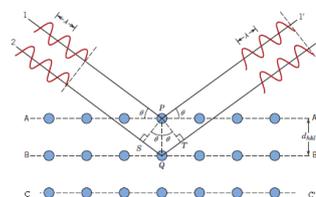


Figura 4.5 Relação entre comprimento de onda, espaçamento interplanar e ângulo de difração para interferência

A difração de elétrons ocorre em ângulos muito pequenos, consequência do pequeno comprimento de onda do elétron ($\lambda=0,0417\text{Å}$ para 80keV). Por isso os planos difratantes são quase paralelos ao feixe primário.

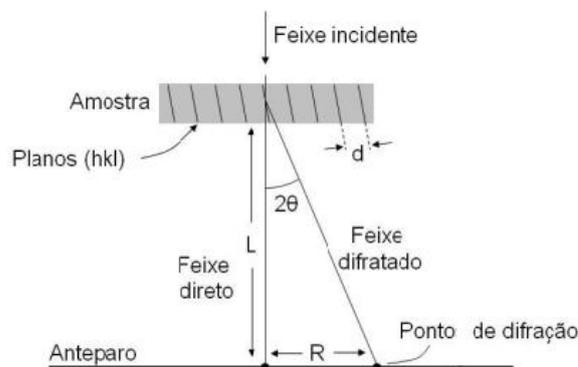


Figura 4.6 Diagrama esquemático da relação entre o espaçamento R de pontos de difração e o comprimento de câmera L [30].

A figura 4.6 mostra uma seção longitudinal contendo um feixe primário, o feixe difratado, a amostra, a tela da imagem e o ângulo de Bragg em tamanho exagerado e o ângulo difratante 2θ . L é a distância entre a amostra e a placa fotográfica (comprimento de câmara) e R é a distância sobre a placa, entre o feixe direto transmitido e um ponto de difração.

Analisando a figura 4.6 vemos que:

$$\mathit{tg}\theta = R/2L$$

Como temos um valor muito pequeno para θ , segue-se que

$$\theta = R/2L$$

Então podemos reformular a Lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \mathit{sen} \theta = 2d\theta = 2dR/2L$$

Se $n=1$, temos:

$$\lambda L = R \cdot d$$

5 INTERPRETANDO UMA IMAGEM DE DIFRAÇÃO DE ELÉTRONS

Quando analisamos um cristal devemos levar em consideração que em cada cristal temos a rede direta associada a rede recíproca. O fenômeno da difração está intimamente ligado à rede recíproca do cristal. Para estudarmos o arranjo de átomos que constituem uma determinada amostra é muito importante que esta amostra possua uma regularidade na distribuição espacial de seus átomos, formando cristais. Isto possibilitará a utilização da técnica de difração, tanto de raios x como de elétrons. Na difração de elétrons, realizada nos vários tipos de Microscópios Eletrônicos, os elétrons incidem sobre a amostra que queremos estudar, na forma de um feixe denominado de feixe incidente. Quando este feixe encontra a amostra, seus elétrons podem ser espalhados pelos elementos constituintes da amostra, que funcionam como um centro espalhador, formando assim um conjunto de feixes difratados que serão refletidos em uma tela[29].

5.1 PONTOS BRILHANTES “SPOTS”

Analisando a imagem de difração, percebemos alguns pontos brilhantes distribuídos por toda a chapa fotográfica. Estes pontos que surgem na tela são resultados do fenômeno, já descrito anteriormente, denominado difração. A este conjunto de pontos brilhantes dá-se o nome de padrão de difração, sendo o brilho destes pontos proporcional à intensidade do correspondente feixe difratado

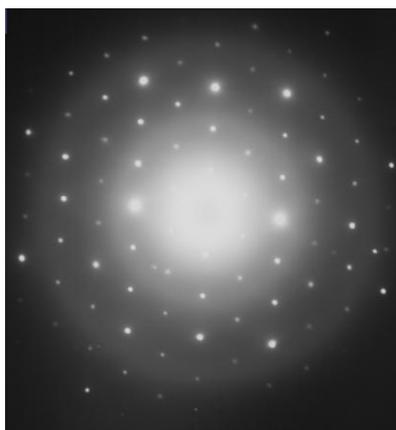


Fig.5.1 conjunto de pontos ("spots") brilhantes resultantes da difração de elétrons de uma amostra contendo Lisozima.

O padrão de difração projetado na tela, como o mostrado acima, e esquematizado na figura 4.2, fornece algumas informações sobre a distribuição espacial dos centros espalhadores dos elétrons e sobre a simetria do arranjo periódico dos átomos. Sendo uma figura de difração, este padrão corresponde à rede recíproca do arranjo periódico da rede cristalina da superfície, esta última correspondendo à rede direta. Não é possível, no entanto, exclusivamente a partir de um padrão como o da Fig. 5.1, determinar as posições atômicas na célula unitária, nem é possível obter informações sobre as distâncias interplanares da amostra, no entanto a disposição dos “spots” pode nos dar pistas sobre a geometria do cristal analisado.

5.2 ESFERA DE EWALD

Quando a condição de Bragg para a difração é satisfeita existe uma maneira de representá-la utilizando uma construção geométrica denominada esfera de Ewald, desenvolvida por Paul Peter Ewald (1888-1985), um dos pioneiros nos métodos de determinação de estruturas por difração de raios x.

Esta esfera estabelece todas as possíveis direções que os feixes incidentes podem ser difratados por um cristal identificando graficamente pontos da rede recíproca relacionada à difração em uma determinada direção[31].

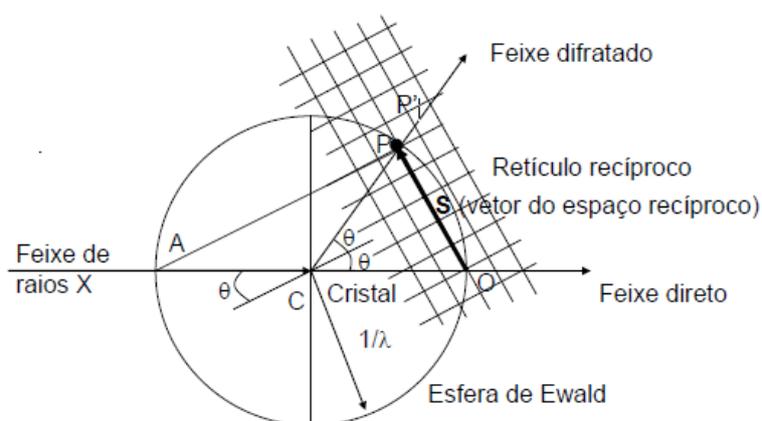


Figura 5.2 Esfera de Ewald incluindo os feixes: incidente e difratado cujo módulo corresponde ao raio da esfera ($1/\lambda$). O vetor \mathbf{S} será um vetor da rede recíproca quando $|\mathbf{S}| = 1/d_{hkl}$, onde d_{hkl} = distância interplanar[31].

5.3 ESPAÇO RECÍPROCO

Espaço recíproco é um recurso matemático que auxilia na interpretação do processo de difração, podendo ser definido como um conjunto de pontos, cada um determinado considerando-se as normais a todos os planos (h,k,l) saindo de um ponto 0, considerado como origem, onde as normais se encontram, a uma distância $1/d_{hkl}$, este conjunto de pontos formam o espaço recíproco.

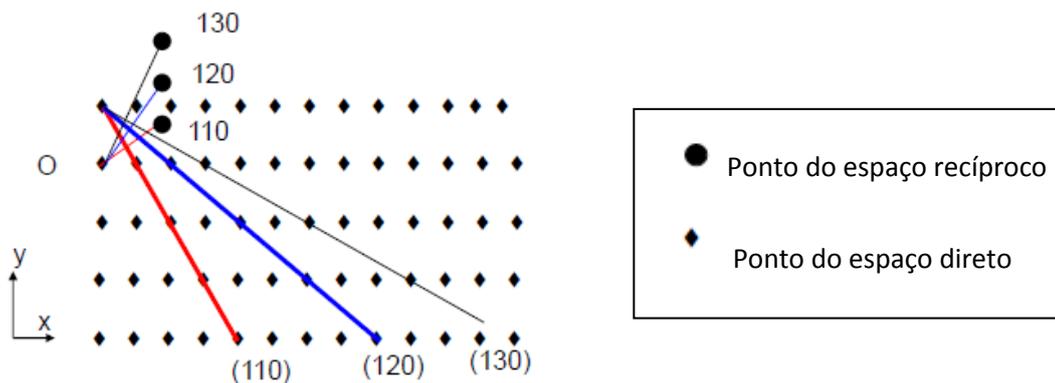


Figura 5.3 Representação dos planos (110), (120) e (130), considerando-se uma origem arbitrária, indicada por O traça-se um vetor perpendicular aos planos com tamanho $1/d_{hkl}$, assim temos os pontos do espaço recíproco no final desse vetor. Assim para cada família de planos paralelos do espaço direto temos uma correspondência com pontos do espaço recíproco[31].

Ao observarmos a difração de elétrons, devemos entender que cada “spot” é gerado a partir de família de planos de um cristal que se difratou, obedecendo à lei de Bragg. Na amostra, o espaço onde se encontram os planos é denominado espaço direto. Os pontos que aparecem na chapa fotográfica são pontos do espaço recíproco.

Na figura 5.3 são mostrados vários planos do espaço direto relacionados com pontos do espaço recíproco. Os planos do cristal estão identificados pelos índices de Miller (hkl). Conhecendo os índices de Miller e os parâmetros da célula unitária encontrados na literatura, é possível calcular a distância entre os diferentes planos que formam o cristal.

5.4 ÍNDICES DE MILLER

Ao analisamos um cristal percebemos que eles podem ter dimensões e formas características. Cada cristal pode possuir várias faces ou planos e a orientação destas faces pode ser usada para determinar o sistema cristalino e a simetria do cristal.. A orientação de uma superfície ou de um plano de cristal pode ser definida, considerando onde o plano intersecta os eixos do cristal. A aplicação de um conjunto de regras leva à atribuição dos índices de Miller, que são

normalmente denominados pelas letras h , k , l e são usados para identificar o plano ou a superfície. Os índices de Miller são uma notação utilizada em cristalografia para ordenar e definir a orientação de um plano do cristal com seu respectivo eixo cristalográfico. Podemos dizer que os índices de Miller é o método convencional para definir planos e direções em um cristal. Os índices de Miller são usados para especificar a orientação e o afastamento de um conjunto de planos paralelos[32].

Para determinação os índices de Miller a partir de um retículo cristalino o conjunto de planos paralelos pode ser representado por um conjunto de números inteiros, assim determinados:

1. Encontre a intersecção do plano de interesse com os eixos da rede.
2. Expresse estas intersecções em unidades de cada parâmetro de rede e ache o inverso, assim: $1/d$ (parâmetro de rede) equivalerá a 1 e $\frac{1}{2}d$ corresponderá a 2 .

Estes números inteiros serão os índices de Miller dos planos paralelos. Os índices de Miller são normalmente denominados pelas letras h, k, l [31].

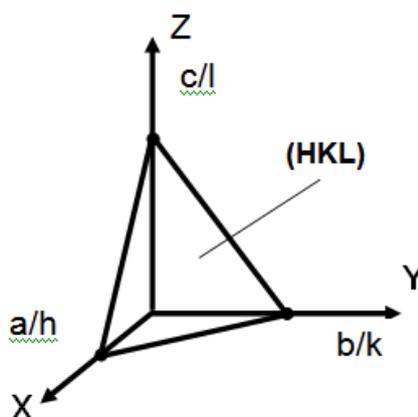


Figura 5.4 O plano que corta os eixos em a/h , b/k e c/l é o plano (HKL) normalizado.

Para calcularmos as distâncias interplanares (d_{hkl}), ou seja, as distâncias que separam os planos atômicos que formam o cristal e que difrataram, precisamos conhecer os parâmetros da célula unitária do cristal e os índices de Miller (hkl) associados aos planos cristalográficos responsáveis pela difração. Para realizarmos estes cálculos precisamos utilizar fórmulas específicas para cada

sistema cristalino. No caso da estrutura ortorrômbica como é o caso específico da lisozima, utilizaremos a equação:

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}$$

Equação 1 Fórmula para cálculo das distâncias interplanares em uma estrutura ortorrômbica.

6 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A determinação de estrutura de proteínas normalmente é realizada utilizando-se a difração de raios x e requer cristais maiores do que 500nm[33]. A obtenção de cristais, com qualidade cristalina adequada nestas dimensões, nem sempre é possível e normalmente requer longos tempos e inúmeras tentativas[34,35]. As técnicas de microscopia eletrônica tem sido desenvolvidas com recursos para rotação e detecção que permitem a caracterização cristalográfica de cristais com dimensões menores do que 500nm[33,35,36].

A técnica de Difração por Área Seleccionada possibilita a escolha de regiões selecionadas com base nas imagens por absorção em difração. Este recurso não disponível na difração de raios x o que torna o uso de difração de elétrons especialmente interessante para caracterização de cristais em escala sub-micrométrica.

Outro aspecto relevante no uso de difração de elétrons é a possibilidade de variação contínua do comprimento de onda dos elétrons. Para a análise de proteínas quando utiliza-se, por exemplo, 80keV teremos comprimentos de onda de 0,00417nm. A condição de baixos comprimentos de onda aumenta o raio da esfera, que sendo proporcional ao inverso do comprimento de onda, torna a região de ocorrência de pontos de difração praticamente plana. Assim, para os altos parâmetros de rede das proteínas, e reduzidas espessuras cristalinas possibilita a amostragem de um grande número de pontos de difração. Estes aspectos são discutidos em detalhes na referência[37] e também ilustrados em sites como da Universidade de Cambridge[38]. Nestas abordagens a compreensão dos padrões de difração leva a necessidade de considerar-se ordens mais altas das zonas de Laue (High Order Laue Zones) [37,38].

A tese de doutorado de Dylana Georgieva defendida em 2008[2] é uma referência da maior relevância em relação a difração de elétrons em lisozima. Os trabalhos posteriores de D. Georgieva são no desenvolvimento de métodos computacionais para caracterização cristalográfica de proteínas utilizando-se Difração de elétrons. Métodos computacionais tem sido desenvolvidos para otimização da interpretação de resultados de difração de elétrons[33,37], no entanto, este trabalho procura abordar a difração de elétrons em proteínas partindo de conceitos elementares.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 MATERIAIS

7.1.1 MICROSCOPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO (MET)

Um microscópio eletrônico de transmissão consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão cerca de 10⁻⁵ mm Hg. A figura 5.1 mostra a seção esquemática vertical de um aparelho que utiliza 100 kV como diferença de potencial máxima de aceleração do feixe. Um microscópio moderno de transmissão possui cinco ou seis lentes magnéticas, além de várias bobinas eletromagnéticas de deflexão e aberturas localizadas ao longo do caminho do feixe eletrônico. Entre estes componentes, destacam-se os três seguintes pela sua importância com respeito aos fenômenos de difração eletrônica: lente objetiva, abertura objetiva e abertura seletiva de difração. A função das lentes projetoras é apenas a produção de um feixe paralelo e de suficiente intensidade incidente na superfície da amostra. Os elétrons saem da amostra pela superfície inferior com uma distribuição de intensidade e direção controladas principalmente pelas leis de difração impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. Em seguida, a lente objetiva entra em ação, formando a primeira imagem desta distribuição angular dos feixes eletrônicos difratados. Após este processo importantíssimo da lente objetiva, as lentes restantes servem apenas para aumentar a imagem ou diagrama de difração para futura observação na tela ou na chapa fotográfica. Na figura 7.2 é mostrada uma fotografia de um MET. Deve-se finalmente destacar que embora existam em operação alguns aparelhos cuja tensão de aceleração é de 1000 kV, a maioria dos equipamentos utilizados no estudo de materiais (metálicos, cerâmicos e poliméricos) dispõe de tensão de aceleração de até 200kV. Os MET utilizados em biologia (materiais orgânicos naturais) em geral operam na faixa de 60 a 80 keV. Em microscopia eletrônica de transmissão a imagem observada é a projeção de uma determinada espessura do material, havendo

uma diferença com relação ao observado numa superfície. Enquanto que para sólidos amorfos é razoável supor uma distribuição uniforme de elétrons espalhados, para sólidos cristalinos a transparência a elétrons depende das condições de difração que diferem bastante conforme a direção. Quando um feixe de elétrons passa por uma lâmina de material cristalino, somente aqueles planos quase paralelos ao feixe incidente contribuem para a figura de difração. As aplicações do MET vão ganhando espaço com o passar do tempo. Desde a observação de defeitos cristalinos a mais de 40 anos, passando pela observação e análise de defeitos de empilhamento, os quais não podem ser observados com os outros tipos de microscopia até a atual análise cristalográfica de muitas estruturas inorgânicas e orgânicas, este tipo de equipamento tecnológico tem contribuído muito para o desenvolvimento do conhecimento científico.

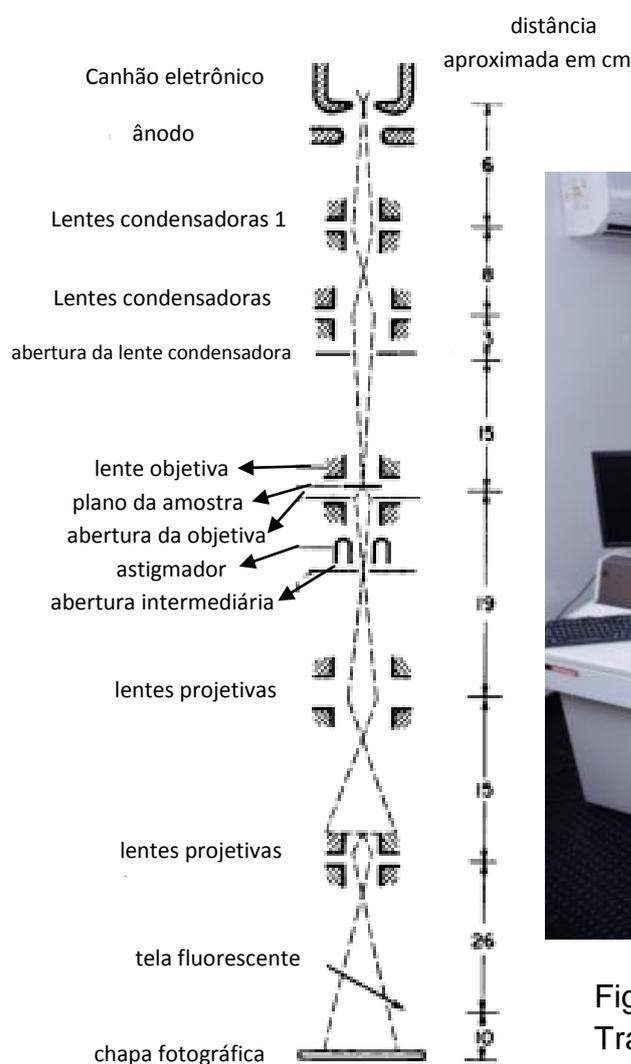


Figura 7.2 Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1200EX-II.(UFPR). Foto: Mariane Mendonça

Figura 7.1 Diagrama esquemático de um MET [5].

Os dados da difração de elétrons, utilizados neste trabalho, foram obtidos no centro de microscopia da UFPR com o Microscópio eletrônico de transmissão (MET), JEOL JEM 1200EX-II. O registro das imagens foi efetuado por meio de chapas fotográficas (Negativos). A calibração das figuras de difração foi realizada através de uma amostra padrão de ouro policristalino, utilizando a energia de 80KeV com comprimento de câmara (L) de 60cm. Em materiais orgânicos em geral opera-se com energias na faixa de 60 a 80keV. Para esta dissertação utilizamos 80keV. Nesta faixa de energia o comprimento de onda, ou seja, o lambda (λ) é de 0,0417ångstrons.

7.1.2 GRADE DE COBRE REVESTIDA COM FILME FINO DE CARBONO BACTERIANO(GC)

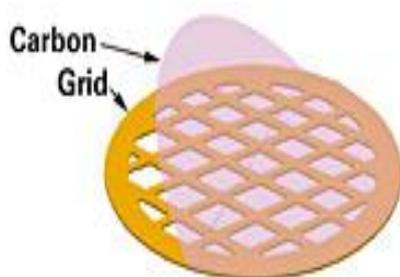


Figura 7.3 Grades de Cobre para MET, modelo mesh 300 , da empresa Electron Microscopy Sciences.

7.1.3 FILME DE CARBONO BACTERIANO

O filme de carbono bacteriano é feito da celulose obtida a partir da bactéria *luconacetobacter xylinus*, do ponto de vista químico, tem a fórmula molecular idêntica à celulose das plantas mas é produzida pura sem a presença de hemicelulose, lignina e pectina que aparecem juntamente com a celulose nas plantas e que exigem tratamento para sua remoção. *G.xylinus* é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Acetobacteriaceae, aeróbia estrita que realiza a oxidação incompleta de diversos açúcares e alcoóis, tendo como habitat natural frutos e vegetais em processo de decomposição. A produção de celulose bacteriana ou biocelulose, por *G.xylinus*, pode ser obtida em laboratório utilizando cultivos tanto em meios sólidos como líquidos, em meio de cultura estática, ou em cultivo agitado, nesse caso com fins biotecnológicos. A composição do meio de cultivo pode variar de acordo com a cepa utilizada no

sistema, sendo o meio basicamente composto de uma fonte de carboidrato (sacarose, glicose, frutose, lactose, manitol), além de extrato de levedura como fonte de nitrogênio (peptona, polipeptona, triptona, etc)[39]. A grade de cobre revestida com filme de carbono bacteriano utilizada neste trabalho é de uso comercial fabricada pela empresa Electron Microscopy Sciences e não passou por nenhuma modificação em laboratório.

7.1.4 PROTEÍNAS

- **LISOZIMA** - Célula unitária: $a=31\text{Å}$, $b=52,5\text{ Å}$, $c=89\text{ Å}$. Grupo orthorrombico: $P 2_12_12_1$
- **CENTRINA** (Bcen3) – *Centri-Melitin*. Grupo orthorrombico: $P2_12_12_1$, célula unitária: $a=52,10\text{Å}$, $b=114,43\text{Å}$ e $c=34,84\text{Å}$, com dados da PDB e publicados em Protein (nov 2011) 79(11) pag 3132-3143 L. del valle Sosa

8 SOLUÇÃO ESTOQUE DE PROTEÍNAS

8.1 LISOZIMA

A liozima utilizada foi a da clara do ovo (Sigma), diluída em água miliQ para concentrações de 10 mM e 10 μ M, com as especificações abaixo:

Liozima da clara do ovo de galinha L86876-pó liofilizado, proteína 90% 040 mil unidades/mg de proteínas. A Liozima é o foco principal desta dissertação.

8.2 PROPRIEDADES DA LISOZIMA

A liozima é uma enzima muito conhecida. Seu peso atômico é de 14,3kDa. Pode ser encontrada na lágrima humana e na clara do ovo. Sua ação rompe a parede celular das células bacterianas atuando assim como um antibiótico natural. A liozima utilizada neste trabalho encontrava-se na forma de pó

dialisado e liofilizado, contendo tampões como acetato de sódio e cloreto de sódio. Apresentava 90% de pureza e encontrava-se armazenada a uma temperatura de -20°C . A empresa fabricante é a Sigma-Aldrich[40] e utiliza como sais tampão:

CLORETO DE SÓDIO(NaCl): Sistema cristalino cúbico de face centrada com parâmetros de célula unitária $a=5,64\text{Å}$

ACETATO DE SÓDIO(CH_3COONa): O acetato de sódio cristaliza sob duas

Formas:

Forma I; orthorrombica com parâmetros de célula unitária $a = 17,850\text{Å}$

$b = 9,982\text{Å}$, $c = 6,068\text{Å}$

Forma II; orthorrombica com parâmetros de célula unitária $a=5,952\text{Å}$, $b=20,213\text{Å}$, $c = 5,902\text{Å}$ [41].

8.3 PROPRIEDADES DA CENTRINA

Centrinas são proteínas ácidas com tamanho aproximado de 20KDa. Em células animais são encontradas normalmente no centrossomo como componente essencial, na segregação cromossômica durante a divisão celular. A Centrina utilizada foi a Bcen3 (*Centri-Melitin*) + $50\mu\text{M}$ de Tris-HCl pH 7.0, contendo 10mM NaCl com simetria $P\ 2_1\ 2_1\ 2_1$ $a=52,10\text{Å}$, $b= 114,43\text{Å}$ e $c=34,84\text{Å}$ orthorrombica com dados da PDB e publicados em Protein (nov 2011) 79(11) pag 3132-3143 L. del valle Sosa.

Além Lisozima e da Centrina utilizamos também a proteína GlinB+50m/M de tris +50m/M de NaCl + 50% Glicerol e a proteína BSA + Água. A proteína GlinB é de difícil cristalização e as amostras que continham esta proteína não apresentaram cristais com qualidade satisfatória para posterior análise. As amostras de BSA apresentaram policristais que não era o foco desta dissertação.

9 MÉTODOS

9.1 DEPOSIÇÃO DAS PROTEÍNAS SOBRE A GRADE DE COBRE (GC).

Nesta etapa utilizamos o método da “gota” que consiste em depositar uma gota de solução sobre papel parafinado, e logo em seguida, colocar a GC sobre a gota aguardando um tempo de crescimento do cristal. Nenhum tratamento especial foi feito sobre a grade de cobre além do revestimento com filme de carbono bacteriano.

A “gota” tinha volume de 30ul, e os tempos de deposição utilizados foram de 5 e 10s. Os tempos, de 5 e 10 segundos utilizados como base neste experimento foram determinados a partir de várias tentativas com tempos menores que 5 segundos e maiores que 10 segundos. Abaixo de 5 segundos nenhum cristal foi detectado na amostra e acima de 10 segundos formava-se uma camada muito espessa de material impossibilitando sua visualização no MET. Tempos intermediários, ou seja, entre 5 e 10 segundos foram desconsiderados por não formarem material com qualidade necessária para a análise no MET. Estes tempos foram determinados no trabalho de Mestrado de Fernanda Pavesi , como citado anteriormente.

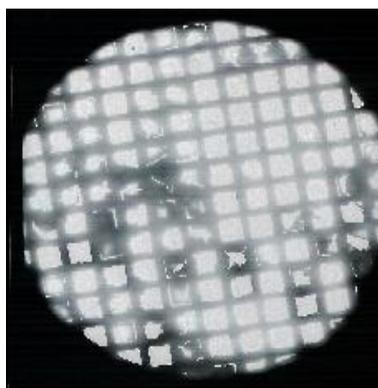
Após o preparo as amostras foram “lavadas”, passando-se a GC em uma gota de 30ul de água miliQ, em seguida o excesso de material foi retirado com papel absorvente pelas bordas da GC.



Figura 9.1 desenho esquemático do método da “gota”

9.2 DIFRAÇÃO POR ÁREA SELECIONADA

A técnica de Difração de área Seleccionada (DAS) permite que pequenas áreas sejam selecionadas durante a análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão. Esta técnica também conhecida por SAD, DAS ou SAED) do inglês, de *selected area diffraction* ou *selected area electron diffraction*), é uma técnica cristalográfica experimental que pode ser realizada em um Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) e foi desenvolvida 1947 por Jan Bart Le Poole. As imagens, neste trabalho, feitas a partir do MET, utilizaram grades de cobre revestidas com filme fino de carbono bacteriano (GC). Analisando a grade de cobre, após a deposição de Lisozima, observa-se que não houve uma distribuição uniforme que cobrisse toda a área com o material depositado.



100µm —

Figura 9.2 Imagem panorâmica de uma Grade de cobre de MET

9.3 ANÁLISE DA DIFRAÇÃO

Após obtermos as imagens impressas em chapas fotográficas analisamos as simetrias da imagem e as distâncias dos pontos de difração ao centro da imagem. Neste trabalho obtivemos as figuras de Difração de cristais obtidos depositando-se, Lysozima e Centrina (Becen3). Seguindo o procedimento descrito anteriormente obtivemos os resultados de difração de monocristais.

De posse da imagem e com uma relação geométrica, definida pela equação $n(\lambda \cdot L) = R_{hkl} \cdot d_{hkl}$ e descrita anteriormente, podemos calcular todos os dados que precisamos para interpretarmos uma imagem de difração de

elétrons. Nesta equação são consideradas as seguintes variáveis: n como sendo um número inteiro associado com a ordem dos picos de difração, λ é o comprimento de onda dos elétrons, e L é a distância equivalente da amostra até a chapa fotográfica, R_{hkl} = distância em milímetros do ponto de incidência do feixe de elétrons na chapa fotográfica até o ponto de difração e d_{hkl} = distância interplanar.

Começamos calculando a distância de cada spot até o centro da imagem. Calculamos também os raios de cada família de spots utilizando para isso o programa ImageJ. Para fazermos este cálculo utilizamos a constante de câmara ($\lambda \cdot L$) de um filme policristalino de ouro padrão, que foi usado para calibrar o MET. O valor desta constante foi determinado antes de iniciar-se uma série de medições, pois esta constante pode sofrer pequenas variações a cada ajuste inicial do microscópio. Conhecendo-se $\lambda \cdot L$ as distâncias interplanares d_{hkl} podem ser determinadas diretamente pela equação, admitindo-se que o feixe incidente coincide com a ordem zero da difração. A ordem zero da difração é normalmente identificada como ZOLD (zero order Laue diffraction) e as ordens mais altas por HOLD (High order Laue Diffraction).

$$d_{hkl} = n \cdot \lambda L / R_{hkl}$$

Após obtermos os valores de R_{hkl} (mm) para uma direção definida (hkl) e das distâncias interplanares (d_{hk}) precisamos indexar os valores (hkl) correspondentes. Para isto utilizaremos os parâmetros de rede da proteína em estudo encontradas no Protein Data Bank (PDB). Os valores referentes aos parâmetros de rede devem corresponder às distâncias interplanares de cada plano (hkl) da célula unitária que compõe o cristal..

O protocolo usual para associarem-se os pontos de difração que correspondem ao espaço recíproco com a estrutura cristalina no espaço real é o seguinte:

1. Inspecciona-se o padrão de difração identificando-se as simetrias, ou seja, verifica-se se a imagem se repete quando giramos de (30° , 60° , 90° , 120° ou 180°) graus.
2. Procura-se os eixos equivalentes (eixos de zona) e para cada um deles procede-se a determinação da distância entre os pontos de difração. Vale notar que eixos paralelos levam a um mesmo valor da distância

entre os pontos, uma vez que representam a mesma família de planos e que estamos aproximando a esfera de Ewald para um plano.

3. Considerando $n = 1, 2$ ou 3 determina-se o valor de d_{hkl} para cada uma das direções equivalentes. Em uma simetria hexagonal deveríamos ter três direções exatamente equivalentes. No entanto, para simetria ortorrômbica quando a relação entre duas arestas for similar a $2\cos(30^\circ) = 1,73$, teremos também simetria de ordem 6 com pequenas distorções.
4. De posse da tabela de Rs (valor médio para cada direção) e dos ds correspondentes, pode-se verificar a consistência destes dados construindo todos os pontos de difração observados e verificando que as relações angulares correspondem aos valores esperados para a estrutura do cristal identificado. Reflexões proibidas devem ser eliminadas.

9.4 INDEXANDO PONTOS DE DIFRAÇÃO EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA COM ALTOS ÍNDICES DE MILLER

Indexar um padrão de difração é, associar um ponto da rede recíproca a cada ponto do padrão de difração. Ao fazer a indexação, podemos reproduzir o padrão de difração obtido experimentalmente com base na estrutura cristalina, para uma dada orientação em relação ao feixe incidente.

Um procedimento padrão é descrito no capítulo 05: The Geometry of Electron Diffraction Patterns do livro: Electron Microscopy of Thin Crystals[37].

A condição de Difração de Laue será:

$h.u + k.v + l.w = N$, onde cada plano do espaço recíproco (uvw) de um conjunto de planos paralelos, pode ser representado para qualquer simetria cristalina por:

$h.u + k.v + l.w = N$, sendo (hkl) qualquer ponto no plano. Assim, para um cristal cúbico, sendo $(uvw) = (111)$, os valores de N serão $0, 1, 2, 3, \dots$. Porém no caso $(uvw) = (211)$. Os valores de N serão $0, 2, 4, 6, \dots$. Se tivermos $(uvw) = (20\ 1\ 1)$ teremos $N = 0, 20, 40, 60, \dots$

Para elétrons de 80keV teremos $\lambda \sim 0,0418$ ângstrons, correspondendo a ângulos de $\sim 0,038^\circ$, para a difração de planos cristalinos separados de 31Å e

$0,013^\circ$ no caso de difração dos planos (00L) correspondentes a distância interplanar de 89\AA como é o caso da Lisozima.

Estes ângulos de fração de grau e grande raio de Ewald ($1/\lambda$) limitam a observação dos picos de difração a valores altos de hkl. A seguir mostra-se a variação da distância interplanar como função da distância dos "spots" ao centro do feixe incidente. O gráfico mostra que distâncias interplanares maiores do que $\sim 2,5$ ângstrons, não são observáveis por estarem na região borrada pelo feixe transmitido. Assim, para os "spots" detectados corresponderem à lisozima estes corresponderão necessariamente a ordens de Laue mais altas.

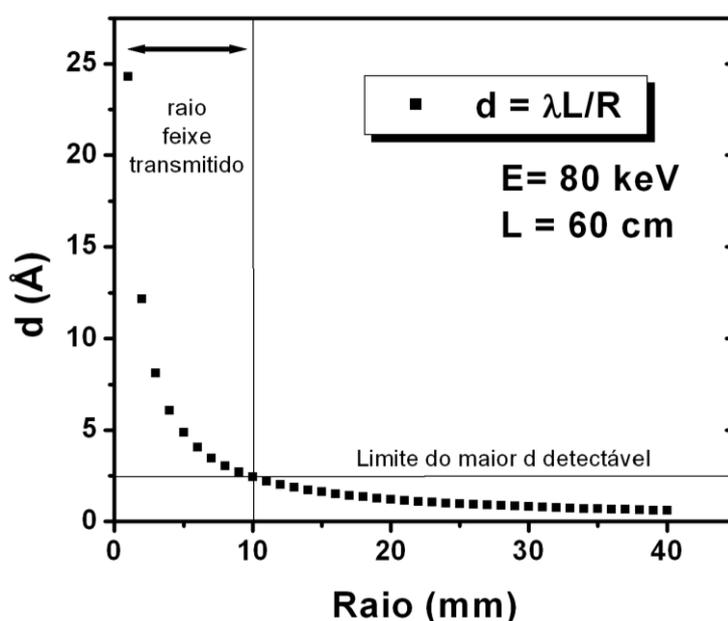


Gráfico 9.1. O gráfico estima qual o maior d possível de se detectar nas condições que foram feitas as medidas. O feixe transmitido apresenta um raio com cerca de 10 mm, portanto a curva calculada para as distâncias interplanares a serem medidas são limitadas superiormente pela interseção da largura da projeção do feixe transmitido com a curva da dependência de d em função do raio, que neste caso fica em torno de 2,5 ângstrons.

Neste trabalho utilizamos a página pessoal de Steffen Weber onde obtivemos as projeções estereográficas referentes a diferentes estruturas da lisozima e da Centrina encontradas na literatura. Observe nas figuras abaixo como a lisozima aparece em uma projeção estereográfica. Supondo a lisozima ortorrômbica com parâmetros de célula unitária de $a=31$ Å, $b=52,5$ Å e $c=89$ Å

com direção de feixe incidente $[0\ 0\ 1]$, $[0\ 1\ 0]$ e $[1\ 0\ 0]$ teremos as seguintes projeções estereográficas respectivamente.

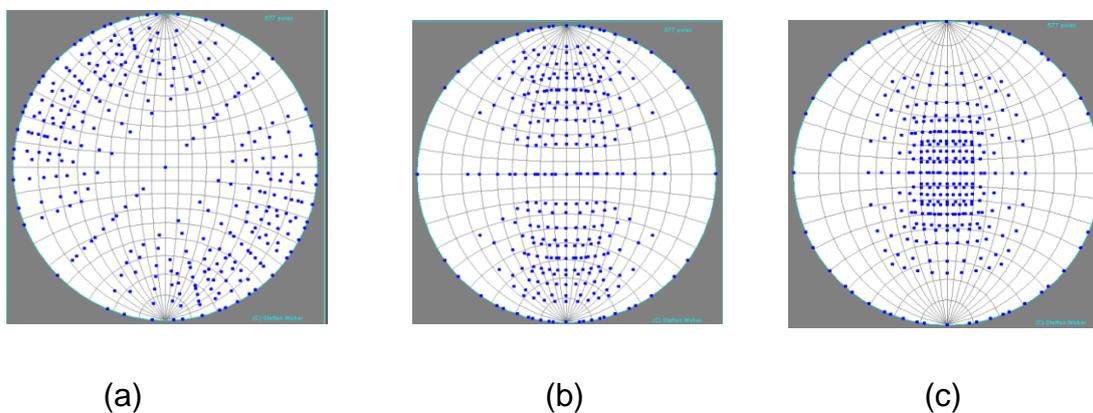


Figura 9.3 (a), (b) e (c), Projeções estereográficas de cristais de lizozima.

Observe nas figuras abaixo como a Centrina ortorrômbica, com parâmetros de célula unitária de $a = 52,10\text{\AA}$, $b = 114,43\text{\AA}$ e $c = 34,84\text{\AA}$ aparece em uma projeção estereográfica. Direção de feixe incidente (a) $[0\ 0\ 1]$, (b) $[0\ 1\ 0]$ e (c) $[1\ 0\ 0]$ teremos as seguintes projeções estereográficas respectivamente[42].

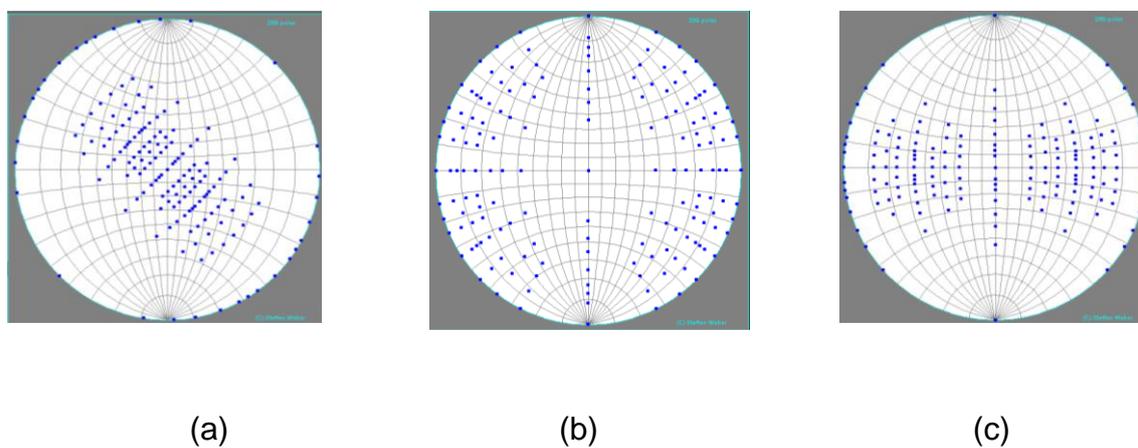
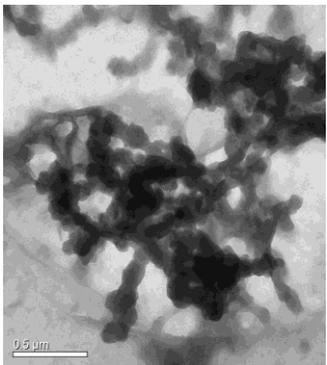
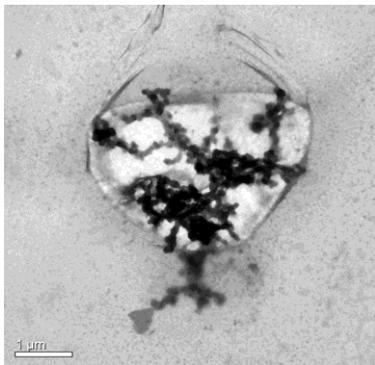
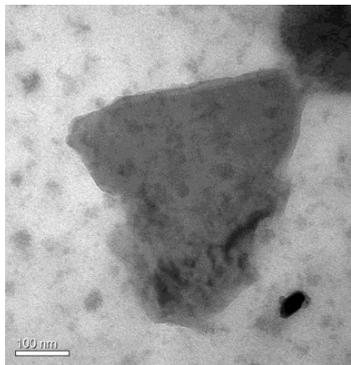
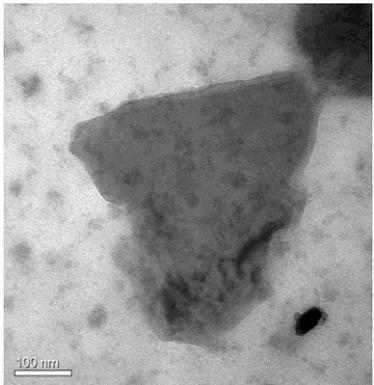
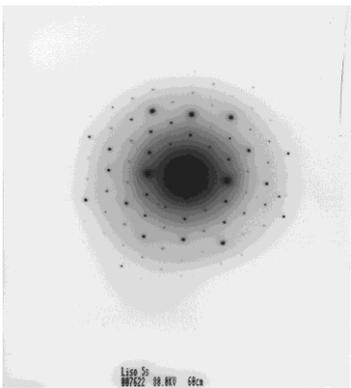


Figura 9.4 (a), (b) e (c), Projeções estereográficas de cristais de Centrina.

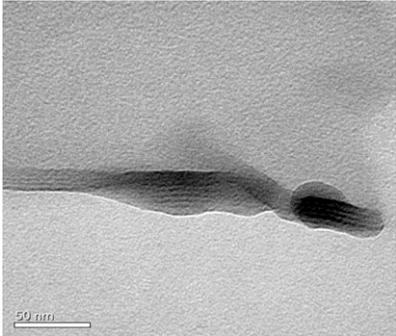
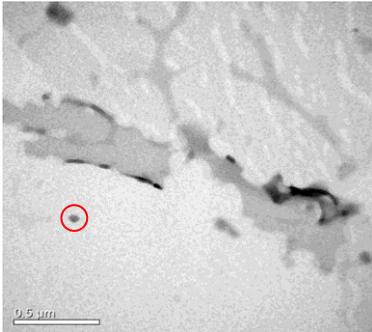
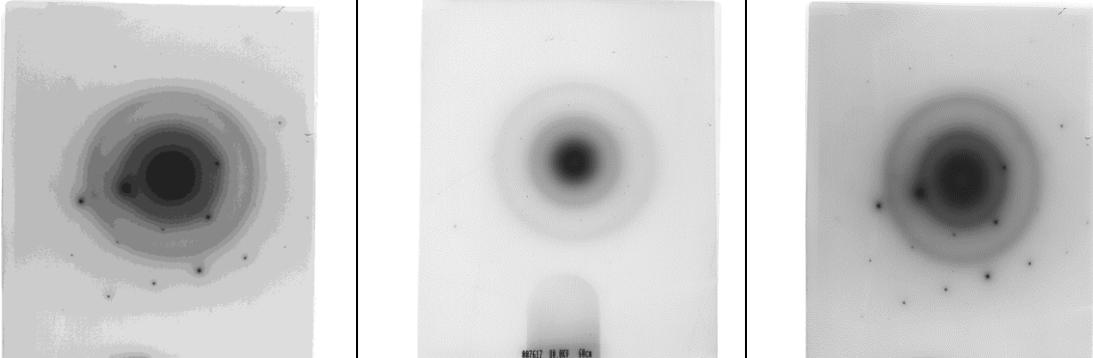
10 RESULTADOS E DISCUSSÕES

10.1 ANÁLISES DE IMAGENS DE MET

- IMAGENS DE LISOZIMA FEITAS NO MET

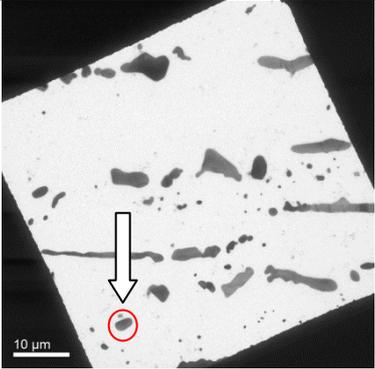
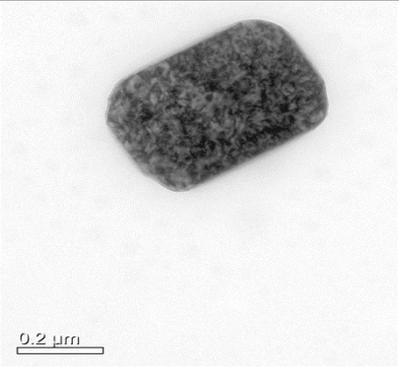
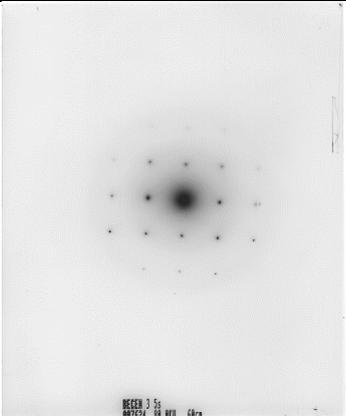
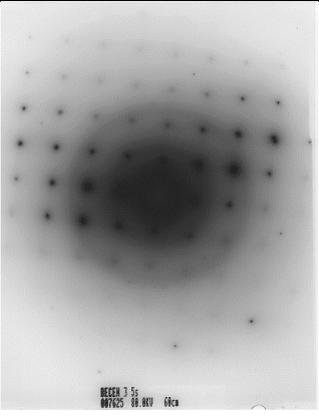
1ª Amostra			
Grades + Proteínas	Concentração (µM)	Volume (µl)	Tempo de exposição(S)
Lisozima+(NaCl)+ (CH ₃ COONa) + água	10	10	5
			
Imagens de uma área selecionada (DAS) na GC,mostrando diferentes aumentos para a solução de Lisozima.			
			
Possível cristal de Lisozima	Difração do cristal ao lado		

Quadro1 Fotografias e imagens de difração da Lisozima da amostra preparada com solução de lisozima a 10µM, com um tempo de deposição de 5s e lavada em água MiliQ.

2ª Amostra			
Grades + Proteínas	Concentração (µM)	Volume (µl)	Tempo de exposição(S)
Lisozima+(NaCl)+ (CH ₃ COONa) + água	10	10	10
 <p>A imagem foi distorcida propositalmente para realçar as franjas que são padrões de interferência do cristal.</p>		 <p>Aumento maior da mesma região.</p>	
 <p>Imagens de difração do cristal destacado acima</p>			

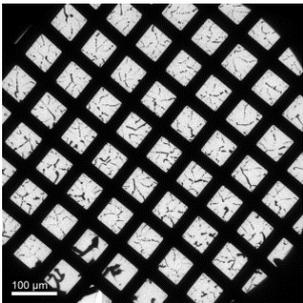
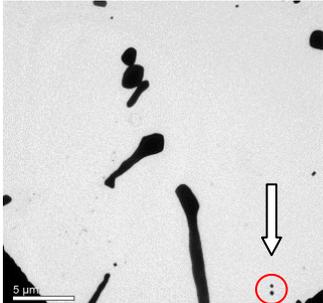
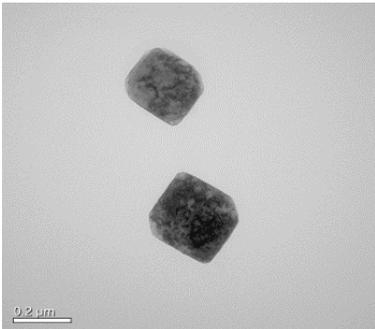
Quadro 2 Fotografias e imagens de difração da Lisozima da amostra preparada com solução de lisozima a 10µM, com um tempo de deposição de **10s** e lavada em água MiliQ. DAS com aumento 500.000 X.

- **IMAGENS DE CENTRINA FEITAS NO MET**

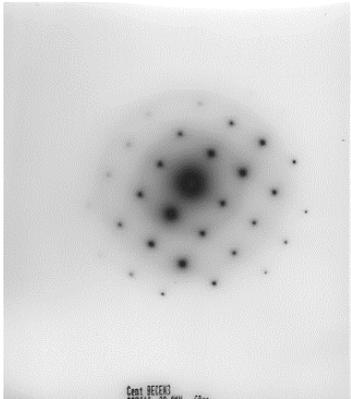
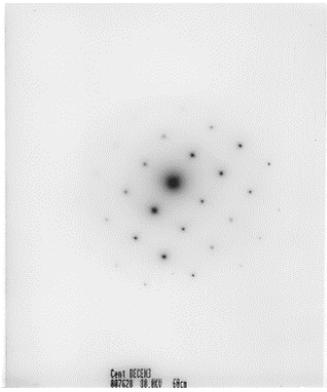
1ª Amostra			
Grades + Proteínas	Concentração (µM)	Volume (µl)	Tempo de exposição(S)
B7 – Centrina Bcen3 + 50µ/M de tris	6	10	5
			
Foto panorâmica de um conjunto de cristais - Aumento 2.000X		Cristal individualizado.	
			
2ª Imagem de difração – negativo 7624 - Aumento padrão – 100.000X		1ª Imagem de difração – negativo 7625 – Aumento padrão – 100.000X	

Quadro 3 Mostra fotografias e imagens de difração da proteína Centrina Bcen3 + 50µ/M de tris com um tempo de deposição de 5s.

2ª Amostra			
Grades + Proteínas	Concentração (µM)	Volume (µl)	Tempo de exposição(S)
B6 – Centrina – Bcen3 + 50µ/M de tris.	6	10	10

A proteína apresentou-se de forma fibrosa por toda a CG. Muitos pontos de difração foram observados. A difração foi feita da parte da imagem que apresentava dois cristais.

	
<p>1ª Imagem de difração Negativo 7619 - Aumento - 100.000X</p>	<p>2ª Imagem de difração Negativo 7620 - Aumento - 100.000X</p>

Quadro 4 Mostra fotografias e imagens de difração da proteína Centrina (Bcen3) + 50µ/M de tris com um tempo de deposição de 10s.

10.2 ANÁLISE DA IMAGEM DE DIFRAÇÃO

- LISOZIMA

Quando analisamos uma imagem de difração devemos ficar atentos à distribuição dos spots ao longo da chapa fotográfica. Comparando esta imagem com as projeções estereográficas formadas pelas proteínas podemos identificar algumas direções em relação ao feixe de elétrons incidente.

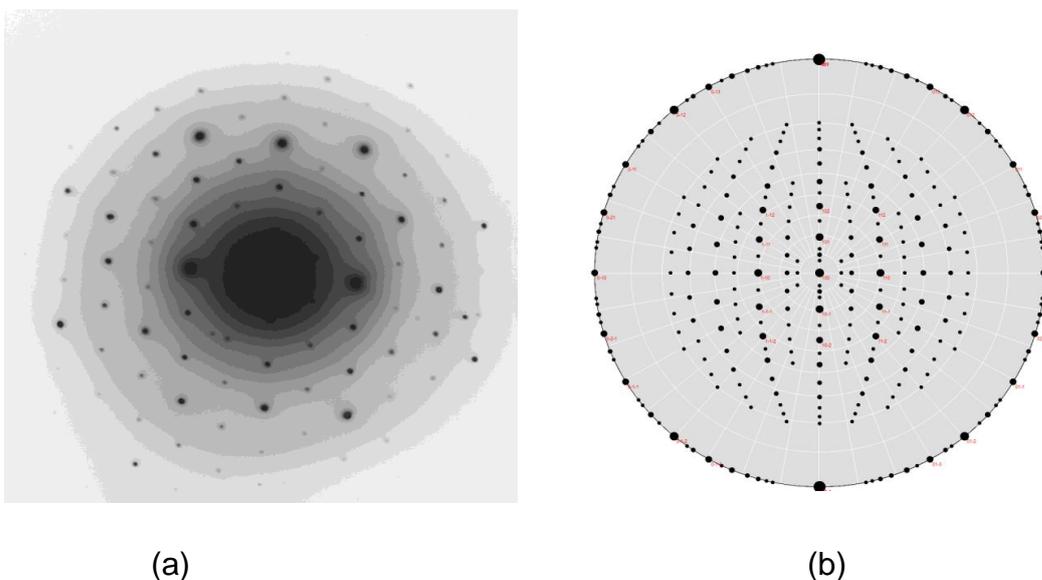


Figura 10.1 (a) Imagem de difração de um possível cristal de Lisozima, (b) projeção estereográfica da Lisozima considerando a direção de incidência $[1\ 0\ 0]$.

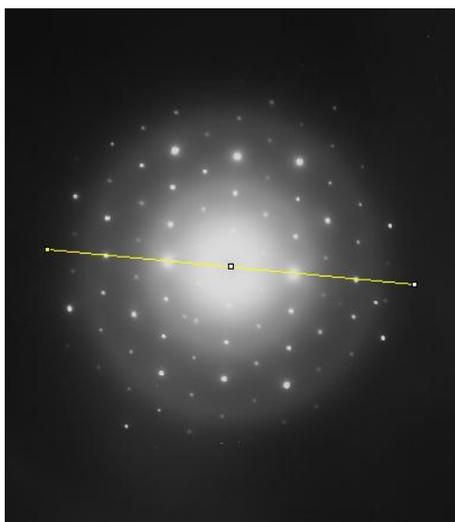


Figura 10.2 Imagem de difração de um possível cristal de Lisozima mostrando a direção $[0\ 1\ 0]$.

Raio(mm)	d (Å)
18,2	1,339
9,11	2,667

Tabela 10.1 Tabela mostrando os spots com os respectivos cálculos dos raios e das distâncias interplanares correspondentes a direção [0 1 0].

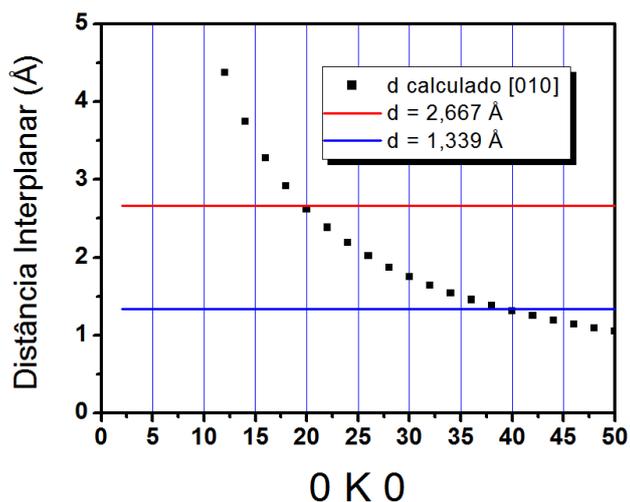


Gráfico 10.1 Relação entre as distâncias interplanares e os planos hkl para a direção [0 1 0] da Lisozima. As distâncias interplanares podem ser calculadas pela equação 1.

Considerando-se agora a direção perpendicular a anterior.

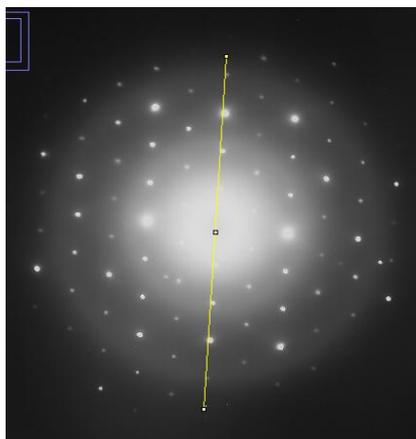


Figura 10.3 Imagem de difração de um possível cristal de Lisozima mostrando a direção [0 0 1].

Raio(mm)	d (Å)
20,96	1,160
15,69	1,550
10,48	2,321
5,23	4,648

Tabela 10.2 Tabela mostrando os spots com os respectivos cálculos dos raios e das distâncias interplanares correspondentes a direção [0 0 1].

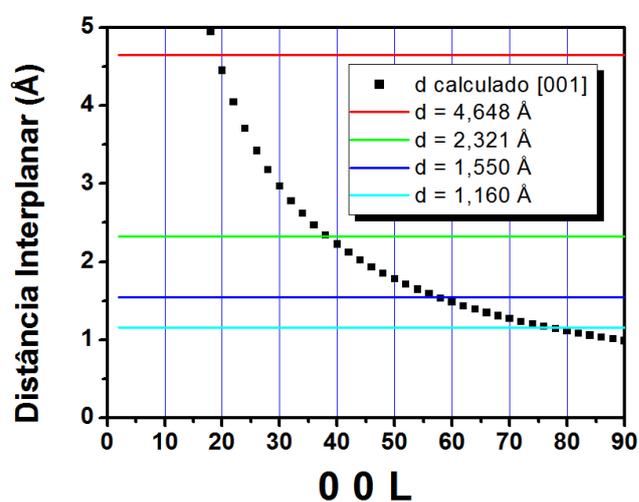


Gráfico 10.2 Relação entre as distâncias interplanares e os planos hkl para a direção [0 0 1] da Lisozima.

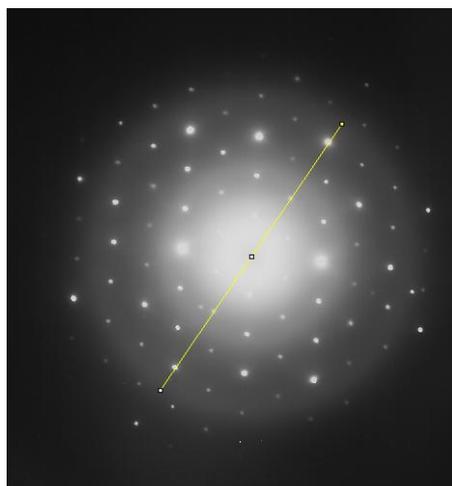


Figura 10.4 Imagem de difração de um possível cristal de Lisozima mostrando a direção [0 1 3].

Raio(mm)	d (Å)
18,7	1,312
9,04	2,693

Tabela 10.3 Tabela mostrando os spots com os respectivos cálculos dos raios e das distâncias interplanares correspondentes à direção [0 1 3].

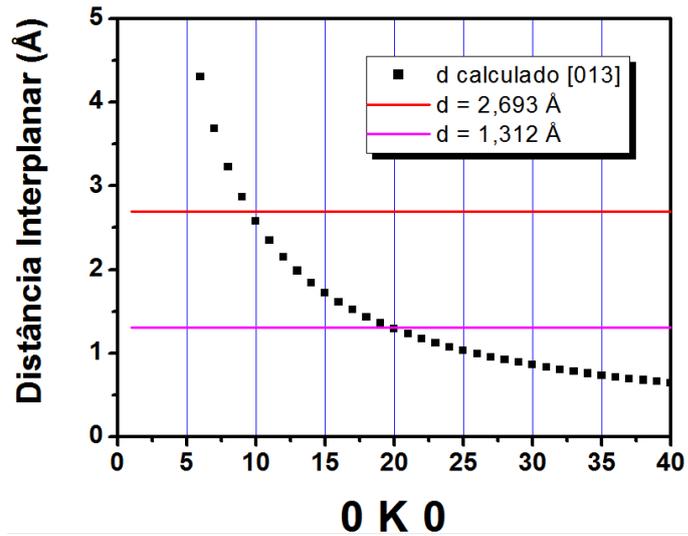


Gráfico 10.3 Relação entre as distâncias interplanares e os planos hkl para a direção [0 1 3] da Lisozima.

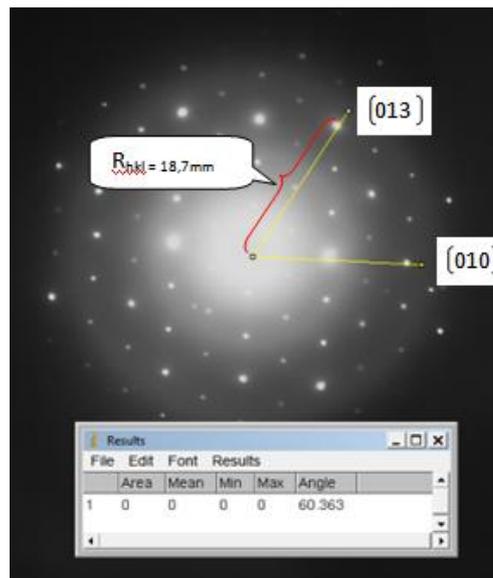


Figura 10.5 Imagem mostrando o ângulo de 60° que a direção [0 1 0] forma com a direção [0 1 3].

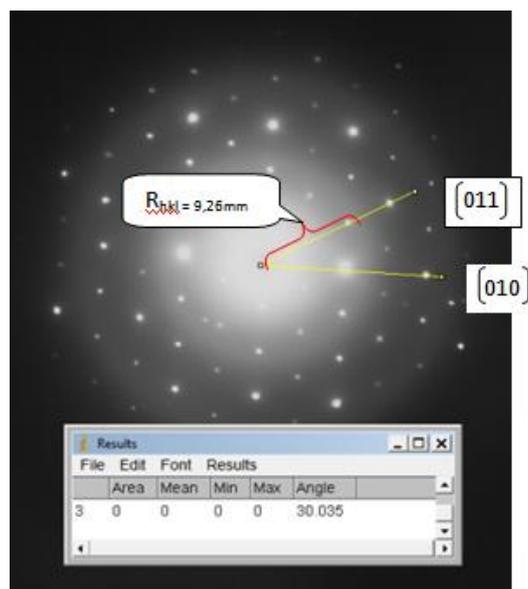


Figura 10.6 Imagem mostrando o ângulo de 30° que a direção $[0\ 1\ 0]$ forma com a direção $[0\ 1\ 1]$.

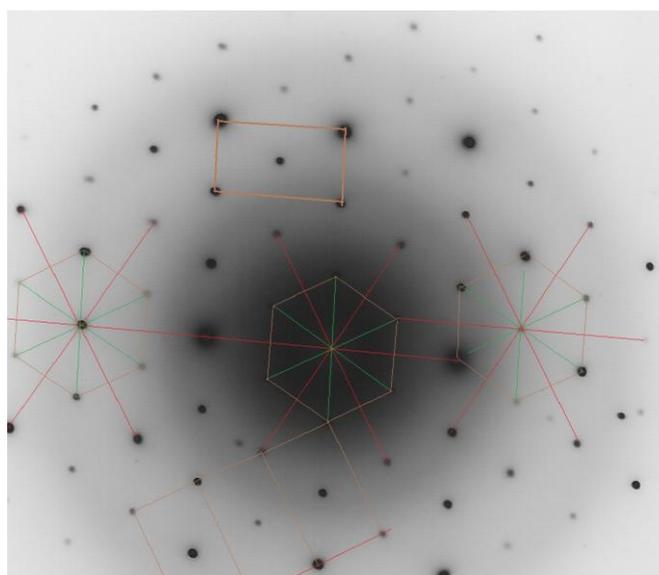


Figura 10.7 Imagem de difração mostrando vários hexágonos e retângulos que estão associados a estrutura ortorrômbica. O centro destas imagens poderia ser deslocado para o ponto central girando a GC em relação ao feixe incidente.

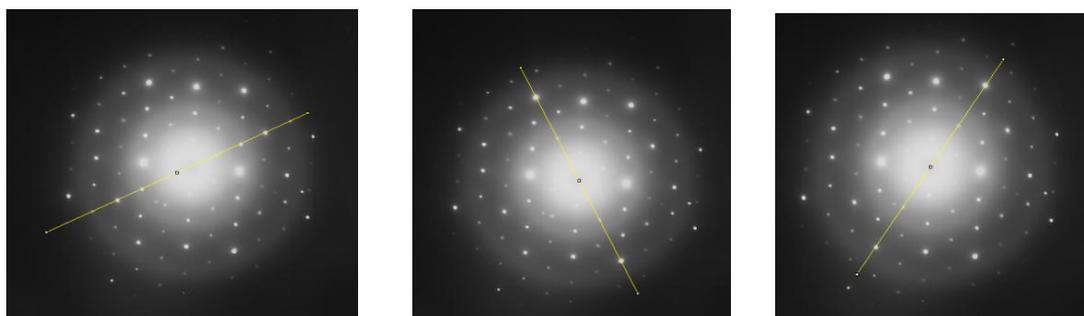
Olhando a figura 10.7, podemos observar nitidamente a formação de vários hexágonos, isto acontece por que a esta estrutura hexagonal pode ser associada às estruturas ortorrômbicas com a relação entre $b/c \sim 1,73$, muito semelhante à relação que ocorre na lisozima.

Inspecionando os ângulos onde ocorrem famílias de pontos que são gerados por diferentes N_s , concluiu-se que a direção do feixe incidente deve ser paralela a direção [100]. A partir daí podemos supor que os pontos observados (spots) estão todos no plano formado pelas direções perpendiculares a direção [100]. Busca-se então, identificar os chamados eixos de zona, definidos pela sequência de pontos de difração. A razão das distâncias entre os pontos equidistantes do centro e ortogonais deve ser igual ao inverso da razão entre os parâmetros de rede correspondentes. Assim, determina-se a relação D_{0k0}/D_{00l} . Onde D_{0k0} e D_{00l} são os comprimentos ortogonais de cada eixo. Neste caso, a razão $D_{010}/D_{001} = 1,7$ corresponde a relação $c/b = 89/52,5 = 1,695$ que encontramos na lisozima.

Para confirmarmos estes resultados devemos estabelecer uma relação angular entre os planos identificados para podermos comparar com a relação angular existente na proteína. Como a molécula de lisozima ortorrômbica possui parâmetros de rede muito grande, $a=31\text{Å}$, $b=52,5\text{ Å}$ e $c=89\text{ Å}$, era de se esperar que as distâncias interplanares também fossem grandes, no entanto, não é isso que observamos na prática. Acreditamos que os pontos difratados só aparecem na imagem quando os índices de Muller forem altos, caso contrário os raios seriam muito pequenos e os pontos não apareceriam na difração. Nas condições experimentais utilizadas, um parâmetro medindo $c=89\text{Å}$, somente terá chance de aparecer quando o índice de Muller corresponder a $L=20$ e no caso da direção paralela a $b=52,5\text{ Å}$ para $K=20$. De fato, este valor poderiam ser 19, por que a diferença entre 19 e 20 é de 5% que está dentro da margem de erro experimental nas condições que trabalhamos sem conhecermos exatamente os parâmetros de rede da Lisozima cristalizada nas condições que foi preparada.

Note-se que a intensidade difratada é semelhante para qualquer ponto da rede recíproca, independentemente do valor de hkl . (ver equação 4.46 da secção 4.5.3 Amplitude Diffracted by Parallelepiped Crystal) da referência acima citada [35]. Os altos valores de H e K indicam que a difração predominante corresponde a planos caracterizados por K e L altos, indicando que os planos difratantes são de mais alta ordem, porém próxima da região central de incidência do feixe de elétrons.

A seguir podemos visualizar imagens com eixos equivalentes aos mostrados acima.

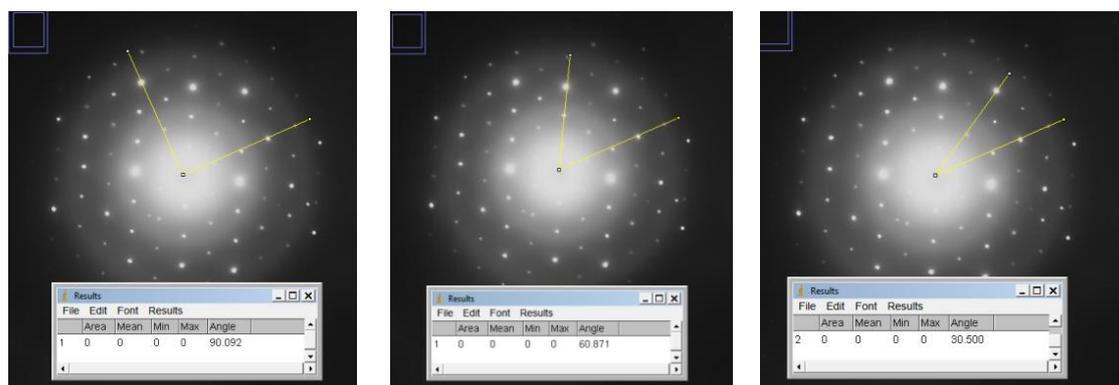


(a)

(b)

(c)

Figura 10.8 Imagens mostrando as direções escolhidas para se calcular as distâncias interplanares e os ângulos correspondentes. (a) Direção $[0\ 1\ 0]$, (b) Direção $[0\ 0\ 1]$ e (c) Direção $[0\ 1\ 3]$.



(a)

(b)

(c)

Figura 10.9 (a) Imagem mostrando o ângulo de 90° que a direção $[0\ 1\ 0]$ forma com a direção $[0\ 0\ 1]$, (b) ângulo de 60° com a direção $[0\ 1\ 3]$, (c) ângulo de 30° com a direção $[0\ 1\ 1]$.

Procurando reproduzir os pontos de difração esperados para uma estrutura ortorrômbica como a Lisozima mostra-se a seguir a planilha, feita com o auxílio do software Origin, que permite o cálculo dos ângulos entre planos, as distâncias interplanares e a posição “spots” no primeiro quadrante de um difratograma, fornecendo-se os parâmetros de rede e os planos da estrutura de interesse.

H1	H1N	K1	K1N	L1	L1N	H2	H2N	K2	K2N	L2	L2N	Cos	Teta	D1	D2	R(mm)
	b/a 52,5/31		b/b 52,5/52,5		b/c 52,5/89		b/a 52,5/31		b/b 52,5/52,5		b/c 52,5/89					
0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	52,5	52,5	0,46
0	0	1	1	0	0	0	0	2	2	1	0,59	0,96	16,43	52,5	25,18	0,96
0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0,59	0,86	30,53	52,5	45,22	0,54
0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	2	1,18	0,65	49,72	52,5	33,95	0,72
0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	3	1,18	0,49	60,53	52,5	25,83	0,94
0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0,59	0	89,99	52,5	89	0,27
0	0	1	1	0	0	0	0	20	20	0	0	1	0	52,5	2,62	9,26
0	0	1	1	0	0	0	0	40	40	0	0	1	0	52,5	1,31	18,53
0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	20	11,8	0	89,99	52,5	4,45	5,46
0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	60	35,40	0	89,99	52,5	1,48	16,4
0	0	1	1	0	0	0	0	10	10	30	17,70	0,49	60,52	52,5	2,58	9,43
0	0	1	1	0	0	0	0	20	20	60	35,40	0,49	60,52	52,5	1,29	18,7

Tabela 10.4 Relação dos ângulos entre os planos (h1 k1 l1) com (h2 k2 l2). As colunas H1 , K1 , L1 , H2 , K2 , L2 correspondem aos índices de Miller sem normalização. As colunas H1N , K1N , L1N , H2N, K2N e L2N correspondem aos índices de Miller

normalizados pelo parâmetro **b**. D1 refere-se às distâncias interplanares da família de planos $(h1\ k1\ l1)$ e D2 às distâncias interplanares dos planos $(h2\ k2\ l2)$. A coluna \cos refere-se ao cosseno do ângulo entre os planos $(h1\ k1\ l1)$ e $(h2\ k2\ l2)$. Teta é o ângulo entre $(h1\ k1\ l1)$ e $(h2\ k2\ l2)$. O R refere-se à distância entre a posição de incidência do feixe de elétrons e o ponto de difração.

Segue a projeção estereográfica com a indicação dos eixos de zona observáveis.

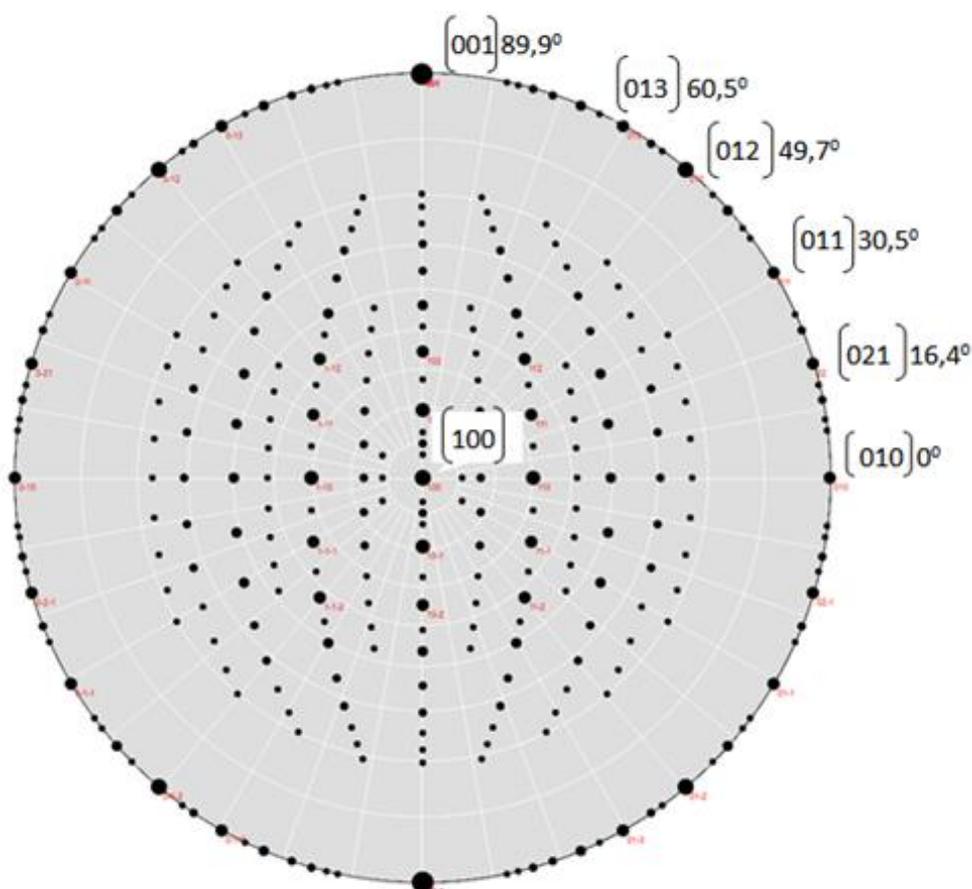


Figura 10.10 A melhor correspondência entre ângulos é observada para a projeção do eixo $[1\ 0\ 0]$ da Lisozima. Ao lado das direções estão indicados os ângulos correspondentes.

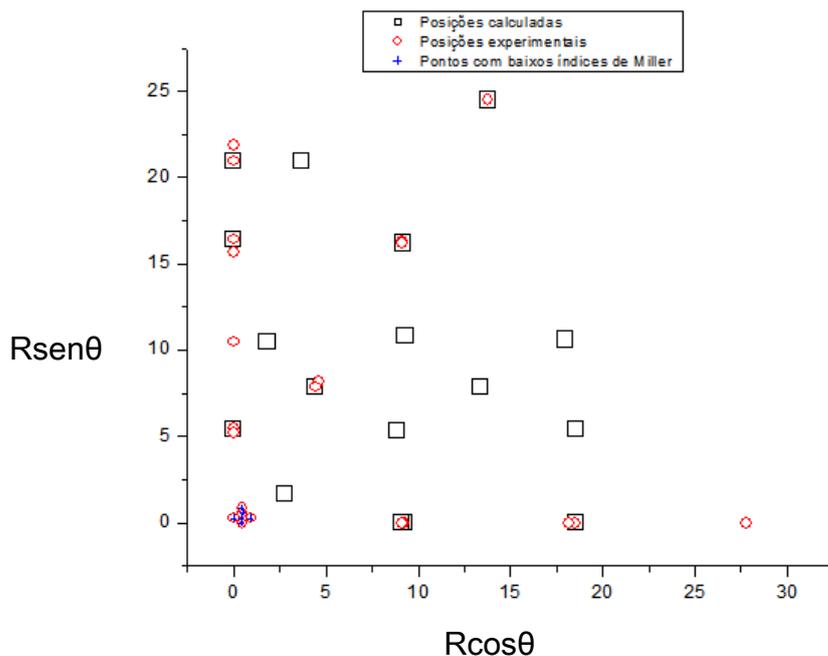


Gráfico 10.4 Posições dos spots em relação aos diferentes índices de Miller.

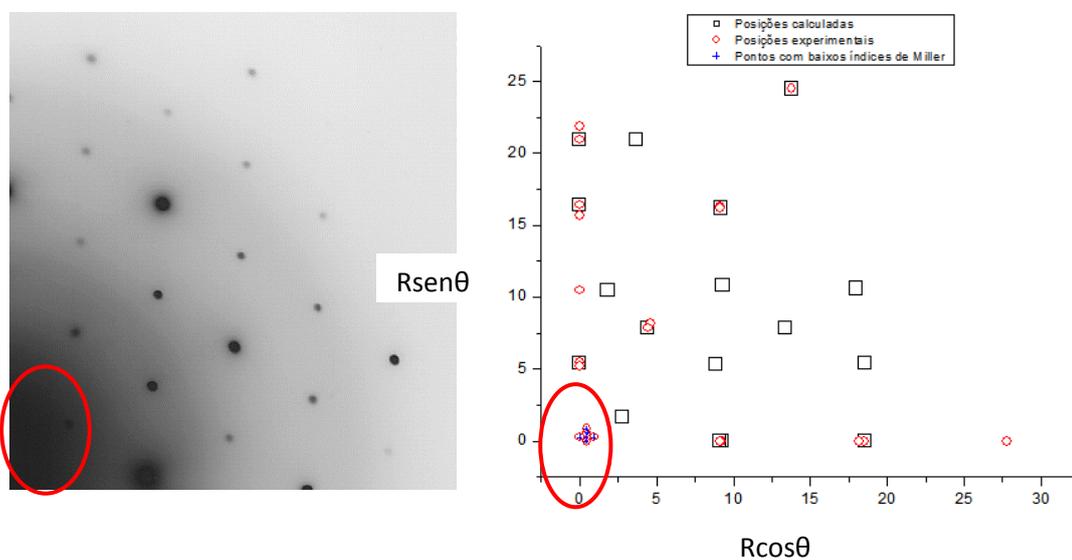


Figura 10.11 Comparação entre a imagem de um possível cristal de Lisozima e gráfico gerado a partir de dados experimentais das posições dos spots. O círculo representa a região onde os spots não estão visíveis, devido aos baixos índices de Miller e consequentemente raios muito pequenos.

- **CENTRINA**

Analisando a simetria de cada uma das projeções estereográficas, podemos concluir que a projeção que possui uma maior simetria com as imagens obtidas durante o experimento é a projeção com o feixe incidente na direção $[0\ 1\ 0]$.

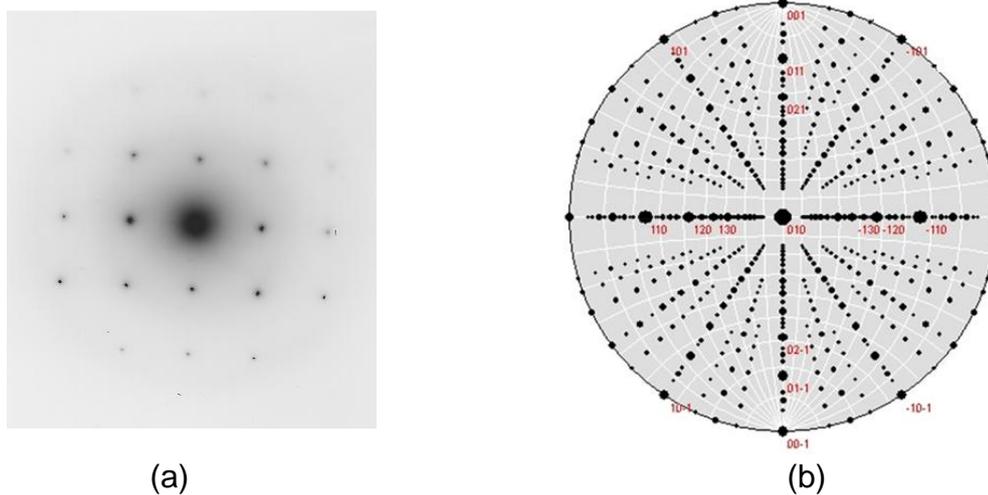


Figura 10.12 (a) Imagem de difração de um possível cristal de Centrina, (b) projeção estereográfica da Centrina considerando a direção de incidência $[0\ 1\ 0]$.

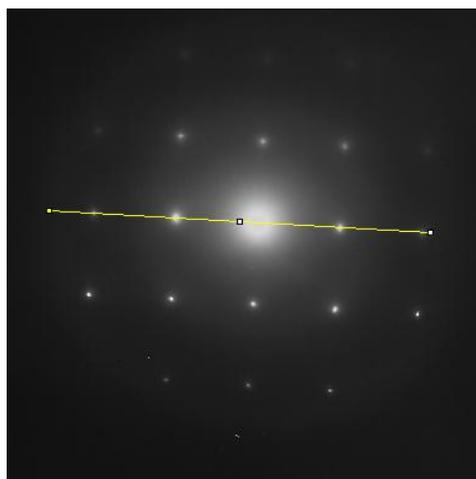


Figura 10.13 Imagem de difração de um possível cristal de Centrina mostrando a direção $[1\ 0\ 0]$.

Raio(mm)	d(Å)
16,993	1,411
8,385	2,860

Tabela 10.5 Tabela mostrando os spots com os respectivos cálculos dos raios e das distâncias interplanares correspondentes a direção $[1\ 0\ 0]$.

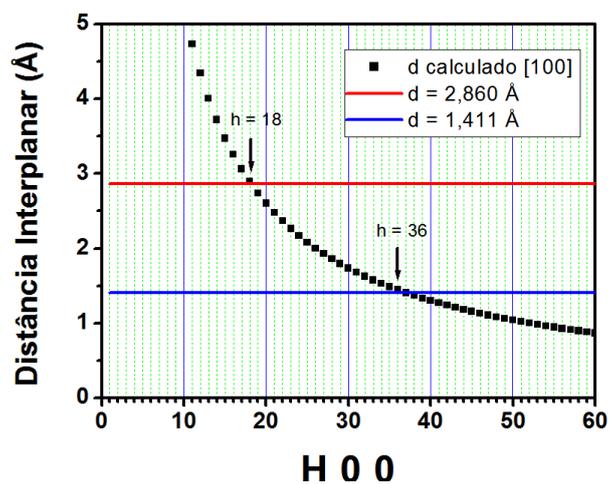


Gráfico 10.5 Relação entre as distâncias interplanares e os planos hkl para a direção $[1\ 0\ 0]$ da Centrina.

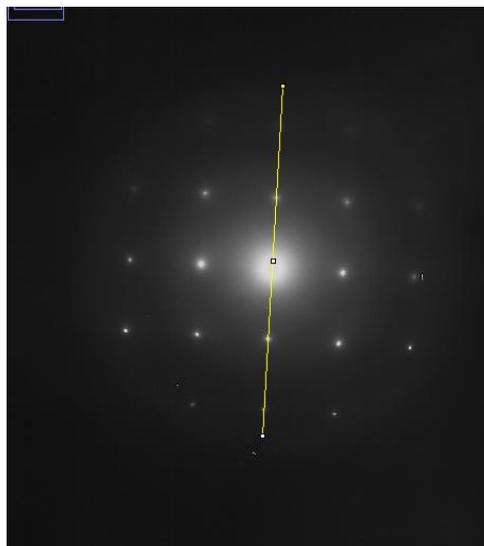


Figura 10.14 Imagem de difração de um possível cristal de Centrina mostrando a direção $[0\ 0\ 1]$.

Raio(mm)	D(Å)
17,094	1,402
8,560	2,801

Tabela 10.6 Tabela mostrando os spots com os respectivos cálculos dos raios e das distâncias interplanares correspondentes a direção $[0\ 0\ 1]$.

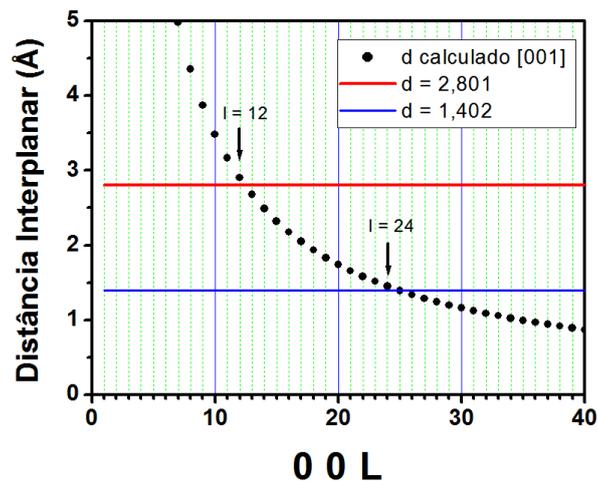


Gráfico 10.6 Relação entre as distâncias interplanares e os planos hkl para a direção $[0\ 0\ 1]$ da Centrina.

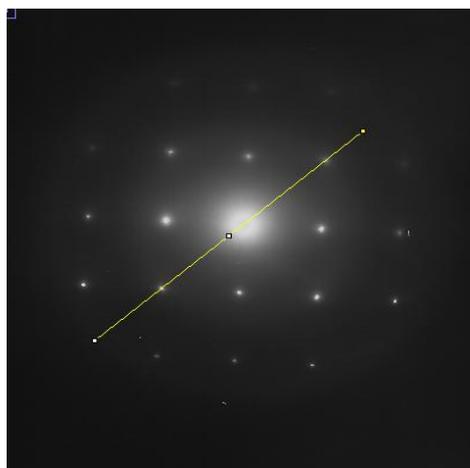


Figura 10.15 Imagem de difração de um possível cristal de Centrina mostrando a direção $[3\ 0\ 2]$.

Raio(mm)	D(Å)
12,001	1,998

Tabela 10.7 Tabela mostrando os spots com os respectivos cálculos dos raios e das distâncias interplanares correspondentes a direção [302] .

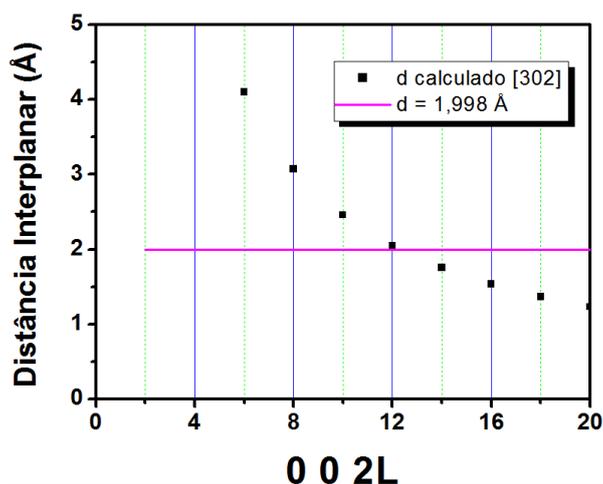


Gráfico 10.7 Relação entre as distâncias interplanares e os planos hkl para a direção [3 0 2] da Centrina.

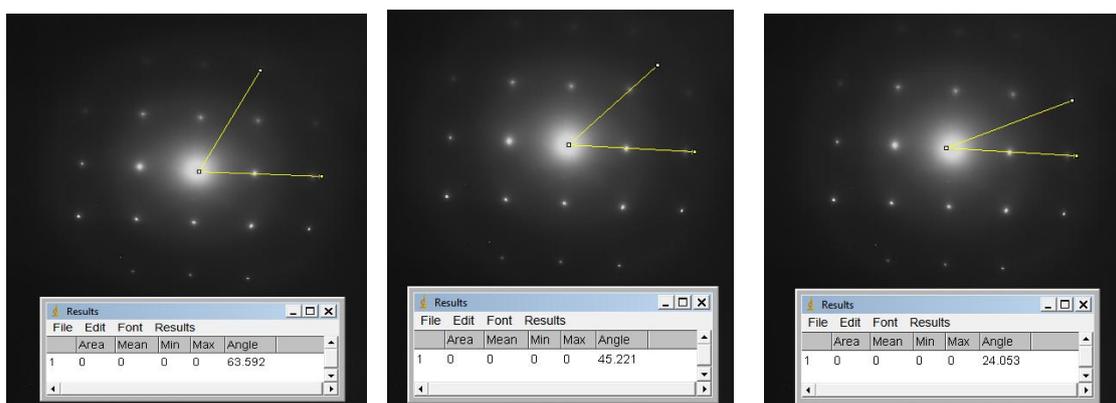


Figura 10.16 (a) Imagem de difração de um possível cristal de Centrina mostrando o ângulo de $63,5^{\circ}$ que a direção [1 0 0] faz com a direção [30 1], (b) ângulo de $45,2^{\circ}$ com a direção [302] , (c) ângulo de 24° com a direção [203].

Na análise da Lisozima a direção de incidência do feixe era $[1\ 0\ 0]$ e assim na imagem de difração tínhamos quase na horizontal a direção $[0\ 1\ 0]$ que foi nossa referência. No caso da Centrina a direção de incidência é a $[0\ 1\ 0]$ e a nossa referência passa a ser a direção $[0\ 0\ 1]$.

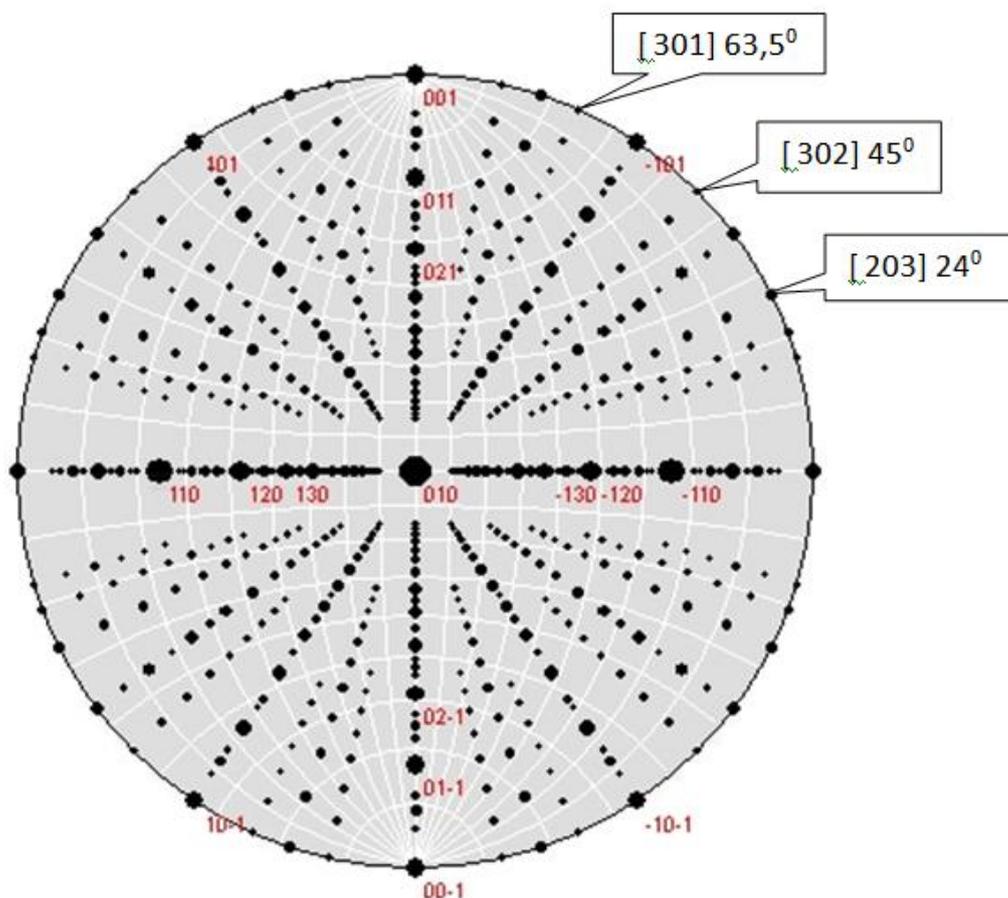


Figura 10.17 A melhor correspondência entre ângulos é observada para a projeção do eixo $[0\ 1\ 0]$ da Centrina. Ao lado das direções estão indicados os ângulos correspondentes.

Procurando reproduzir os pontos de difração esperados para uma estrutura ortorrômbica como a Centrina mostra-se a seguir a planilha, feita com o software Origin, que permite o cálculo dos ângulos entre planos, as distâncias interplanares e a posição “spots” no primeiro quadrante de um difratograma, fornecendo-se os parâmetros de rede e os planos da estrutura de interesse.

H1	H1N	K1	K1N	L1	L1N	H2	H2N	K2	K2N	L2	L2N	Cos	Teta	D1	D2	R(m m)
	b/a 114,4 3/52, 10		b/b 114,43 /114,4		b/c 114,43/ 34,84		b/a 114,43 /52,10		b/b 114,43 /114,4		b/c 114,43 / 34,84					
0	0	0	0	1	3,28	0	0	0	0	1	3,28	1	0	34,84	34,84	0,69
0	0	0	0	1	3,28	1	2,2	0	0	0	0	0	89,99	34,84	52,1	0,469
0	0	0	0	1	3,28	1	2,2	0	0	2	6,57	0,95	18,49	34,84	16,52	1,459
0	0	0	0	1	3,28	1	2,2	0	0	3	9,85	0,98	12,56	34,84	11,33	2,119
0	0	0	0	1	3,28	2	4,39	0	0	3	9,85	0,918	24,02	34,84	10,60	2,26
0	0	0	0	1	3,28	1	2,2	0	0	1	3,28	0,838	33,77	34,84	28,96	0,83
0	0	0	0	1	3,28	3	6,59	0	0	2	3,56	0,71	45,08	34,84	12,29	1,95
0	0	0	0	1	3,28	3	6,59	0	0	1	3,287	0,442	63,50	34,84	15,54	1,55
0	0	0	0	1	3,28	18	39,53	0	0	0	0	0	89,99	34,84	2,89	8,28
0	0	0	0	1	3,28	36	79,07	0	0	0	0	0	89,99	34,84	1,44	16,57
0	0	0	0	1	3,28	0	0	0	0	12	39,4	1	0	34,84	2,903	8,25
0	0	0	0	1	3,28	0	0	0	0	24	78,82	1	0	34,84	1,45	16,51

Tabela 10.8 Relação dos ângulos entre os planos (h1 k1 l1) com (h2 k2 l2). As colunas H1 , K1 , L1 , H2 , K2 , L2 correspondem aos índices de Miller sem normalização. As colunas H1N , K1N , L1N , H2N, K2N e L2N correspondem aos índices de Miller

normalizados pelo parâmetro b . $D1$ refere-se às distâncias interplanares da família de planos $(h1\ k1\ l1)$ e $D2$ às distâncias interplanares dos planos $(h2\ k2\ l2)$. A coluna \cos refere-se ao cosseno do ângulo entre os planos $(h1\ k1\ l1)$ e $(h2\ k2\ l2)$. Teta é o ângulo entre $(h1\ k1\ l1)$ e $(h2\ k2\ l2)$. O R refere-se à distância entre a posição de incidência do feixe de elétrons e o ponto de difração.

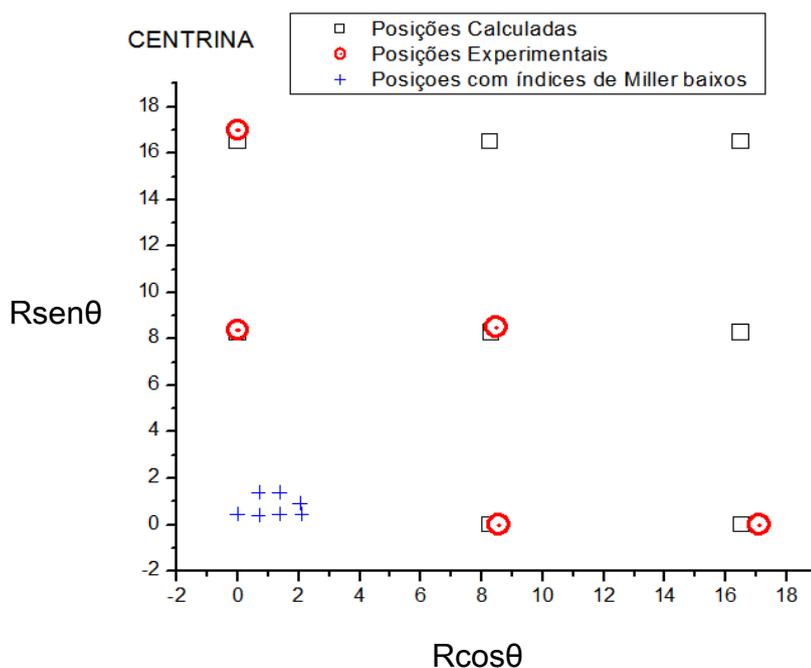


Gráfico 10.8 Posições dos spots em relação aos diferentes índices de Miller.

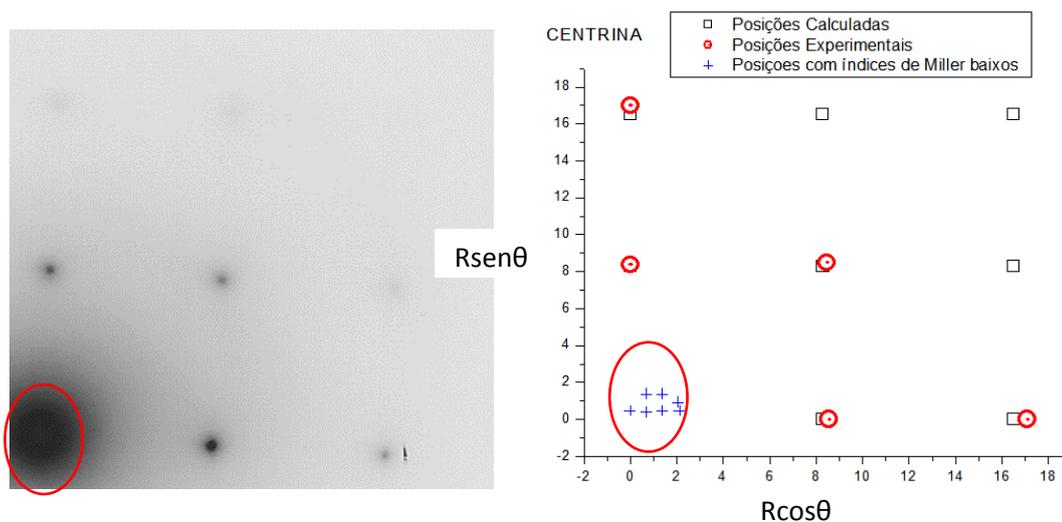


Figura 10.18 Comparação entre a imagem de um possível cristal de Centrina e gráfico gerado a partir de dados experimentais das posições dos spots. O

círculo representa a região onde os spots não estão visíveis, devido às pequenas distâncias do ponto de incidência do feixe.

Em todas as rotinas foi realizado o teste com o sal sem a proteína e nenhuma delas mostrou difração.

Uma tentativa de observação de cristalização de proteína desnaturada não resultou em difração.

11 CONCLUSÕES

Neste trabalho pudemos confirmar que soluções de proteínas, Lisozima e Centrina (Becen3), depositadas diretamente em grades para microscopia de transmissão e lavadas imediatamente após um período de deposição de 5s e 10s, apresentam evidências de formação de micro e nanocristais. Estes resultados consistem em uma comprovação de experimentos anteriores realizados durante o trabalho de mestrado da estudante Vivian Fernanda Pavesi Carvalho, Formação e Caracterização de Cristais de Proteínas usando Métodos de Filmes Finos, realizado no PIPE em 2011. A análise destes cristais feita por microscopia de transmissão de elétrons e utilizando difração de elétrons em área selecionada (DAS), permitiu a observação de micro e nanocristais que se mantiveram íntegros durante a análise, sugerindo que a quantidade de energia depositada nas amostras, não foi suficiente para degradar os cristais. Este resultado é consistente com a condição de difração (espalhamento elástico) possibilitando a caracterização de regiões cristalinas, a determinação das distâncias interplanares e confirmação da possível estrutura cristalográfica. Os resultados simulados para Lisozima ortorrômbica com parâmetros de célula unitária de 31Å, 52,5Å e 89Å, estão de acordo com os padrões de difração obtidos experimentalmente, considerando-se altos índices de Miller. No caso da Centrina o resultado também é compatível com parâmetros de célula unitária de 52,10Å, 114,43Å e 34,84Å. A ausência de evidência de difração para planos com índices de Miller menores é justificada pelos grandes parâmetros de rede da Lisozima e da Centrina. Valores pequenos de índices de Miller ocorrem, mas sua visualização é difícil, pois, com distâncias interplanares muito grandes teremos raios muito pequenos para cada "spot" que ficarão muito próximos ao feixe incidente e não serão passíveis

de observação, pois os pontos brilhantes (spots) de difração desaparecerão devido ao espalhamento do feixe incidente próxima ao centro da imagem de difração. Na configuração utilizada, sendo a energia do feixe de elétrons de 80keV e $L=60\text{cm}$, os limites observáveis (região fora do brilho central) correspondem a distâncias do feixe central maiores do que 9mm. Este é o limite de observação da técnica. Pode-se visualizar spots de difração a partir de $n=10$ nas zonas de Laue de alta ordem (HOLZ), conforme mostra o gráfico 9.1. As simetrias observadas comparando-se as projeções estereográficas e executando o cálculo dos eixos de zona, admitindo-se a estrutura ortorrômbica, reproduz o padrão observado experimentalmente.

É pouco provável que outra substância esteja contribuindo na difração, pois os sais tampão que acompanham a Lisozima, Cloreto de sódio e Acetato de Sódio, e no caso da Centrina, Cloreto de sódio e Tris, quando testados sem solução, não resultaram em cristais aderidos à grade de cobre, com exposição da grade à solução, em intervalos de tempo tão pequenos. Os sais NaCl e acetato de sódio presentes na solução de Lisozima fornecem padrões de difração diferentes daqueles observados, tanto em relação à simetria quanto em relação aos parâmetros de rede determinados a partir das distâncias dos “spots” ao feixe incidente. No caso da Centrina, o padrão de difração do NaCl se assemelha ao padrão observado visualmente, no entanto a morfologia dos cristais de Centrina, com bordas arredondadas, é diferente dos cristais de NaCl que apresentam arestas bem definidas. A interpretação dos padrões de difração nos mostra que a Centrina tem uma distribuição de pontos que forma um padrão retangular, diferente dos cristais de NaCl que formam um padrão com base quadrada.

Mesmo não sendo encontrado na literatura registros de observação de cristalização de proteínas nas condições utilizadas neste experimento, sabemos que micro e nanocristais ocorrem em condições termodinâmicas mais favoráveis do que macrocristais. As planilhas de simulação dos pontos de difração, representadas nas tabelas 10.4 e 10.8, levando em conta os ângulos e distâncias do feixe central (R_{hkl}) reproduzem os dados experimentais.

Conclui-se assim que o procedimento adotado pode constituir em uma técnica promissora na obtenção de cristais de proteínas em geral, mas principalmente

nos casos de existirem dificuldades de obtenção de cristais maiores do que na escala sub-micrométrica.

12 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Para confirmar e viabilizar a técnica, girar o cristal para testar a sugestão de que a estrutura que difrata é realmente da proteína.
- Pesquisar a Centrina com outro sal como tampão na solução já que o NaCl tem uma difração semelhante a ela.

13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALVES, O. L. **Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo.** Parcerias Estratégicas. Brasília, n. 18, p. 23-40, 2004. Disponível em: <http://www.cgee.org.br/arquivos/pe_18.pdf>. Acesso em: 23 agosto 2013
- [2] DILYANA, GEORGIEVA. **Electron Crystallography of Three Dimensional Protein Crystals.** (Tese de Doutorado) - Department of Biophysical Structural Chemistry, Faculty of Science, Leiden University. Leiden, 2008.
- [3] LEMONS, R. A. & QUATE, C. F. "**Acoustic microscope--scanning version.**" *Appl. Phys. Lett.* 24, 1974. p.163-165.
- [4] HLADY V, BUIJS J. **Protein Adsorption on Solid Surfaces.** *Current Opinion in Biotechnology* 1996 **7**: 72-77.
- [5] PADILHA,A.F. **Microscopia eletrônica de transmissão.** Angelo Fernando Padilha Professor Titular do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da EP USP, 2013.
- [6] LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., Cox, M. M., **Princípios da bioquímica,** 2ª ed., São Paulo, Sarvier, 1995.
- [7] MELO, C. P; PIMENTA, M. A. **Nanociências e nanotecnologia.** Parcerias Estratégicas, Brasília, n. 18, p. 9-21, 2004. Disponível em: <http://www.cgee.org.br/arquivos/pe_18.pdf>. Acesso em 26 de novembro de 2013.
- [8] ROSSI - BERGMANN, B.. **A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico.** Ciências e Cultura, São Paulo, v.60, n.2, 2008. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S000967252008000200024&script=sci_arttext>. Acesso em 26 de novembro de 2013.

- [9] GUAZZELLI, M. J.; PEREZ, J. (Org.). **Nanotecnologia: a manipulação do invisível**. Rio Grande do Sul: Copyleft, 2009. Disponível em < <http://www.boelllatinoamerica.org/downloads/RevistaNanotecnologia.pdf> >. Acesso em 07 de Dezembro de 2013.
- [10] DURAN, N.; MARCATO, P. D.; TEIXEIRA, Z. **Nanotecnologia E Nanobiotecnologia: Conceitos Básicos**. Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP, Laboratório de Biotecnologia, Centro de Ciências Ambientais, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brasil
- [11] SILVA, V. B. & SILVA, C. H. T. P. /**Revista Eletrônica de Farmácia Vol IV (1), 15-26, 2007.**
- [12] SILVA JR, E.F. **Rede para pesquisa em nanodispositivos semicondutores e materiais nanoestruturados**, 2004. Disponível em: <<http://www.comciencia.br>>. Acesso em: 05 fev.2014.
- [13] COOPER, G. M. **The Molecular Composition of Cells.in: The Cells A Molecular Approach**. 2ed. Boston, Boston University, 2000.
- [14] ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, ET AL. **Molecular Biology of the Cell**. : Garland Science. 4ed. Nova Iorque, 2002.
- [15] OSSERMAN, E. F., **Cristallization of human lysozyme**. *Science*, 155, 1536-1537,1967.
- [16] RIÈS-KAUTT, M., DUCRUIX, A., VAN DORSSELAER, A. **Crystallization of previously desalted lysozyme in the presence of sulfate ions**, *Acta Crystallographica Section D*, 50, 366-369, 1994.

[17] WATANABE, ÉRIKA OHTA. **Equilíbrio de fases na precipitação de lisozima e albumina de soro bovino com o uso de sais / Érika Ohta Watanabe.**--Campinas, SP: [s.n.], 2007.Acesso em 10/12/2013.

[18] RITA SIMÕES, JORGE BEIRA, RITA MALCATA; 2.º Trabalho.
Tema: Estrutura da lisozima Metabolismo e Endocrinologia. 2.º Ano LEBM, Abril de 2006 Grupo 4: A.

[19] [HTTP://TEXTBOOKOFBACTERIOLOGY.NET/THEMICROBIALWORLD/THEMICROBIALWORLD/CHEMOC.HTML](http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/themicrobialworld/chemoc.html)

[20] CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução.** 8ed. LTC, São Paulo, 2013.

[21] BLEICHER, L. e SASAKI, J. M. **Introdução À Difração De Raios-X Em Cristais.** Universidade Federal do Ceará, 2000.

[22] [WIKIMEDIA.ORG/WIKIPEDIA/COMMONS](http://wikimedia.org/wikipedia/commons).

[23] HERGUEDAS, B. **Proteínas con dominios de unión a flavina: bases estructurales de la biosíntesis de cofactores flavínicos en procariotas y de la interacción y transferencia de electrones entre flavinas.** Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, (2011).

[24] AZEVEDO, W. F., CANDURI, F., DOS SANTOS, D. M., SILVA, R.G., OLIVEIRA, J. S., CARVALHO, L. P. S., BASSO, L. A., MENDES, M. A., PALMA, M. S., SANTOS, D. S.(2003). **Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase at 2.3 Å resolution.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308(3), 545-552.

[25] AZEVEDO, W. F. **Cristalização de macromoléculas biológicas.** Laboratório de Sistemas Biomoleculares. Departamento de Física-Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas-UNESP, São José do Rio Preto. SP.
www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br, 2004.

[26] Ducruix, A. and Giegé, R. ***Crystallization of Nucleic Acids and Proteins (A Practical Approach)***. Oxford University Press, 1992.

[27] WWW.ASTRO.IF.UFRGS.BR/.

[28] WWW.SEARA.UFC.BR

[29] CASTILHO,C.M.C. de, NASCIMENTO V.B. , SOARES, E.A., ESPIRIDIANO, A.S.C., MOTAL, F.B. e CARVALHO,V.E. **Difração de elétrons de baixa energia (LEED) e a determinação da estrutura atômica de superfícies ordenadas**(*Lowenergyelectron diffraction and atomic structural determination of ordered surfaces*) *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 27, n. 4, p. 527 - 543, 2005. www.sbfisica.org.br

[30] ROA,D.B.; **Nanofibras de carbono verticalmente alinhadas: estudo do crescimento por microscopia eletrônica de transmissão**. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais; Belo Horizonte; Março de 2008 - www.bibliotecadigital.ufmg.br

[31] AZEVEDO,W. F. **Processamento de dados de difração**, 2009. Azevedolab.net

[32] SERWAY R. A. AND JOHN JEWETT W. **physics for scientists and engineers**, Volume 2, Chapters 23-46by (Jan 13, 2010).

[33] MATTHEW G. IADANZA^a AND TAMIR GONEN^{a*}. **A suite of software for processing MicroED data of extremely small protein crystals**. *Journal Applied Crystallography* (2014) vol.47 p.1140-1145

[34] IGOR NEDERLOF, ERIC VAN GENDEREN, YAO-WANG LI AND JAN PIETER ABRAHAMS*. **A Medipix quantum area detector allows rotation electron diffraction data collection from submicrometre three-dimensional protein crystals.** *Acta Crystallographica*.(2013). D69, 1223–1230.

[35] PECHKOVA, E. ; NICOLINI, C. **From art to science in protein crystallization by means of thin-film nanotechnology.** *Nanotechnology* 13, 460–464 . 2002

[36] PECHKOVA E, NICOLINI C. **Protein Nanocrystallographie: A New Approach to Structural Proteomics.** *Trends in Bio, p.* 117-122, 2004.

[37] P. HIRCH,A.HOWIE,R.B.NICHOLSON,D.W. PASHEY AND M.J. WHELAN Hirsch, **Electron Microscopy of Thin Crystals.** edição de 1977 por Robert E. Krieger Publishing company. N.Y.

[38] University of Cambridge site. <http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/diffraction-patterns/laue.php> Acesso 21/03/2015

[39] YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. **The phylogeny of acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA. The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 61,p. 1244-1251, 1997.

[40] Sigma-Aldrich. Disponível em : <> acesso 23 de novembro de 2011 às 14:47h.

[41] CHERNOV, A. A. **Structures of two forms of sodium acetate, $\text{Na}^+ \cdot \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$** *Acta Cryst.*v.39,1983. C39, 690-694.

[42] WEBER, S. **Homepage.** Disponível em:
<<http://www.icrystal.com/steffenweber/>> Acesso 25/11/2013.