

Thiago Martins Francisco

Análise *in situ* dos efeitos da temperatura no  
crescimento de cristais de proteína

2014



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas – ICEX  
Programa de Pós Graduação em Física

# Análise *in situ* dos efeitos da temperatura no crescimento de cristais de proteína

Thiago Martins Francisco

Dissertação apresentada ao Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, como requisito parcial para a obtenção do grau de MESTRE EM FÍSICA.

Prof. Dr. Carlos Basílio Pinheiro (Orientador)

Prof. Dr. Pedro Licínio de Miranda Barbosa (Co-Orientador)

Belo Horizonte

2014

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente e com carinho à minha querida avô Raimunda Maria Isabel (*in memoriam*), que sempre me inspirou com sua coragem e força. Agradeço aos meus pais, Elza e Américo, por terem acreditado em mim e sempre me incentivarem a lutar pelos meus objetivos. Ao Cristiano, pelo constante apoio e carinho em todos os momentos.

Ao Professor Carlos Basílio, por ter acreditado no meu potencial e pelos conselhos e puxões de orelha de amigo. Agradeço ao Professor Pedro Licínio que me acolheu em seu laboratório, sempre disposto a me ajudar com minhas medidas.

Às minhas amigas físicas Larissa e Leandra, sempre temos muito o que conversar!

Aos colegas que orientei: Danilo, Natália, Igor, Caroline, Rubens e Ludmila, companheiros nos momentos de preparar infinitas soluções!

Aos amigos do LabCri: Professor Nivaldo, Alexandre Melo, Mônica, Marcos, João e Charlane. Ao meu amigo Cosme pela ajuda com a revisão.

Não posso deixar de agradecer também a todos os que duvidaram do meu potencial (e não foram poucos). Sem querer vocês me instigaram a continuar.

## Resumo

Estudos sobre a cristalização em extratos biológicos realizados em meados do século XIX contribuíram para a descoberta das proteínas. Na segunda metade do século XX foram desenvolvidas técnicas da Biologia Molecular que possibilitam a produção em larga escala de proteínas e a difração de raios X tornou-se a principal ferramenta de investigação de estrutura destas moléculas. Desde os primeiros experimentos até os dias atuais, o processo de cristalização tem sido o grande gargalo para a realização de estudos estruturais de proteínas. Os protocolos de cristalização utilizados atualmente consistem em misturar um conjunto de soluções de precipitantes, aditivos e soluções tampão com a solução de proteína para promover a cristalização, desprezando diversos parâmetros físicos. Amostras cristalinas são obtidas por tentativa e erro e com grande taxa de irreprodutibilidade. O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos da temperatura no processo de cristalização de proteínas. Foram realizados ensaios de cristalização com a proteína lisozima em diferentes temperaturas nos quais foram observados uma dramática mudança de regime de crescimento, com impacto sobre o número e tamanho médio de cristais obtidos acima e abaixo de 12°C. Para avaliar a influência da temperatura na dinâmica de formação dos cristais de lisozima, foram realizados ensaios de cristalização com monitoramento *in situ* pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Esta técnica permitiu determinar o tamanho médio dos agregados de proteínas em solução durante a cristalização. Os resultados obtidos indicam que a temperatura não altera a evolução temporal das raios dos agregados e que a quantidade deles em solução é maior para temperaturas mais baixas. Cristais obtidos em diferentes temperaturas foram analisados utilizando difração de raios X e as estruturas obtidas não apresentaram nenhuma mudança relevante. Ainda há lacunas nas teorias que descrevem a dinâmica do processo de cristalização de proteínas que justificam estudos posteriores sobre este fenômeno visando, sobretudo, a elaboração de protocolos de cristalização mais assertivos.

Palavras Chave: Cristalização de Proteínas, Temperatura, Espalhamento de Luz, Difração de raios X.

# Abstract

Studies on crystallization in biological extracts made in the mid-nineteenth century contributed to the discovery of proteins. In the second half of the twentieth century Molecular Biology techniques enabled large-scale production of proteins and X-ray diffraction became the main tool for the investigation of protein structure. From the earliest experiments to the present day, the crystallization process has been the major bottleneck to structural studies of proteins. The current crystallization protocols consist of mixing the precipitating agents, buffers, and additives to the protein solution to promote crystallization discarding various physical parameters. Crystalline samples are obtained by trial and error and with a great rate of non-reproducibility. The aim of this work was to study the effects of the temperature on the protein crystallization process. Crystallization trials with the protein lysozyme at different temperatures showed change of the growth regime, with a remarkable change in the number and in the average size of crystals obtained above and below 12°C. In order to study the influence of temperature on the dynamics of the formation of crystals of lysozyme, crystallization trials with the *in situ* monitoring by Dynamic Light Scattering technique (DLS) were performed. This technique allowed the determination of the average size of the protein aggregates in solution during crystallization. The results indicated that the temporal evolution of the radii of the aggregates is not affected by temperature. However the amount of aggregates in solution is higher for lower temperatures. Crystals obtained at different temperatures were finally analyzed by X-ray diffraction techniques and the structures obtained did not show any significant change. There are still gaps in the theories that describe the dynamics of the protein crystallization process that justify further studies of this phenomenon, targeting above all, more assertive crystallization protocols.

Keywords: Crystallization of proteins, temperature, Light Scattering, X-ray Diffraction.

# Sumário

Resumo .....	ii
Abstract.....	iii
Capítulo 1 - Motivação .....	1
Capítulo 2 - Dos aminoácidos às proteínas .....	4
2.1 Aminoácidos .....	5
2.2 Estrutura de proteínas .....	6
2.3 Lisozima.....	11
Capítulo 3 - Técnicas de Cristalização de Proteínas .....	13
3.1 Diagramas de fase e Supersaturação.....	14
3.2 Métodos de Cristalização.....	17
3.2.1 Batch.....	17
3.2.2 Difusão de Vapor .....	17
Capítulo 4 - Modelos de agregação de proteínas.....	19
4.1 Teoria Clássica.....	20
4.1.1 Nucleação homogênea.....	21
4.1.2 Nucleação heterogênea e nucleação secundária.....	23
4.2 Regimes de Crescimento .....	23
Capítulo 5 - Espalhamento Dinâmico de Luz.....	25
5.1 Teoria de Espalhamento de Luz.....	25
5.1.1 Flutuações e função de correlação temporal .....	26
5.1.2 Teoria Eletromagnética .....	27
Capítulo 6 - Difração de Raios X .....	29
6.1 Cristais .....	29
6.2 Redes cristalinas .....	29
6.3 Teoria de Espalhamento de raios X .....	31
6.3.1 Interação da radiação com a Matéria.....	31

6.3.2 Espalhamento de Raios X por um elétron livre .....	32
6.3.3 Difração por uma linha de átomos .....	34
6.3.4 Difração por cristais .....	37
6.3.5 Tensor de Deslocamento .....	42
6.4 Substituição Molecular.....	43
6.5 Refinamento.....	44
Capítulo 7 - Resultados .....	46
7.1 Crescimento de cristais por Difusão de vapor e Batch .....	46
7.2 Análise dinâmica do crescimento .....	48
7.2.1 Medidas de DLS por retroespalhamento.....	49
7.2.1 Medidas de DLS por espalhamento à 90° .....	51
7.3 Solução e refinamento das estruturas.....	56
Capítulo 8 - Conclusão .....	60
Bibliografia.....	62
Apêndice I.....	67
Apêndice II.....	69

## Lista de Figuras

<i>Figura 2.1 - Distribuição de técnicas usadas para determinação da estrutura tridimensional de proteínas até dezembro de 2013[15].</i>	4
<i>Figura 2.2 - Representação esquemática da estrutura química de um aminoácido em pH 7.</i>	6
<i>Figura 2.3 - L-aminoácidos em pH 7 encontrados em proteínas.</i>	7
<i>Figura 2.4- Definição de ângulos <math>\phi</math> e <math>\psi</math> na ligação peptídica.</i>	8
<i>Figura 2.5 - Representação esquemática de uma hélice <math>\alpha</math>. As linhas pontilhadas em preto representam as ligações de hidrogênio que mantêm esta estrutura.</i>	8
<i>Figura 2.6 - Folhas <math>\beta</math> paralela (a) e antiparalela (b).</i>	9
<i>Figura 2.7 - Folha <math>\beta</math> retorcida ou mista.</i>	10
<i>Figura 2.8 - Ramachandran Plot para a proteína Lisozima[19]. As regiões em cinza escuro (A) e (B) representam ângulos de conformações estericamente permitidas para hélices <math>\alpha</math> e folhas <math>\beta</math>, respectivamente.</i>	11
<i>Figura 2.9 - Sequência de aminoácidos que compõem a lisozima.</i>	12
<i>Figura 2.10 - Estrutura tridimensional da lisozima.</i>	12
<i>Figura 3.1 - Número total e anual de estruturas submetidas ao PDB.</i>	14
<i>Figura 3.2 - Diagrama de fase para Lisozima[23].</i>	15
<i>Figura 3.3 - Diagrama de fase representando o método de difusão de vapor. No processo <math>A \rightarrow B</math>, a perda de vapor leva o sistema a atingir a supersaturação. Posteriormente no processo <math>B \rightarrow C</math> ocorre redução da concentração devido ao processo de agregação até o sistema entrar em equilíbrio no ponto C.</i>	16
<i>Figura 3.4 - Diagrama para Gota depositada (a) e Gota pendurada (b), respectivamente. As setas evidenciam o sentido da difusão de solvente que ocorre devido a diferença de concentração de precipitante entre a gota (cg) e o poço (cp). Enquanto ocorre difusão de vapor a concentração de proteína e precipitante na gota aumentam, podendo ocorrer cristalização.</i>	18
<i>Figura 4.1 - Tipos de Nucleação. Adaptado de [35].</i>	20
<i>Figura 4.2 - Energia livre de cristalização de sistemas com temperaturas e supersaturações diferentes (<math>\Delta G_1 \neq \Delta G_2</math>) e conseqüentemente raios críticos diferentes (<math>r_c^1 \neq r_c^2</math>).</i>	22
<i>Figura 5.1- Função de autocorrelação temporal.</i>	27
<i>Figura 6.1 - Interações dos raios X com a matéria[56].</i>	32
<i>Figura 6.2 - Representação esquemática do espalhamento Thomson.</i>	34
<i>Figura 6.3 - Difração de uma onda plana incidente sobre uma fila de átomos igualmente espaçados. No caso de um observador posicionado no infinito, a onda difratada pode ser considerada uma onda plana (Limite de Fraunhofer[59]).</i>	35
<i>Figura 6.4 - Diferença de caminho óptico provocado pela difração (em vermelho).</i>	36
<i>Figura 6.5 - Intensidade da onda difratada para <math>N=2, 10</math> e <math>100</math>.</i>	37
<i>Figura 6.6 - Diferença de caminho óptico na difração em um cristal.</i>	38
<i>Figura 6.7 - Representação de uma distribuição de carga esféricamente simétrica.</i>	40
<i>Figura 7.1 - Ensaio de cristalização de lisozima por difusão de vapor observado com aumento de 50 vezes após (a) 7 horas, (b) 9 horas, (c) 9hs30min e (d) 13 horas. A seta em 6(b) indica o cristal que cresce conforme as figuras subsequentes.</i>	47



<i>Figura 7.2 - Influência da temperatura no número médio e no tamanho médio de cristais de lisozima obtidos na técnica de gota depositada de volume 2µl após 13 horas de experimento. A concentração de proteína foi 45mg/ml, NaCl 0.5M, tampão acetato 0.25M pH4.5.</i>	47
<i>Figura 7.3 – Cristais obtidos em ensaios de cristalização de Lisozima por batch em diferentes temperaturas após treze horas de experimento. A concentração de proteína utilizada foi de 20 mg/ml, NaCl 0.5M, tampão acetato 0.25M pH4.5 e Azul de metileno 2mM.</i>	48
<i>Figura 7.4 - Diagrama esquemático da montagem para cristalização de lisozima por difusão de vapor/ Sitting drop.</i>	49
<i>Figura 7.5 - Aparato experimental utilizado nas medidas.</i>	50
<i>Figura 7.6 - Variação da intensidade de luz no correlacionador durante a amostragem.</i>	50
<i>Figura 7.7 - Diagrama esquemático da montagem homodínea utilizada. A temperatura do meio espalhador é controlada por um sistema de resfriamento.</i>	51
<i>Figura 7.8 - Função de autocorrelação medida durante a cristalização de Lisozima à temperatura de 5.5°C após 2 minutos de preparo da solução.</i>	52
<i>Figura 7.9 - Evolução temporal das distribuições de raio determinadas pelo ajuste de duas exponenciais para as temperaturas de (a)5.5 °C e (b)21.1 °C.</i>	53
<i>Figura 7.10 - Ajuste da evolução temporal dos raios <math>r_{h2}</math> para as temperaturas (a)5.5°C e (b)21.1°C utilizando o modelo de crescimento de partículas coloidais esparsamente recobertas por um adsorvente orgânico.</i>	55
<i>Figura 7.11 - Evolução temporal da contagem de fótons por minuto durante o processo de cristalização.</i>	56
<i>Figura 7.12 - Figuras de difração para cristais de lisozima crescidos à 4°C(a) e 16°C(b).</i>	57
<i>Figura 7.13 - Ramachandran plot para lisozima à (a)4°C e (b)16°C.</i>	57
<i>Figura 7.14 - Parâmetro B por resíduo de aminoácido para lisozima à 4°C, 16°C e modelo.</i>	58

## Lista de tabelas

<i>Tabela 2.1 - Sequência de bases, códons, e respectivos aminoácidos transcritos. Importante notar que a variação da terceira base muitas vezes é irrelevante para definição do aminoácido.</i>	5
<i>Tabela 6.1 - Tipos de células unitárias e suas respectivas restrições geométricas. Sistema Hexagonais e Trigonais possuem células unitária com mesma geometria, mas com elementos de simetria distintos.</i>	30
<i>Tabela 7.1 - Raio <math>r_{h1}</math> médio para as temperaturas utilizadas.</i>	54
<i>Tabela 7.2 - Raio inicial <math>R_{h2}^0</math> para as temperaturas utilizadas.</i>	54
<i>Tabela 8.1 - Grau de Supersaturação (S) em função da temperatura para o sistema medido por DLS.</i>	60

# Capítulo 1 - Motivação

O estabelecimento da difração de raios X como ferramenta analítica contribuiu para a consolidação de diversas áreas científicas, tais como a Mineralogia, Química e Biologia, pois proporcionou o estudo de materiais a nível molecular. Para a Biologia, a determinação da estrutura de proteínas, ácidos nucleicos e complexos<sup>i</sup> permitiu a descrição de grande parte da maquinaria metabólica por trás da vida. No entanto, para que esta técnica seja utilizada é obrigatório o uso de amostras cristalinas, condição esta que torna o processo de cristalização um fator decisivo para a realização de estudos. No capítulo 6 veremos que esta técnica consiste em incidir um feixe de radiação sobre um arranjo periódico de átomos. Os elétrons dos átomos do arranjo espalham elasticamente raios X e um padrão de difração discreto é observado. Devido a ausência de coerência temporal das fontes convencionais de raios X, as fases da radiação difratada são perdidas. Algoritmos numéricos podem ser empregados para recuperar as fases e consequentemente a densidade eletrônica da estrutura do cristal[2].

A elucidação da estrutura de ácidos nucleicos permitiu o entendimento de como a informação genética é armazenada[1,3]. No caso de proteínas, macromoléculas que desempenham diversos papéis em sistemas biológicos, é possível determinar a função à partir da estrutura tridimensional e desta forma entender diversos processos e inclusive criar novas substâncias com propriedades farmacológicas que bloqueiam ou modulam a ação das proteínas[4].

A maioria dos métodos de cristalização utilizados atualmente alteram isotermicamente as propriedades químicas de uma solução (pH, força iônica, solventes orgânicos, etc.) que contêm as proteínas a serem investigadas de forma a promover crescimento ordenado de cristais[5,6]. No entanto, estes testes são empíricos e sem garantias de sucesso, pois a dinâmica de crescimento de cristais macroscópicos de proteínas ainda não é completamente entendida. Além disto, uma quantidade significativa de amostras é requerida para a realização de ensaios de crescimento de cristais. De fato, o processo de cristalização parece estar condicionado às diversas interações proteína-proteína[7]. Os trabalhos de revisão de Li *et al*[8] e de McPherson[9] apresentam os diversos fatores empíricos que afetam o processo de cristalização. Infelizmente, ainda não é possível prever com certeza qual o estado de

---

<sup>i</sup> Complexos são agrupamentos de proteínas e/ou ácidos nucleicos, por exemplo o ribossomo[1].

enovelamento de macromoléculas para diferentes ambientes químicos nem mesmo a termodinâmica de formação de cristais destes materiais[4,10].

Devido aos diversos grupos químicos na superfície das proteínas, a molécula em sua totalidade apresenta uma carga total superficial que pode variar dependendo do pH. Isto pode influenciar o processo de cristalização e até mesmo a forma da proteína. Os precipitantes<sup>ii</sup> utilizados em cristalização de proteínas são sais inorgânicos e compostos orgânicos[5,6]. Estas substâncias são utilizadas para aumentar a interação proteína-proteína de forma a promover a cristalização. Outros compostos chamados aditivos também são empregados, incluindo compostos aniônicos e agentes surfactantes. Todos estes fatores químicos afetam a solubilidade de proteína em solução e, por isso, podem ser fatores determinantes para a obtenção de cristais.

A alteração de parâmetros físicos como campos gravitacional, vibrações mecânicas, elétrico e magnético também são utilizados nas tentativas de promover a cristalização ou melhorar a qualidade das amostras obtidas[11,12,13,14]. Outros parâmetros físicos como pressão e temperatura parecem alterar a taxa de crescimento. No entanto, ainda não foram obtidas rotinas de cristalização genéricas para a obtenção de cristais pela utilização destes parâmetros. Em especial, as temperaturas utilizadas durante o processo de cristalização são sempre 4°C ou 20°C[9]. Estas correspondem às temperaturas de estufas de resfriamento (geladeiras) e à temperatura ambiente respectivamente. Portanto este fator é negligenciado na maioria das tentativas de cristalização de proteínas.

Embora a teoria clássica de crescimento de cristais apresentada no capítulo 3 possa ser aplicada para alguns poucos casos de cristalização de proteínas, detalhes sobre a natureza (tamanho, forma, dimensão fractal, etc.) dos primeiros agregados que culminarão em cristais ainda não são claros[7].

Como existem inúmeras lacunas nas teorias e modelos que descrevem a dinâmica do processo de cristalização de proteínas, neste trabalho tentamos compreender a influência da temperatura na dinâmica de formação dos cristais de lisozima. O crescimento de cristais foi monitorado *in situ* por técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). A morfologia e número de amostras foram monitoradas em ensaios de crescimento realizados em diversas

---

<sup>ii</sup> Agentes precipitantes são substâncias químicas que podem diminuir a solubilidade de proteína em solução e causar precipitação com formação de agregados amorfos ou cristais.

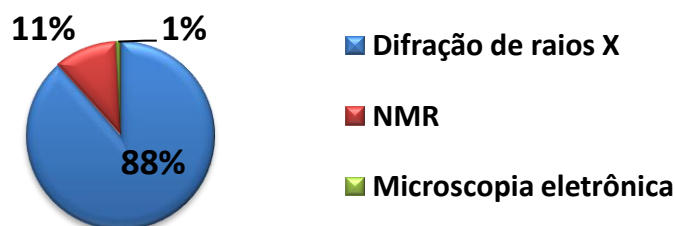
temperaturas. Finalmente, a estrutura cristalina de amostras obtidas em diferentes temperaturas foi determinada por técnicas de difração de raios X.

## Capítulo 2 - Dos aminoácidos às proteínas

A composição e a estrutura das proteínas permitem que estas macromoléculas desempenhem diversas funções nos processos biológicos, atuando como catalisadores, transportadores de moléculas, apoio mecânico, geradores de movimento e sinalização, isto é, em processos fundamentais para os sistemas vivos.

Proteínas são cadeias polipeptídicas, ou seja, macromoléculas poliméricas cujas subunidades são aminoácidos. Estas macromoléculas podem se enovelar para formar estruturas tridimensionais ainda mais complexas. A função biológica de uma proteína está diretamente correlacionada à disposição espacial dos aminoácidos presentes em sua estrutura tridimensional.

Toda proteína sintetizada nos organismos eucariotos<sup>iii</sup> possui como subunidades um conjunto de 20 aminoácidos. O grande número de interações possíveis entre os diversos aminoácidos de uma proteína inviabiliza a predição do estado de enovelamento desta, ou seja, da sua estrutura tridimensional. Desde os trabalhos pioneiros de John Kendrew e Max Perutz[9] com as estruturas da mioglobina (proteína responsável pelo transporte intracelular de oxigênio molecular[1]) e da hemoglobina (proteína responsável pelo transporte de oxigênio no sistema circulatório[1]) a estrutura de proteínas é determinada com ajuda de técnicas experimentais tais como: Difração de Raios X, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e microscopia eletrônica, A Figura 2.1 construída a partir de dados obtidos do *Protein Data Bank* (PDB)<sup>iv</sup> [15] mostra a proporção de estruturas obtidas utilizando cada uma destas técnicas.



*Figura 2.1 - Distribuição de técnicas usadas para determinação da estrutura tridimensional de proteínas até dezembro de 2013[15].*

<sup>iii</sup> Organismos eucariotos possuem células com material nuclear envolto por uma membrana.

<sup>iv</sup> O PDB é um banco de dados onde são depositadas as informações relativas as estruturas tridimensionais de proteínas e ácidos nucleicos.

## 2.1 Aminoácidos

A sequência linear de aminoácidos de uma proteína, chamada de estrutura primária, é especificada pela sequência de *códons*<sup>v</sup> do RNA mensageiro (RNAm)[1]. Durante o processo de tradução, a sequência de *códons* é traduzida na estrutura primária da proteína conforme mostrado na Tabela 2.1. Desta forma, as proteínas são um dos destinos finais da informação genética[3].

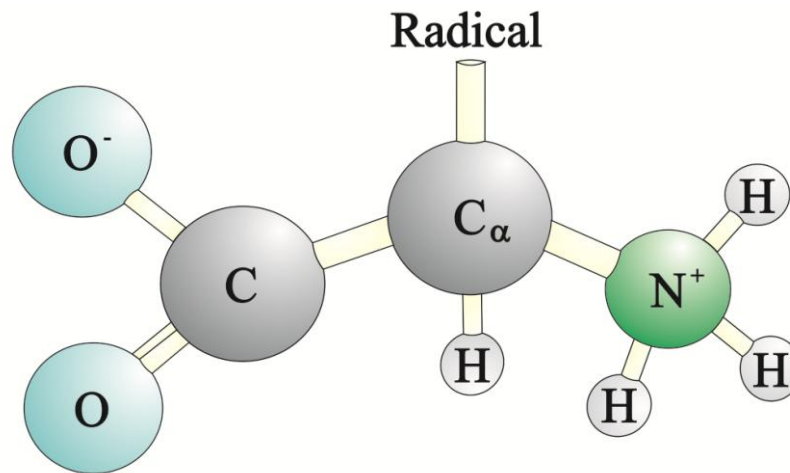
		2a Base			
		U	C	A	G
1a Base	U	UUU Fenilalanina UUC Fenilalanina UUA Leucina UUG Leucina	UCU Serina UCC Serina UCA Serina UCG Serina	UAU Tirosina UAC Tirosina UAA (Fim) UAG (Fim)	UGU Cisteína UGC Cisteína UGA (Fim) UGG Triptofano
	C	CUU Leucina CUC Leucina CUA Leucina CUG Leucina	CCU Prolina CCC Prolina CCA Prolina CCG Prolina	CAU Histidina CAC Histidina CAA Glutamina CAG Glutamina	CGU Arginina CGC Arginina CGA Arginina CGG Arginina
	A	AUU Isoleucina, Start AUC Isoleucina AUA Isoleucina AUG Metionina (Início)	ACU Treonina ACC Treonina ACA Treonina ACG Treonina	CAU Histidina CAC Histidina CAA Glutamina CAG Glutamina	AGU Serina AGC Serina AGA Arginina AGG Arginina
	G	GUU Valina GUC Valina GUA Valina GUG Valina, Start	GCU Alanina GCC Alanina GCA Alanina GCG Alanina	GAU Ácido aspártico GAC Ácido aspártico GAA Ácido glutâmico GAG Ácido glutâmico	GGU Glicina GGC Glicina GGA Glicina GGG Glicina

*Tabela 2.1 - Sequência de bases, códons, e respectivos aminoácidos transcritos. Importante notar que a variação da terceira base muitas vezes é irrelevante para definição do aminoácido.*

As proteínas encontradas em organismos eucariotos são sintetizadas a partir um repertório de vinte aminoácidos quirais<sup>vi</sup>, cuja estrutura está representada esquematicamente na Figura 2.2. Quimicamente cada aminoácido é formado por um carbono ( $C_{\alpha}$ ) ligado a um hidrogênio, um grupamento amina ( $NH_2$ ), uma carboxila ( $COOH$ ), e um radical, que diferencia cada aminoácido. Os radicais variam em tamanho, forma e propriedades químicas conforme apresentado na Figura 2.3.

<sup>v</sup> Códon é o conjunto de três bases nucleotídicas do RNA mensageiro [1].

<sup>vi</sup> Objeto quirais não podem ser superpostos à sua imagem no espelho. Os aminoácidos que formam proteínas presentes em organismos são definidos como sendo quirais do tipo L (*left*).



*Figura 2.2 - Representação esquemática da estrutura química de um aminoácido em pH 7.*

Dois aminoácidos podem ser ligados covalentemente pelos grupos carboxila e amina com formação de uma molécula de água numa ligação denominada peptídica. Por convenção, a extremidade amínica chamada de amino-terminal ou N-terminal é o início da cadeia e o carboxi-terminal é o fim da cadeia. Desta forma, proteínas contendo sequências invertidas de aminoácidos são diferentes. A cadeia formada por aminoácidos unidos por ligações peptídicas é chamada de cadeia principal e os diversos radicais formam a cadeia lateral. A constituição da cadeia principal é a mesma para qualquer proteína. O mesmo não ocorre para a cadeia lateral. As interações entre os radicais que compõem a proteína definem e mantêm seu estado de enovelamento.

## 2.2 Estrutura de proteínas

A ligação peptídica é rígida e planar, ou seja, todos os átomos da cadeia principal entre dois  $C_{\alpha}$  pertencem ao mesmo plano. Isto decorre da ressonância eletrônica (conjugação) entre a amina e a carbonila. Os ângulos entre a ligação do nitrogênio e o  $C_{\alpha}$  ( $\varphi$ ) além da ligação entre o carbono e o  $C_{\alpha}$  ( $\psi$ ) são variáveis (Figura 2.4). Os ângulos  $\varphi$  e  $\psi$  constituem graus de liberdade que permitem que a cadeia principal se enovele para, por exemplo, proteger os radicais hidrofóbicos do meio aquoso.

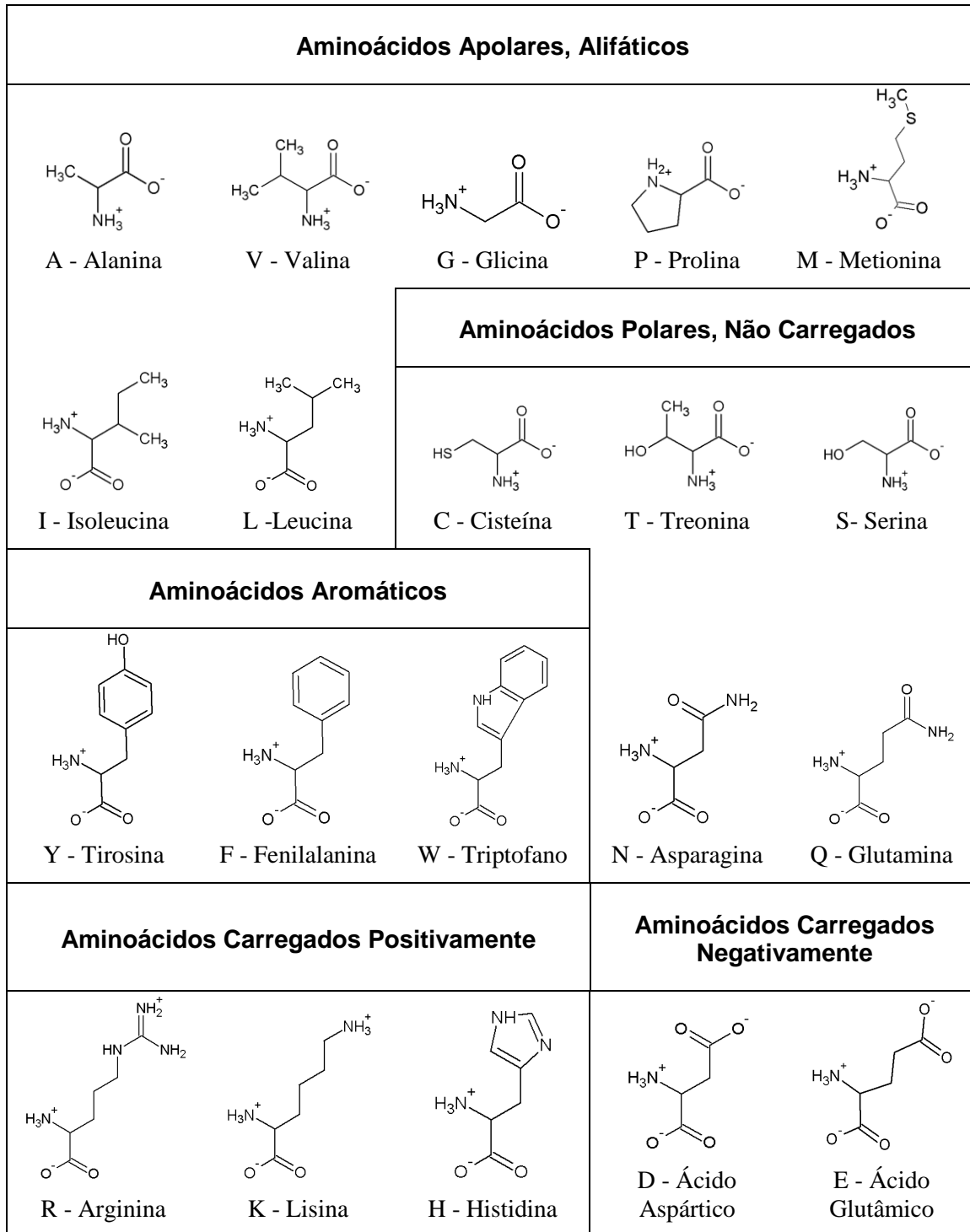


Figura 2.3 - L-aminoácidos em pH 7 encontrados em proteínas.



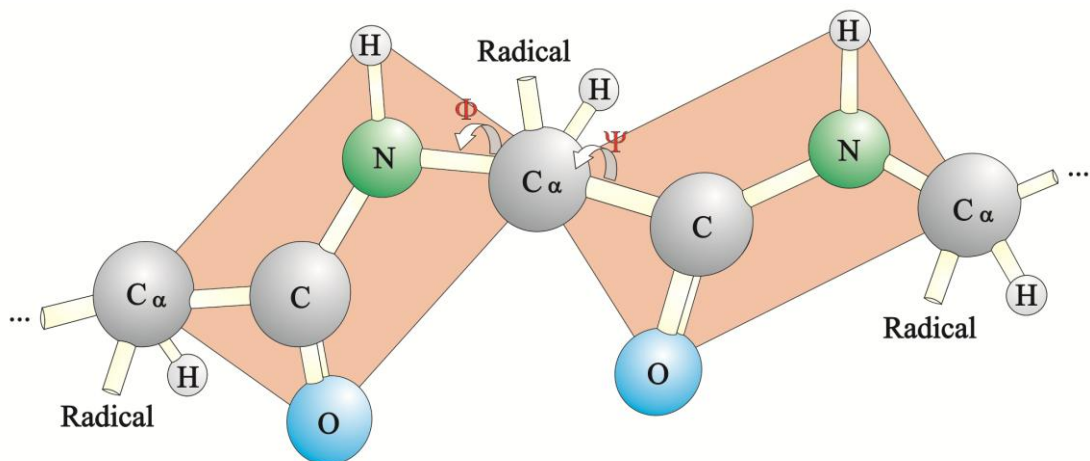


Figura 2.4- Definição de ângulos  $\phi$  e  $\psi$  na ligação peptídica.

Ligações de hidrogênio entre diferentes aminoácidos levam à formação de elementos de estrutura secundária chamados de hélices  $\alpha$  e folhas  $\beta$  na estrutura. O conjunto de domínios de uma proteína é chamado de estrutura secundária.

A hélice  $\alpha$  é uma estrutura em espiral que contém 3,6 resíduos de aminoácidos por volta. Esta estrutura é estabilizada por pontes de hidrogênio entre os grupamentos NH e CO da cadeia principal no interior da hélice (Figura 2.5).

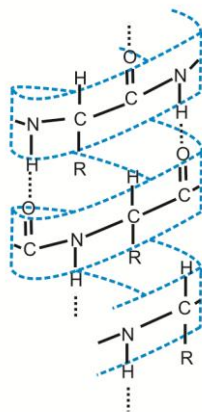


Figura 2.5 - Representação esquemática de uma hélice  $\alpha$ . As linhas pontilhadas em preto representam as ligações de hidrogênio que mantêm esta estrutura.

As folhas  $\beta$  são mantidas por ligações de Hidrogênio entre segmentos da cadeia principal. Neste caso os radicais em cada porção da cadeia principal ficam alternadamente acima e

abaixo do plano da folha  $\beta$  (Figura 2.6 e Figura 2.7). O conjunto de hélices  $\alpha$  e folhas  $\beta$  é denominado estrutura secundária.

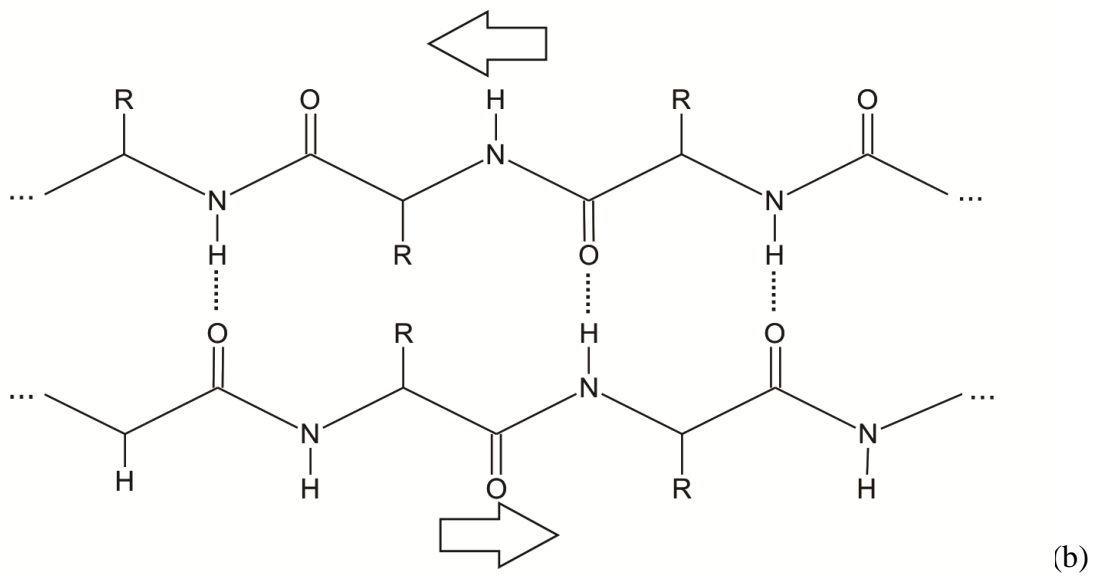
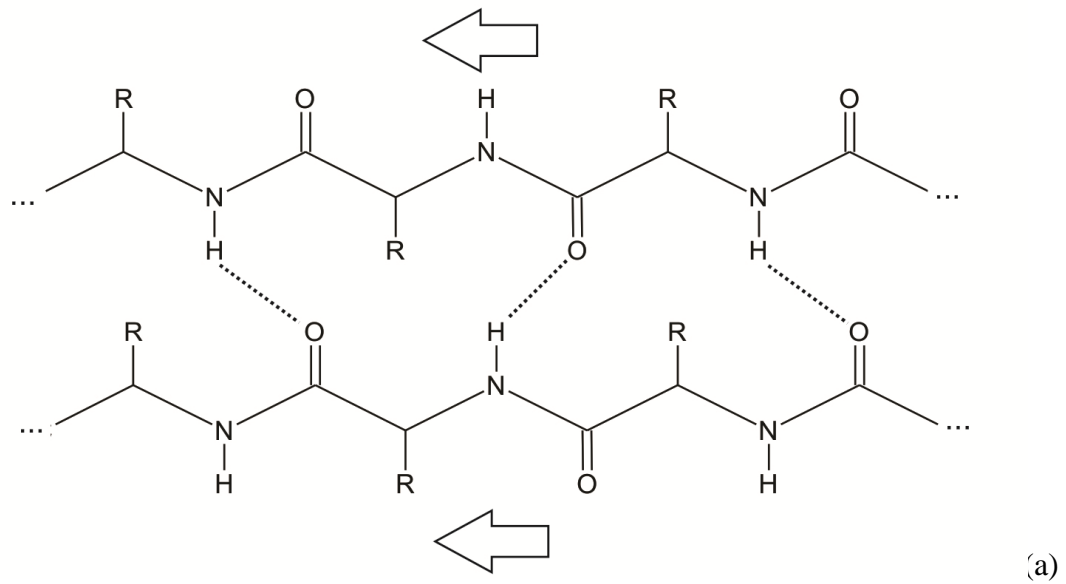
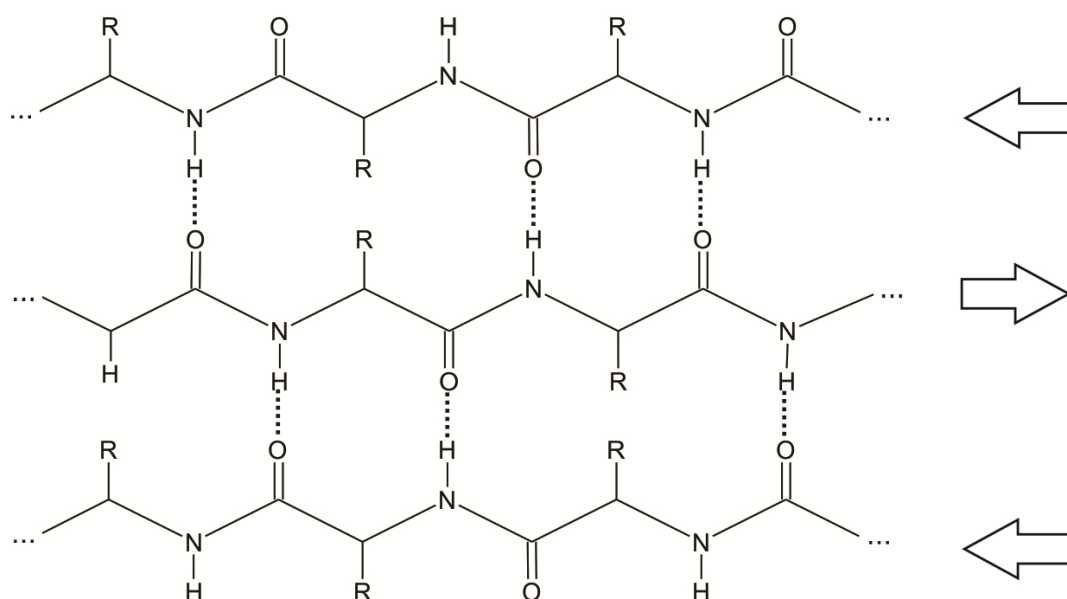


Figura 2.6 - Folhas  $\beta$  paralela (a) e antiparalela (b).



*Figura 2.7 - Folha  $\beta$  retorcida ou mista.*

Nem todas as combinações dos ângulos  $\varphi$  e  $\psi$  são permitidas para as estruturas secundárias devido a impedimentos estéricos, ou seja, devido ao tipo e estrutura tridimensional dos radicais. Ângulos e/ou conformações permitidas para cada aminoácido foram calculados pioneiramente por Ramachandran[16] utilizando um diagrama que possui eixos perpendiculares para os ângulos  $\varphi$  e  $\psi$ . As regiões sombreadas da Figura 2.8 representam os ângulos para os quais não há choque estérico.

A disposição espacial dos átomos é chamada estrutura terciária. Algumas proteínas são formadas por mais de uma cadeia principal. Neste caso, cada cadeia principal é denominada subunidade. O conjunto das cadeias que formam a proteína é a sua estrutura quaternária.

A função bioquímica que uma determinada proteína ou complexo desempenha depende de sua estrutura tridimensional. De forma simplificada, a configuração espacial das proteínas define sua função. Para elucidar a estrutura de proteínas em nível atômico, a técnica mais bem sucedida é a de difração de Raios X, conforme mostrado na Figura 2.1. Porém, o uso desta técnica prescinde da obtenção de amostras cristalinas para seu emprego. A complexidade e a multidisciplinaridade necessárias ao estudo de forma e função de proteínas levaram ao desenvolvimento de diversos grupos de pesquisa e até consórcios dedicados à produção, cristalização e resolução estrutural de proteínas em larga escala[17,18].

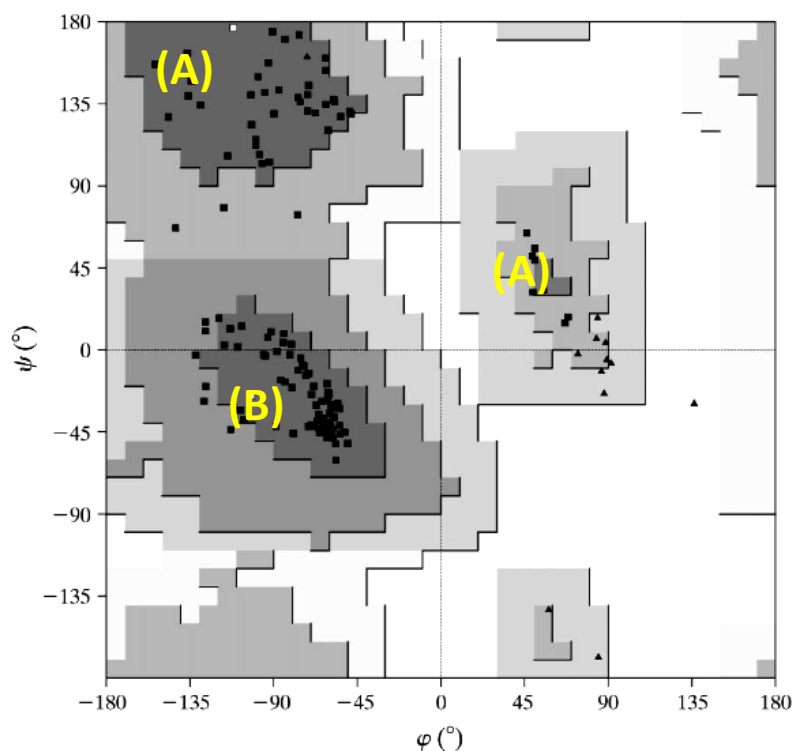


Figura 2.8 - Ramachandran Plot para a proteína Lisozima[19]. As regiões em cinza escuro (A) e (B) representam ângulos de conformações estericamente permitidas para hélices  $\alpha$  e folhas  $\beta$ , respectivamente.

## 2.3 Lisozima

Descoberta pelo higienologista Laschtschenko[20] e pelo biólogo Alexander Fleming[21], a lisozima é uma proteína que possui atividade antibacteriana e é encontrada nas lágrimas, saliva, clara de ovo e é produzida por certas espécies microbianas. A lisozima cliva certos carboidratos chamados peptidoglicanos rompendo a parede celular de certas bactérias<sup>vii</sup>, impedindo infecções bacterianas. Neste trabalho de investigação da influência da temperatura nas condições de crescimento de cristais de proteína, foi utilizada lisozima de ovos de galinha<sup>viii</sup> que possui 129 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 14296Da<sup>ix</sup>, com

<sup>vii</sup> Bactérias que possuem uma parede celular composta por peptidoglicanos são chamadas de Gram-positivo.

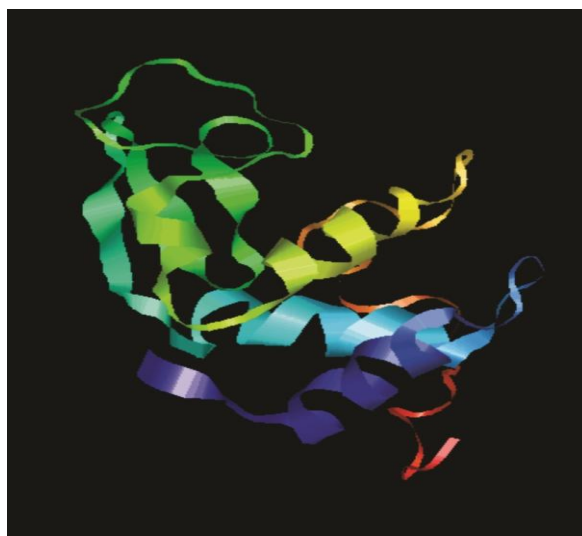
<sup>viii</sup> Produto obtido da empresa Sigma-Aldrich (62970).

<sup>ix</sup> Dalton é uma unidade de massa aproximadamente igual à massa de um átomo de Hidrogênio equivalente a  $1,660538921(73) \cdot 10^{-27}$  kg[22].

sequência de aminoácidos mostrada na Figura 2.9 e estrutura 3D representada na Figura 2.10. Esta proteína foi empregada neste trabalho pois suas condições de cristalização[9] e seu diagrama de fase são conhecidos[23].

```
KVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGSTDYGILQINSRWWCND  
GRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNC AKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGCLR
```

*Figura 2.9 - Sequência de aminoácidos que compõem a lisozima.*



*Figura 2.10 - Estrutura tridimensional da lisozima<sup>x</sup>.*

---

<sup>x</sup> Código PDB: 2LYZ.

## Capítulo 3 - Técnicas de Cristalização de Proteínas

Os materiais sólidos podem ser diferenciados dos demais devido a certas propriedades físicas tais como coeficientes de cisalhamento e compressibilidade volumétrica, bem como por características químicas como natureza das interações ou distância média entre os átomos.

Dentre os diversos produtos resultantes de processos agregativos existem os sólidos amorfos e os sólidos cristalinos. Assumiremos aqui sólidos cristalinos como materiais que apresentam ordem de longo alcance e quando investigados por técnicas de difração de Raios X apresentariam padrão de difração discreto[24]. Os sólidos amorfos são caracterizados pela ausência de organização de longo alcance.

Conforme apresentado no Capítulo 2, as proteínas são polímeros de um número finito de aminoácidos. Consequentemente, os grupos carregados na superfície destas possibilitam interações intermoleculares que podem permitir a agregação de sólidos cristalinos. É importante ressaltar que atualmente a obtenção das condições ótimas para cristalização de proteínas é feita por tentativa e erro.

Os primeiros estudos descritivos sobre cristalização de proteínas datam de meados do século XIX[9]. Nestes trabalhos pioneiros as proteínas eram extraídas de sangue ou de sementes de plantas. No entanto, com o surgimento da Biologia Molecular com técnicas de clonagem, expressão e purificação de proteínas[3] tornou-se possível obter soluções de proteína com concentração suficiente para cristalização, o que dificilmente seria obtido por extração.

O aumento exponencial do número de submissões no PDB[15] de estruturas proteicas obtidas por difração de raios X (Figura 3.1) nos últimos anos justifica a importância de estudos para entender o processo de cristalização e para torná-lo mais assertivo.

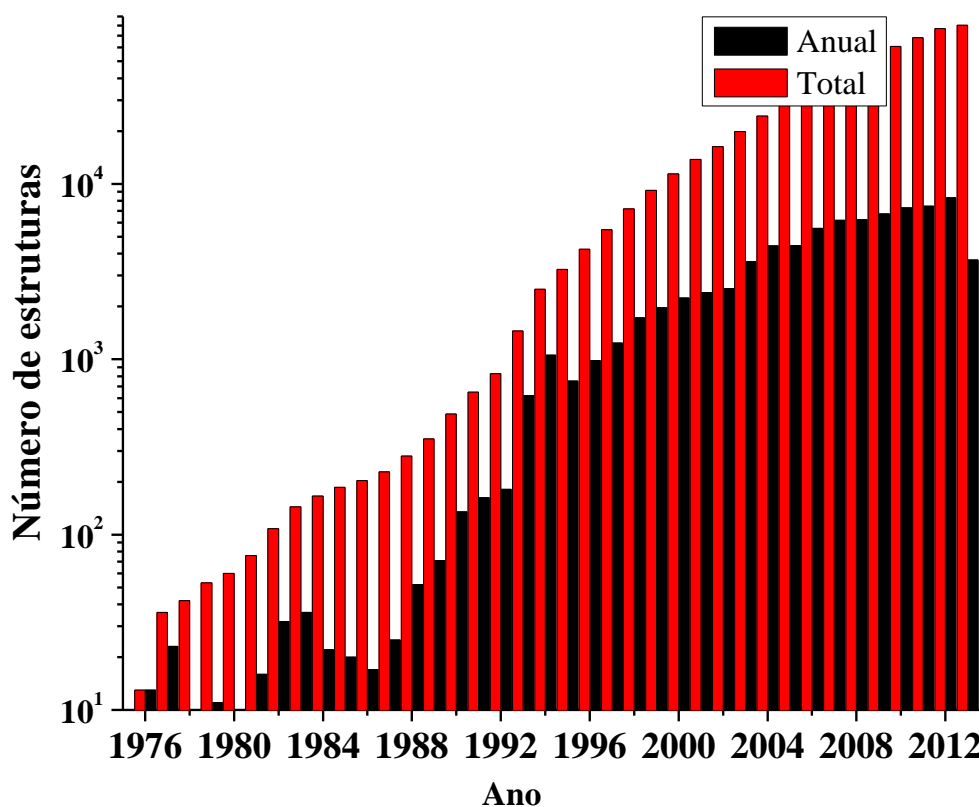


Figura 3.1 - Número total e anual de estruturas submetidas ao PDB.

### 3.1 Diagramas de fase e Supersaturação

O processo de cristalização pode ser dividido em três etapas: nucleação, crescimento e fim do crescimento[9]. Durante a nucleação os monômeros se agregam até atingir tamanho suficiente para iniciar o crescimento, chamado de raio crítico. Após a formação de agregados com tamanho igual ou superior a este raio, estes podem crescer e formar agregados cristalinos ou amorfos. Quando a concentração de proteína atinge a saturação o crescimento é interrompido.

Uma molécula de proteína estará em fase aquosa se a concentração de proteína em solução for inferior à solubilidade<sup>xi</sup>. Se a concentração ultrapassa este limite, as moléculas excedentes em solução tendem a formar uma nova fase sólida, que pode ser amorfa ou cristalina. A

<sup>xi</sup> Solubilidade é a concentração máxima de um soluto em solução, para a qual não ocorre formação de precipitado.

solubilidade de proteínas em solução pode variar com os diversos parâmetros físico-químicos da solução. O diagrama de fase de proteínas representa a solubilidade de proteína em relação a fatores importantes para o sistema como concentração de precipitantes, temperatura e pH[25]. A Figura 3.2 apresenta o digrama de fase para a Lisozima em relação à temperatura e a concentração de NaCl.

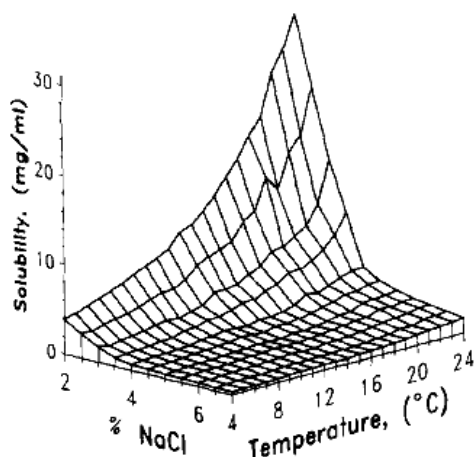


Figura 3.2 - Diagrama de fase para Lisozima[23].

Um parâmetro utilizado para quantificar o processo de cristalização é o grau de supersaturação(S), definido pela razão entre a concentração de proteína e a solubilidade[26]. Soluções com concentração de soluto inferior à solubilidade são chamadas insaturadas, e soluções com concentração de soluto superior à solubilidade são chamadas de supersaturadas. Este fator será empregado no Capítulo 4 nos cálculos da energia livre do processo de cristalização.

A curva de solubilidade de proteína representa o limite de saturação. Abaixo desta curva, todo o material está dissolvido na solução. Para baixos graus de supersaturação, a taxa de nucleação será lenta e nenhum cristal é formado em intervalos de tempo razoáveis[25]. Se a supersaturação for superior, fenômenos agregativos poderão ocorrer e culminar na formação de cristais ou agregados amorfos.

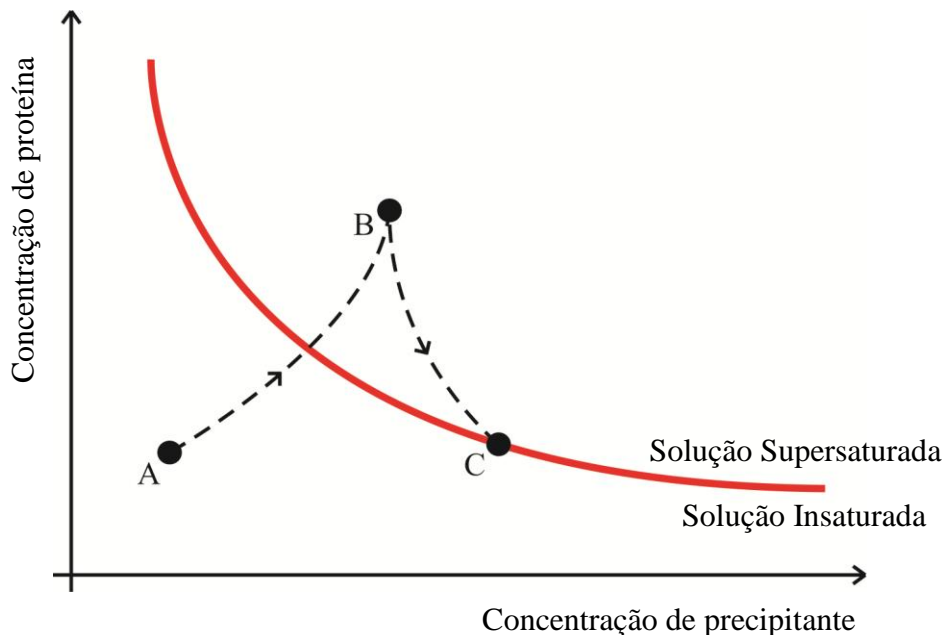
Todos os métodos de cristalização são artifícios utilizados para atingir o estado supersaturado. O que diferencia cada método é como o sistema evolui sobre o diagrama de fase. Em alguns casos a maneira como propriedades físico-químicas do meio mudam é crucial para a formação de cristais[27]. Os métodos convencionais mais bem sucedidos de cristalização de macromoléculas consistem em reduzir isotermicamente a solubilidade destas partículas em solução aquosa[28]. Desta forma são estabelecidas condições termodinâmicas que favorecem



interações entre estas partículas que podem resultar na formação de precipitados amorfos e/ou sólidos cristalinos.

O processo de cristalização é iniciado quando a concentração de proteína supera a curva de saturação, como esquematizado na Figura 3.3. Quando a taxa de ganho se iguala à de perda de material no precipitado a cristalização termina.

A redução da solubilidade das proteínas em solução aquosa pode ser obtida com ajuda de agentes precipitantes bem como por trocas de solvente envolvendo difusão de vapor. Kits comerciais de precipitantes contendo centenas de soluções são rotineiramente utilizados para cristalização. Estes precipitantes incluem soluções tamponadas em diversos pHs, sais, solventes e aditivos orgânicos, detergentes e polímeros[5,6].



*Figura 3.3 - Diagrama de fase representando o método de difusão de vapor. No processo A→B, a perda de vapor leva o sistema a atingir a supersaturação. Posteriormente no processo B→C ocorre redução da concentração devido ao processo de agregação até o sistema entrar em equilíbrio no ponto C.*

## 3.2 Métodos de Cristalização

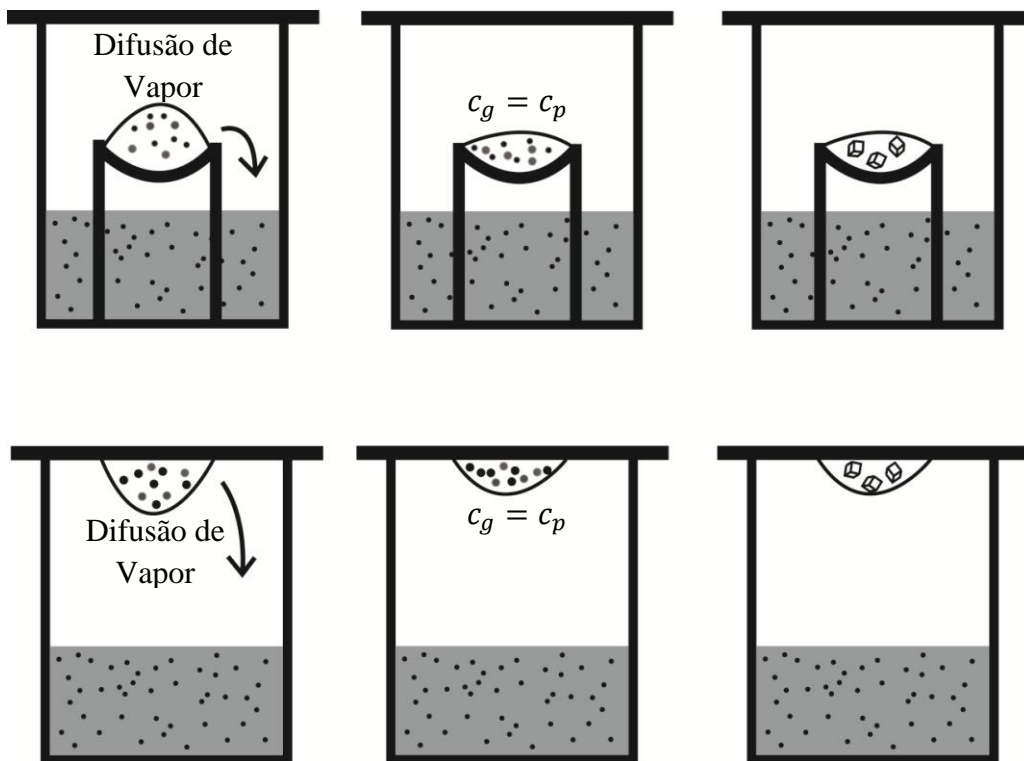
### 3.2.1 Batch

É o método mais simples e um dos mais antigos utilizados em cristalização de proteínas[9]. Consiste em misturar a solução contendo proteína e a solução precipitante. Após a mistura espera-se que a solubilidade de proteínas em solução diminua fazendo com que o sistema evolua para a região do diagrama de fase acima da curva de solubilidade, onde pode ocorrer a formação de cristais. Neste método, o estado B da Figura 3.3 é obtido pela mistura das soluções.

### 3.2.2 Difusão de Vapor

Nesta técnica, um solvente difunde isotermicamente sob a forma de vapor de uma solução menos concentrada em precipitante e contendo proteína para uma solução mais concentrada em precipitante no poço. Isto aumenta a concentração do agente precipitante e de proteína na gota. O método possui duas variantes: gota depositada (*sitting drop*) e gota pendurada (*hanging drop*)[9]. Na primeira delas, uma gota contendo uma mistura da solução da proteína e do poço fica assentada em um patamar e na segunda a gota fica em suspensão na lâmina de vidro que cobre o poço conforme mostrado na Figura 3.4.

É importante observar que nestas técnicas a cristalização pode ocorrer somente quando a solução inicialmente insaturada atingir uma concentração acima da solubilidade. Desta forma, moléculas de proteína em solução podem precipitar e formar agregados cristalinos, precipitados amorfos ou permanecer em estado metaestável durante certo tempo dependendo do grau de supersaturação.



*Figura 3.4 - Diagrama para Gota depositada (a) e Gota pendurada (b), respectivamente. As setas evidenciam o sentido da difusão de solvente que ocorre devido a diferença de concentração de precipitante entre a gota ( $c_g$ ) e o poço ( $c_p$ ). Enquanto ocorre difusão de vapor a concentração de proteína e precipitante na gota aumentam, podendo ocorrer cristalização.*

## Capítulo 4 - Modelos de agregação de proteínas

A agregação de proteínas pode culminar tanto na formação de material amorfo como cristalino. Devido à diversidade de radicais presentes na superfície de uma proteína não é possível prever quais interações desencadeiam o processo de cristalização ou o processo de formação de agregados amorfos. Entretanto é importante salientar que estas interações são fortemente dependentes de parâmetros físico-químicos como temperatura, pH e força iônica.

No caso da cristalização, moléculas em solução com orientações aleatórias passam a interagir mais fortemente entre si do que com o meio. Estas interações favorecem o ordenamento espacial de proteínas para a formação de um sólido cristalino em detrimento da permanência destas no meio aquoso. Portanto, a formação de agregados proteicos que apresentam ordenamento é proveniente de alterações físico-químicas do meio que dificilmente seriam promovidas *in vivo*[9]. A formação de agregados amorfos de proteínas está associada a certas enfermidades humanas ainda não completamente compreendidas como Mal de Alzheimer, Mal de Parkinson, doença de Creutzfeld-Jacob (vulgarmente conhecida como 'doença da vaca-louca') e doenças priônicas[29,30].

O processo de cristalização é usualmente dividido em três etapas: nucleação, crescimento e fim do crescimento[4,9]. As propriedades físico-químicas (pH, temperatura, concentração de precipitantes, etc.) do meio também afetam o regime de agregação e conseqüentemente as etapas de cristalização. A nucleação por exemplo pode ocorrer em intervalos de tempo que variam segundos a meses, dependendo do meio[31].

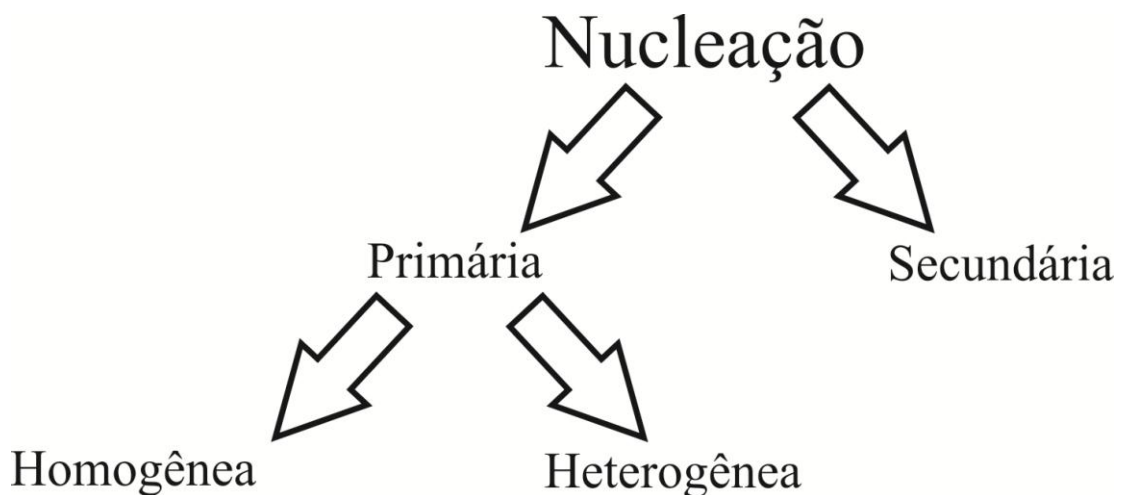
Estudos quantitativos do processo de cristalização podem contribuir para aumentar a eficácia na produção de amostras cristalinas de proteínas para experimentos de difração de raios X bem como a qualidade destas. Nas seções a seguir serão apresentados a Teoria Clássica de nucleação e os regimes de crescimento.

## 4.1 Teoria Clássica

Considere que uma certa massa de soluto no estado sólido é adicionada a um meio líquido contendo um solvente. Dizemos que esta solução está insaturada se a solução puder dissolver toda a massa do soluto. A concentração na qual ocorre equilíbrio entre ganho e perda de moléculas/átomos de soluto entre as fases líquidas e sólidas é chamada de solubilidade. Quando uma solução de proteína está supersaturada, com massa de soluto dissolvida maior que a solubilidade, esta deveria retornar ao estado de equilíbrio precipitando proteína até atingir a solubilidade. Todavia é observado empiricamente que o sistema precisa atingir certo nível de supersaturação para que o processo de cristalização se inicie.

Em outras palavras, os primeiros agregados precisam vencer uma barreira probabilística para efetivamente continuar seu crescimento. Este processo é chamado de nucleação e pode ocorrer de forma espontânea ou por meio de estímulos externos. A Figura 4.1 apresenta os diferentes mecanismos de nucleação.

A seguir será apresentada a Teoria Clássica de Nucleação, que foi introduzida pelo físico estadunidense Gibbs[33] e recebeu outras contribuições durante a primeira metade do século XX[34].



*Figura 4.1 - Tipos de Nucleação. Adaptado de [35].*

### 4.1.1 Nucleação homogênea

Considere que as unidades de crescimento apresentam movimento Browniano em solução[36]. No caso do presente estudo, as unidades de crescimento podem ser aminoácidos ou conjuntos de aminoácidos. Durante as colisões aleatórias, radicais de aminoácidos de diferentes unidades estão perto o suficiente para sofrer a ação de forças atrativas ou repulsivas.

Também há uma contribuição do meio para estas forças. Durante ensaios de cristalização o ambiente químico da solução é alterado como tentativa de promover a formação de agregados cristalinos. Isto pode implicar em alterações do raio de solvatação das proteínas em solução mas, não há garantia de formação de agregados. Desta forma, o início do processo de cristalização é essencialmente probabilístico.

Para que haja a formação de um agregado as interações repulsivas são minimizadas nos contatos entre as unidades, mas podem ocorrer na superfície externa do agregado. Em outras palavras, a variação da energia livre de Gibbs durante a formação e crescimento de um agregado possui um termo de repulsão ( $\Delta G_A$ ) diretamente proporcional à área  $A$  exposta ao meio externo:

$$\Delta G_A = A \cdot \gamma \quad (1),$$

onde  $\gamma$  é a tensão superficial e um termo de atração ( $\Delta G_V$ ) que depende da variação do potencial químico durante a cristalização:

$$\Delta G_V = n \cdot (\mu_{\text{sol}} - \mu_{\text{cristal}}) \quad (2),$$

$$\Delta G_V = -nK_b T \ln S \quad (3),$$

onde  $n$  é o número de partículas,  $S$  é a supersaturação,  $T$  é a temperatura e  $K_b$  é a constante de Boltzmann<sup>xii</sup>.

Considere que o agregado é uma esfera de raio  $r$ . Podemos reescrever o número de partículas como a razão entre o volume do agregado e o volume molar da unidade. Temos então:

$$\Delta G_V = -\frac{4\pi r^3}{3v} K_b T \ln S \quad (4).$$

A energia livre total ( $\Delta G$ ) é a soma da parcela atrativa e da repulsiva:

---

<sup>xii</sup>  $K_b = 1,38 \cdot 10^{23} \text{m}^2 \text{kg/sK}$

$$\Delta G = -\Delta G_V + \Delta G_A \quad (5),$$

$$\Delta G = -\frac{4\pi r^3}{3v} K_b T \ln S + 4\pi r^2 \gamma \quad (6).$$

A Figura 4.2 apresenta os diferentes regimes de formação de agregados. A variação de energia livre máxima ocorre para agregados que possuem raio chamado raio crítico ( $r_c^*$ ). Este raio é obtido pela otimização de  $\Delta G$ :

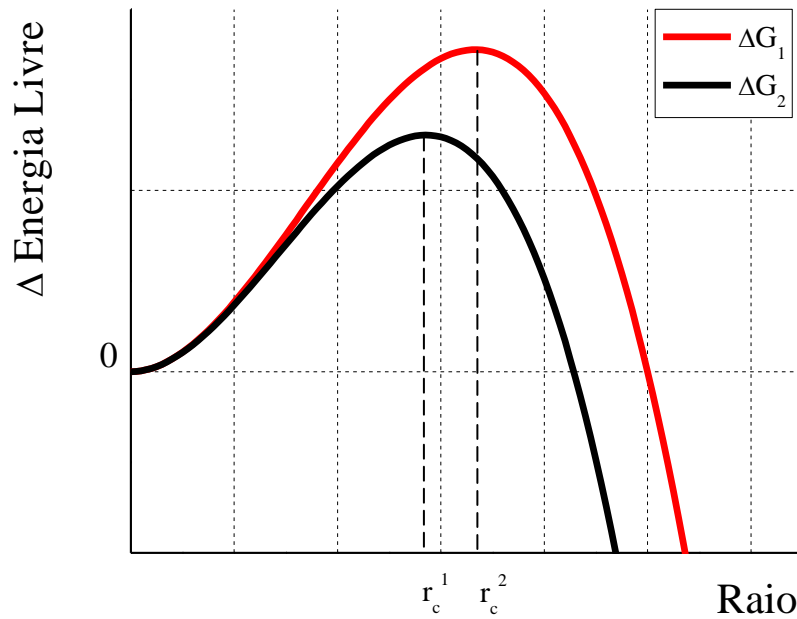
$$\frac{\partial(\Delta G)}{\partial r} = 0 \quad (7),$$

e é dado por:

$$r_c = \frac{2v\gamma}{K_b T \ln S} \quad (8).$$

O valor máximo de  $\Delta G$  é dado por:

$$\Delta G_c = \frac{16\pi v^2 \gamma^3}{3(K_b T \ln S)^2} \quad (9).$$



*Figura 4.2 - Energia livre de cristalização de sistemas com temperaturas e supersaturações diferentes ( $\Delta G_1 \neq \Delta G_2$ ) e conseqüentemente raios críticos diferentes ( $r_c^1 \neq r_c^2$ ).*

O raio crítico  $r_c$  é inversamente proporcional à temperatura e ao logaritmo da supersaturação. Desta forma, a Teoria Clássica de Nucleação prevê que a temperatura em que a nucleação ocorre influencia o tamanho dos raios críticos, conforme apresentado na Figura 4.2. No

entanto, há casos de proteínas cuja supersaturação depende não somente da temperatura, como por exemplo do pH do meio[23].

Contudo, a Teoria Clássica é falha por não prever fenômenos comuns durante a cristalização de proteínas tais como a formação de padrões líquidos[27], de mudanças de fase líquido-líquido[37] e os tempos transientes de nucleação[10].

A teoria de DVLO (Deryagin-Landau-Verwey-Overbeek) leva em consideração as repulsões estéricas e eletrostáticas e as atrações de van der Waals das moléculas de proteína em solução e prevê a existência de um de mínimo no potencial de agregação de proteínas e de pontos de mínimo secundários, dependendo concentração de sal em solução[31]. A existência destes mínimos secundários do potencial implica que durante os estágios iniciais o sistema pode formar agregados que nunca formarão cristais.

#### **4.1.2 Nucleação heterogênea e nucleação secundária**

A nucleação heterogênea ocorre na presença de partículas exógenas ao meio de cristalização ou nas interfaces com o meio externo. Estudos sugerem que estes agentes atuam na estabilização de núcleos pré-críticos viabilizando o crescimento de cristais em muitos casos [38,39].

Outra forma de estimular o processo de cristalização é a nucleação secundária que consiste na adição de pequenos cristais da mesma proteína em solução supersaturada. Estes cristais tendem a crescer recebendo moléculas de proteína em excesso na solução. No entanto, este procedimento conhecido como *seeding* (semeadura) necessita da obtenção prévia de cristais [9].

### **4.2 Regimes de Crescimento**

Quando o agregado cristalino atinge o tamanho crítico, seu crescimento se torna termodinamicamente favorável. Estes agregados podem ser considerados partículas coloidais<sup>xiii</sup>.

---

<sup>xiii</sup> Partículas coloidais possuem dimensões da ordem de 1nm a 1µm.



A agregação poderia ser limitada pela difusão (DLA) ou pela reação (RLA). No regime DLA a constante de difusão do meio, a dimensão das partículas e o seu número são parâmetros limitantes para a agregação. Neste caso as partículas interagem fortemente por atrações de van der Waals e as repulsões eletrostáticas são desprezíveis. A evolução temporal do raio das partículas em crescimento é dada por:

$$R(t) = R_0(1 + ct)^{\frac{1}{d_f}} \quad (10),$$

onde  $R_0$  é o raio dos monômeros,  $c$  é a probabilidade de colisões entre partículas e  $d_f$  é a dimensão fractal[40]. No regime RLA, a força iônica do meio é grande o suficiente para promover uma barreira de nucleação e o crescimento das partículas é exponencial[41].

Entretanto, dependendo das propriedades do meio e da estrutura dos agregados o regime de crescimento pode sofrer alterações não previstas na teoria. Neste caso, fazem-se necessários novos modelos empíricos para explicar dados experimentais.

## Capítulo 5 - Espalhamento Dinâmico de Luz

Quando luz incide sobre partículas coloidais, o campo elétrico da luz induz dipolos elétricos oscilantes, de forma que cada átomo ou molécula se torna uma fonte secundária de luz e conseqüentemente uma fonte de luz espalhada. Esta interação provoca mudanças na intensidade, direção (momento) e frequência (energia) da onda incidente. A análise da radiação espalhada permite a determinação de propriedades estruturais estáticas e dinâmicas utilizando técnicas de Espalhamento Estático de Luz (*Static Light Scattering* - SLS) e de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering* - DLS) respectivamente.

Também conhecida na literatura como *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS)[42] e *Quasi-elastic Light Scattering* (QELS)[43], o DLS é uma técnica espectroscópica utilizada para analisar *in situ* as flutuações de intensidade da luz espalhada por partículas em suspensão e determinar a evolução temporal da distribuição de raios hidrodinâmicos médios dos espalhadores e outras propriedades dinâmicas[44]. O advento do Laser em meados do século XX permitiu o estudo de fenômenos de espalhamento de partículas com tamanho da ordem de nanômetros a centenas de micrometros[42].

A técnica de DLS tem sido fundamental em estudos de diversas áreas como análise de regimes de crescimento de partículas[45]; produção de fármacos[46], caracterização e produção de nanomateriais[47] e polímeros[48]; motilidade de microorganismos[49]; estabilidade e agregação de macromoléculas[43]; estudos de fluidos complexos; padronização de processos industriais entre outros.

### 5.1 Teoria de Espalhamento de Luz

As seções a seguir apresentam os fundamentos teóricos que permitem extrair informação sobre a distribuição de raios médios dos espalhadores bem como seu regime de crescimento durante agregação/cristalização a partir das flutuações de intensidade luz espalhada por partículas em suspensão[42,44].

### 5.1.1 Flutuações e função de correlação temporal

Dado um sistema de  $n$  partículas em movimento browniano, considere uma propriedade mecânica  $A$  deste sistema, tal que:

$$A(\Gamma_t) \equiv A(q_1(t), \dots, q_n(t), p_1(t), \dots, p_n(t)) \quad (11),$$

onde  $\Gamma_t$  representa o estado instantâneo no espaço de fase composto pelas posições generalizadas  $q_1, \dots, q_n$  e momentos generalizados  $p_1, \dots, p_n$  das partículas. Uma medida da correlação de  $A$  no estado  $\Gamma_t$  é dada por:

$$\langle A(\Gamma_t) \rangle = \int A(\Gamma_t) \rho(\Gamma_t) d\Gamma_t \quad (12),$$

onde  $\rho(\Gamma_t) d\Gamma_t$  representa a probabilidade de encontrar o sistema no estado  $\Gamma_t$ . Considerando que todos os estados são igualmente prováveis, ou seja, o sistema em questão é ergódico e independente dos instantes de tempo anteriores, a propriedade  $A$  flutua em torno de seu valor médio:

$$\langle A(t) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t) dt \quad (13).$$

Dessa forma, para dois instantes de tempo  $t$  e  $t + \tau$  a propriedade  $A$  varia pouco se  $\tau$  tende a zero e sofre grande variação se  $\tau$  é grande. A relação entre a propriedade  $A$  nos instantes de tempo dados é expressa pela função de auto-correlação dada por:

$$\langle A(t)A(t + \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t)A(t + \tau) dt \quad (14).$$

Caso a propriedade  $A$  seja não conservativa e não periódica, a função de autocorrelação possui os seguintes limites:

$$\lim_{T \rightarrow 0} \langle A(t)A(t + \tau) \rangle = \langle A^2 \rangle \quad (15),$$

$$\lim_{T \rightarrow \infty} \langle A(t)A(t + \tau) \rangle = \langle A \rangle^2 \quad (16),$$

ou seja,  $A$  será máxima para  $T \rightarrow 0$  e mínima para  $T \rightarrow \infty$ , conforme apresentado na Figura 5.1.

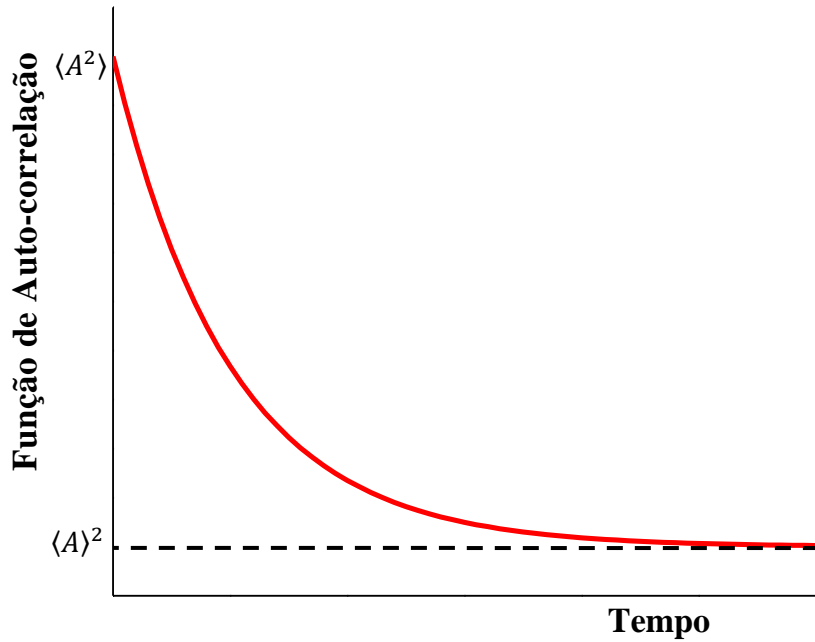


Figura 5.1- Função de autocorrelação temporal.

A função de auto-correlação normalizada de primeira ordem ( $C(\tau)^{(1)}$ ) e segunda ordem ( $C(\tau)^{(2)}$ ) são definidas por:

$$C(\tau)^{(1)} = \frac{\langle A(t)A(t+\tau) \rangle}{\langle |A(t)|^2 \rangle} \quad (17),$$

$$C(\tau)^{(2)} = \frac{\langle A(t)^2 A(t+\tau)^2 \rangle}{\langle |A(t)|^2 \rangle^2} \quad (18).$$

## 5.1.2 Teoria Eletromagnética

Considere um meio espalhador não magnético, não condutor e não absorutivo com tensor constante dielétrica dada por:

$$\epsilon(\vec{r}, t) = \epsilon_0 I + \delta\epsilon(\vec{r}, t) \quad (19),$$

onde  $\delta\epsilon(\vec{r}, t)$  é a flutuação do tensor constante dielétrica devido ao movimento das partículas espalhadoras. Dado um campo elétrico se propagando na direção  $\hat{n}_i$  com amplitude  $E_0$ , frequência angular  $\omega_i$  e vetor de onda  $\vec{k}_i$ , dado por:

$$\vec{E}_1(\vec{r}, t) = \hat{n}_i E_0 e^{i(\vec{k}_i \cdot \vec{r} - \omega_i t)} \quad (20).$$

Utilizando as equações de Maxwell e as relações entre os campos totais e os campos incidente (i) e espalhados (s):

$$\vec{E} = \vec{E}_i + \vec{E}_s \quad (21),$$

$$\vec{D} = \vec{D}_i + \vec{D}_s \quad (22),$$

$$\vec{M} = \vec{M}_i + \vec{M}_s \quad (23).$$

O campo elétrico espalhado a uma distancia  $R$  com propagação na direção  $\widehat{n}_s$ , frequência angular  $w_f$  e vetor de onda  $\vec{k}_f$  é dado por:

$$E_s(\vec{R}, t) = -\frac{k_f^2 E_0}{4\pi R \epsilon_0} e^{i(\vec{k}_f \cdot \vec{R} - w_f t)} \delta\epsilon(\vec{q}, t) \quad (24),$$

onde  $\delta\epsilon_{if}(\vec{q}, t) \equiv n_f \cdot \delta\epsilon(\vec{r}, t) \cdot n_i$  e  $\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_f$  com  $q = 2k_i \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$  para espalhamento elástico, ou seja,  $|\vec{k}_i| \approx |\vec{k}_f|$ . A função de auto-correlação para este campo é dada por:

$$\langle E_s(\vec{R}, t) E_s(\vec{R}, t + \tau) \rangle = -\frac{k_f^4 E_0^2}{16\pi^2 R^2 \epsilon_0^2} e^{i(\vec{k}_f \cdot \vec{R} - w_f t)} \langle \delta\epsilon(\vec{q}, t) \delta\epsilon(\vec{q}, t + \tau) \rangle e^{-i(w_i t)} \quad (25).$$

A densidade espectral  $I_{if}^E(\vec{q}, w)$  da função de auto-correlação de primeira ordem do campo elétrico espalhado é dada por:

$$I_{if}^E(\vec{q}, w, R) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \langle E_s(\vec{R}, t) E_s(\vec{R}, t + \tau) \rangle e^{-i(wt)} dt \quad (26),$$

$$I_{if}^E(\vec{q}, w, R) = \frac{1}{2\pi} \frac{k_f^4 E_0^2}{16\pi^2 R^2 \epsilon_0^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \langle \delta\epsilon(\vec{q}, t) \delta\epsilon(\vec{q}, t + \tau) \rangle e^{i w_f t} dt \quad (27),$$

onde  $w \equiv w_i - w_f$  e  $I_0 = |E_0|^2$ . Podemos concluir que os eventos de espalhamento produzem uma mudança  $\vec{q}$  no vetor de onda incidente e  $w$  na frequência angular incidente devido às flutuações da constante dielétrica. No entanto, a grandeza medida em experimentos de espalhamento dinâmicos de luz é a densidade espectral da função de auto-correlação de segunda ordem do campo elétrico, dada por:

$$I_{if}^I(\vec{q}, w, R) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} C^{(2)}(\tau) e^{i w t} dt \quad (28),$$

onde  $C^{(2)}(\tau) = \langle I_s(\vec{R}, 0) I_s(\vec{R}, t) \rangle$  e a intensidade de luz espalhada é dada por  $I_s(R, t) = |E(R, t)|^2$ .

# Capítulo 6 - Difração de Raios X

## 6.1 Cristais

A matéria pode ser classificada nos estados físicos gasoso, líquido e sólido, dependendo de suas características macroscópicas, como dureza e compressibilidade, e microscópicas, como distância interatômica ou intermolecular e homogeneidade. Diversos sólidos apresentam estrutura cristalina, ou seja, ordenamento de longo alcance dos átomos e/ou moléculas que o compõem. Estes materiais constituem o objeto de estudo da Cristalografia, ciência que se ocupa do estudo da estrutura à nível atômico.

Se incidirmos radiação no comprimento de onda dos raios X (da ordem de  $10^{-10}$  m) sobre um cristal, observaremos um padrão de interferências construtivas e destrutivas causados pela difração, conforme mostrado pelo experimento de Max von Laue de 1912[50]. A localização espacial, as intensidades e as fases da radiação difratada podem ser utilizadas para reconstruir a estrutura cristalina de um sólido cristalino[51]. O sucesso deste procedimento depende da qualidade do cristal que pode variar tanto devido às propriedades químicas dos seus constituintes quanto pelos parâmetros termodinâmicos durante a cristalização.

## 6.2 Redes cristalinas

Considere dois objetos idênticos separados de uma certa distância que formam uma decoração de um cristal. Suponha que o segundo objeto seja gerado à partir da atuação de uma operação do tipo translação, rotação, inversão e/ou por combinação delas. Considere que todas as operações enunciadas podem ser descritas por operações que mantêm um ponto do espaço fixo (rotações de  $2\pi/n$ , com  $n=1,2,3,4$  e  $6$ , inversão, rotoinversão - combinação de rotação e inversão) e/ou por outros elementos que combinam estes com translações semi-inteiras dos parâmetros que descrevem a periodicidade da rede (planos de deslizamento e eixos helicoidais). Dois objetos serão ditos simétricos se após sofrer a operação sua vizinhança for invariante. Utilizando esta construção podemos gerar todos os objetos do arranjo à partir

destas operações de simetria, mas nem todas as operações podem ser encontradas em cristais. Em cristais de proteínas, por exemplo, apenas elementos de simetria que não mudam a quiralidade podem ser observados. Portanto, eles não possuem inversão nem rotoinversões.

A unidade fundamental de um cristal, ou seja, o paralelepípedo de menor volume com lados  $a_i$  ( $i=1,2,3$ ) que se repete nas três direções do espaço ao longo do material por translação, é chamada de célula unitária. A unidade assimétrica representa o menor volume contendo um átomo, uma molécula ou conjunto de átomos e moléculas, necessário(s) para descrever a estrutura tridimensional do sólido levando em conta todas as operações de simetria observadas no cristal.

Os sistemas de referência utilizados em cristalografia são definidos pelos vetores  $a_i$  ( $i=1,2,3$ ), cujo volume e geometria definem a célula unitária. As relações entre os módulos dos parâmetros de rede ( $a,b,c$ ) e os ângulos ( $\alpha,\beta,\gamma$ ) são determinados pelos elementos de simetria possíveis. Existem sete tipos de células unitárias ou sistemas cristalinos. Em outras palavras, existem sete conjuntos de restrições impostas sobre os vetores  $a_i$  ( $i=1,2,3$ ) para descrever as células unitárias de sólidos cristalinos, conforme apresentado na Tabela 6.1.

Sistema	Elementos principais	Restrição nas bases	Restrição nos ângulos
Triclínico	$2\pi/1$	nenhuma	Nenhuma
Monoclínico	$2\pi/2$	nenhuma	$\alpha = \gamma = 90^\circ$
Ortorrômbico	3 eixos $2\pi/2$	nenhuma	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonal	$2\pi/4$	$a=b$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Hexagonal,	$2\pi/6$	$a=b$	$\alpha = \beta = 90^\circ \gamma = 120^\circ$
Trigonal	$2\pi/3$	$a=b$	$\alpha = \beta = 90^\circ \gamma = 120^\circ$
Cúbico	3 eixos $2\pi/3$	$a=b=c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

*Tabela 6.1 - Tipos de células unitárias e suas respectivas restrições geométricas. Sistema Hexagonais e Trigonais possuem células unitária com mesma geometria, mas com elementos de simetria distintos.*

O fenômeno de difração ocorre devido as interferências das ondas espalhadas pelos elétrons dos átomos do cristal. A descrição matemática de um cristal será utilizada nas seções seguintes para descrever fisicamente o fenômeno de difração.

## **6.3 Teoria de Espalhamento de raios X**

A descoberta dos raios X foi reportada pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen em 1898[52]. Nesta época não havia aparato para medir o comprimento de onda desta radiação e efeitos como interferência e refração[53]. Neste aspecto a contribuição de Röntgen foi puramente descritiva.

A teoria de difração de raios X por cristais teve início com o trabalho de Max von Laue. Influenciado pelo trabalho de Ewald sobre o efeito da periodicidade na refração[54], Laue teorizava que a radiação no comprimento de onda dos raios X viajando por uma estrutura atômica periódica sofresse difração. A comunidade científica da época rejeitava a hipótese de Laue, pois acreditava que o movimento térmico atômico inviabilizasse o fenômeno. Com o auxílio de Friederich e Knipping, Laue comprovou experimentalmente sua hipótese[50]. Este experimento, de fato, mostrou simultaneamente que cristais possuem um arranjo periódico de átomos ou moléculas e que os raios X são ondas eletromagnéticas.

Nas seções à seguir apresentam a estrutura formal da teoria de espalhamento de radiação por um átomo, difração por uma fileira de átomos e por um cristal. O termo difração utilizado neste texto se refere ao espalhamento de radiação por um conjunto periódico de átomos [55].

### **6.3.1 Interação da radiação com a Matéria**

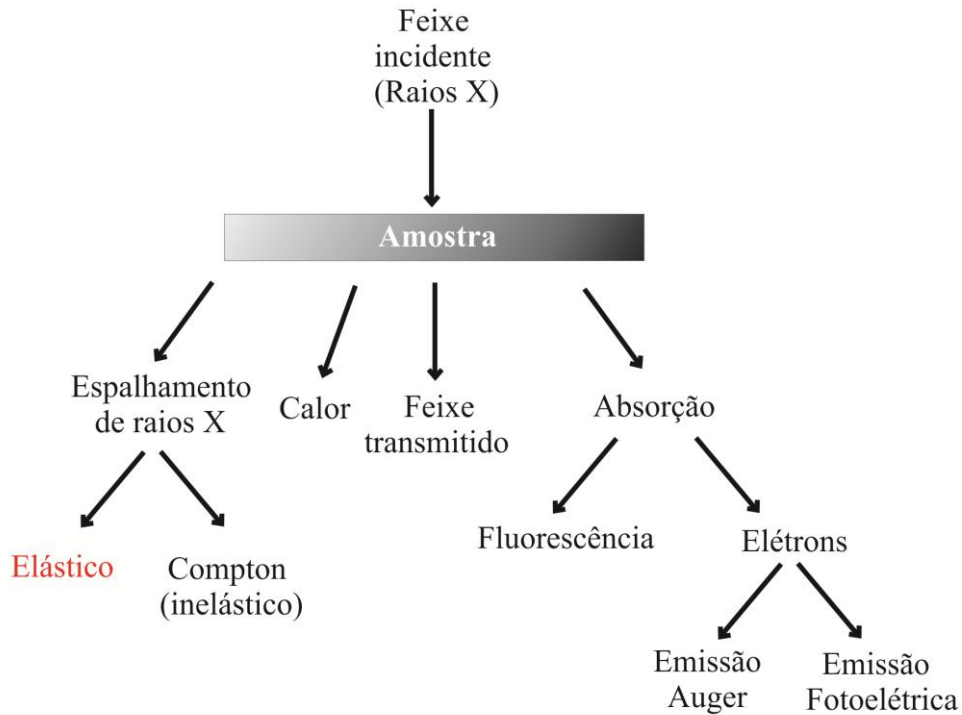
Quando radiação no comprimento de onda dos raios X incide sobre um átomo ou um conjunto de átomos, os elétrons atômicos podem participar de diversos fenômenos [56,57], conforme apresentado na Figura 6.1. Estes fenômenos dependem do comprimento de onda da radiação incidente e de características microscópicas da amostra, como número atômico e comprimentos de ligação química.

A absorção dos fótons de raios X pela amostra via mudança de níveis eletrônicos pode levar à ocorrência de fenômenos como fluorescência, emissão Fotoelétrica e emissão Auger[57]. Os fenômenos de espalhamento não envolvem mudanças de níveis eletrônicos. O Espalhamento Compton ocorre devido à colisão entre um fóton e um elétron, gerando uma mudança no comprimento da onda espalhada em relação ao feixe incidente dada por[58]:



$$\Delta\lambda = \frac{h}{mc} (1 - \cos \theta) \quad (29),$$

onde  $\theta$  é o ângulo de espalhado do fóton. Devido à natureza randômica destas colisões, o espalhamento Compton é incoerente, ou seja, não existe uma relação entre as fases dos fótons espalhados. As colisões entre fótons e elétrons também implicam na geração de calor no interior do material.



*Figura 6.1 - Interações dos raios X com a matéria[56].*

O espalhamento elástico ocorre sem variação do comprimento de onda e conseqüentemente sem perdas de energia. Trata-se do processo para determinação de estrutura por técnicas de difração de raios X e será explicado em detalhe nas próximas seções.

### 6.3.2 Espalhamento de Raios X por um elétron livre

Considere uma onda eletromagnética (OEM) monocromática cujo campo elétrico é dado por:

$$E_i(\vec{r}, t) = E_i e^{-i(\vec{k}_i \cdot \vec{r} - \omega_i t)} \quad (30),$$

incidindo sobre uma elétron livre de carga  $e$  e de massa  $m$ ,  $k_i$  e  $w_i$  são vetores de onda e frequência angular da onda incidente respectivamente. O elétron experimenta então uma aceleração devido ao campo incidente, dada por:

$$\vec{a} = \frac{e\vec{E}_i}{m} \quad (31).$$

De acordo com a Teoria Eletromagnética, quando uma carga é acelerada esta emite radiação e a onda espalhada e descrita por:

$$E_s(\vec{r}, t) = E_s e^{-i(\vec{k}_f \cdot \vec{r} - w_f t)} \quad (32).$$

A amplitude da onda espalhada, calculada em 1898 por Thomson, é dada por:

$$E_s = \frac{1}{r} E_i \left( \frac{e^2}{mc^2} \right) \text{sen } \varphi \quad (33),$$

onde  $c$  é a velocidade da luz e  $\varphi$  é o ângulo entre  $\vec{k}_f$  e o eixo de vibração do campo elétrico incidente, conforme mostrado na Figura 6.2. O espalhamento é caracterizado pelas variações no momento  $\vec{Q}$  e na energia  $E$  dados por:

$$\vec{Q} = \vec{k}_i - \vec{k}_f \quad (34),$$

$$\Delta E = \frac{h}{2\pi} (w_i - w_f) \quad (35),$$

onde  $h$  é a constante de Planck. No caso de espalhamento elástico, a frequência angular não varia durante a interação ( $w_i = w_f$ ) e conseqüentemente a energia da radiação também será conservada ( $\Delta E = 0$ ). A onda espalhada elasticamente pode então ser descrita por:

$$E_s(\vec{r}, t) = \frac{1}{r} E_i \left( \frac{e^2}{mc^2} \right) \text{sen } \varphi e^{-i(k_i \hat{k}_f \cdot \vec{r} - w_i t)} \quad (36),$$

onde  $\hat{k}_f$  é um vetor unitário na direção de  $\vec{k}_f$ .

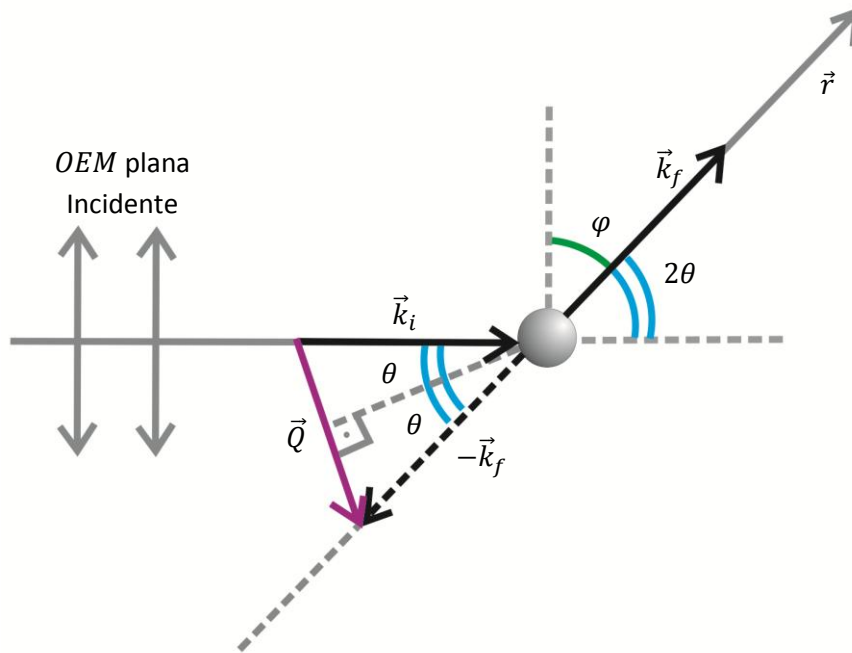


Figura 6.2 - Representação esquemática do espalhamento Thomson.

### 6.3.3 Difração por uma linha de átomos

Considere uma onda plana incidindo sobre uma fileira de  $N$  átomos idênticos igualmente espaçados (Figura 6.3) dada por:

$$A(\vec{r}, t) = e^{-i(\vec{k}_i \cdot \vec{r} - \omega_i t)} \quad (37).$$

Se a onda incidente sofrer espalhamento elástico pelos átomos, a onda difratada será uma onda plana formada pela superposição das ondas espalhadas por cada átomo com o mesmo módulo de vetor de onda  $k_d$ , ou seja:

$$A_d = e^{-i(\omega t)} \sum_{j=0}^{N-1} A_j e^{i(\vec{k}_d - \vec{k}_i) \cdot \vec{x}_j} \quad (38),$$

onde o fator  $A_j$  é a fração da onda espalhada por cada átomo  $j$ ,  $x_j$  representa a posição de cada átomo.

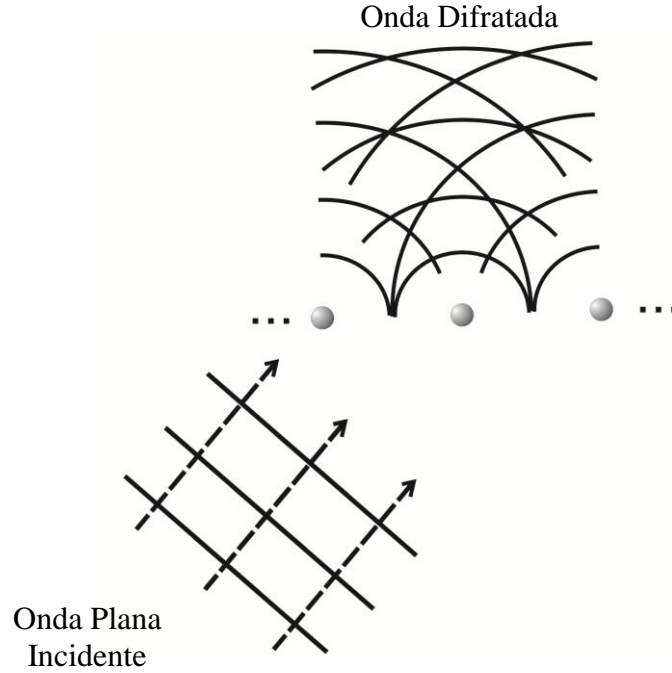


Figura 6.3 - Difração de uma onda plana incidente sobre uma fila de átomos igualmente espaçados. No caso de um observador posicionado no infinito, a onda difratada pode ser considerada uma onda plana (Limite de Fraunhofer[59]).

A onda difratada por cada átomo possui uma diferença de fase em relação à onda incidente (Figura 6.4) devido à diferença de caminho óptico dada por:

$$(\vec{k}_d - \vec{k}_i) \cdot \vec{x}_j = \vec{S} \cdot \vec{x}_j = S \cdot x_j (\cos \mu - \cos \nu) = S \cdot j \cdot x (\cos \mu - \cos \nu) \quad (39),$$

onde  $\vec{S} = (\vec{k}_d - \vec{k}_i)$  e  $j$  designa a posição relativa do  $j$ -ésimo átomo da linha em relação a origem, adotada no primeiro átomo ( $j=0$ ). Podemos definir o fator  $\beta$  por:

$$\beta \equiv Sx(\cos \mu - \cos \nu) \quad (40),$$

de forma que a diferença de caminho seja o produto  $j \cdot \beta$ . A expressão para onda difratada é então, uma série geométrica cuja soma dos termos é conhecida:

$$A_d = A e^{-i(\omega_i t)} \frac{e^{iN\beta} - 1}{e^{i\beta} - 1} \quad (41),$$

$$A_d = A e^{-i\left(\frac{(N-1)\beta}{2} - \omega t\right)} \frac{\text{sen}(N\beta/2)}{\text{sen}(\beta/2)} \quad (42).$$

Considerando todos os átomos idênticos, todos os átomos espalharão a radiação da mesma forma, logo:

$$A = 1/N \quad (43).$$

Temos então:

$$A_d = \frac{e^{-i\left(\frac{(N-1)\beta}{2} - \omega t\right)}}{N} \frac{\text{sen}(N\beta/2)}{\text{sen}(\beta/2)} \quad (44).$$

A intensidade da onda difratada é dada por:

$$I_d = |A_d|^2 \quad (45),$$

$$I_d = \frac{1}{N^2} \frac{\text{sen}^2\left(\frac{N\beta}{2}\right)}{\text{sen}^2\left(\frac{\beta}{2}\right)} \quad (46).$$

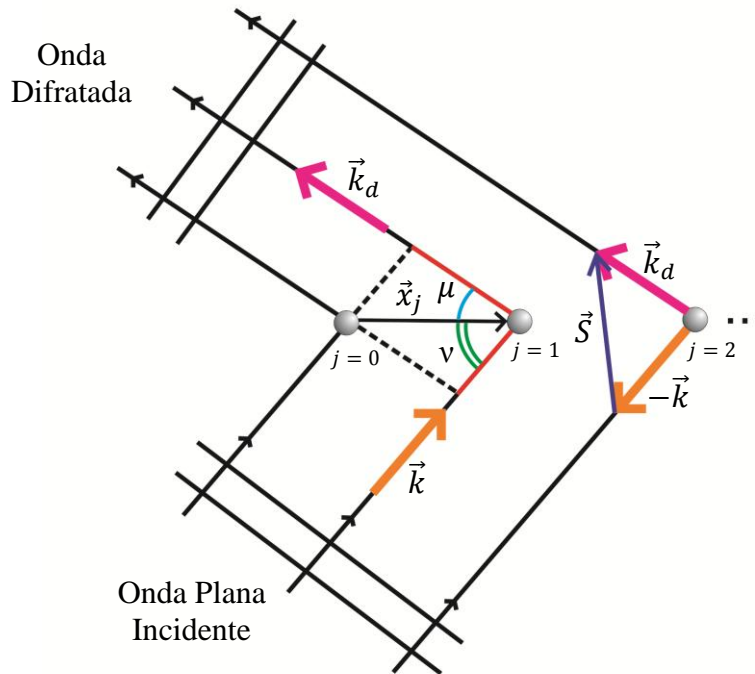


Figura 6.4 - Diferença de caminho óptico provocado pela difração (em vermelho).

A Figura 6.5 apresenta a intensidade da onda difratada para alguns valores de N. A intensidade dos máximos secundários (observados tanto para N=10 quanto para N=100) é aproximadamente 5% do valor dos máximos primários[60]. Desta forma, à medida que N aumenta as intensidades se tornam discretas.

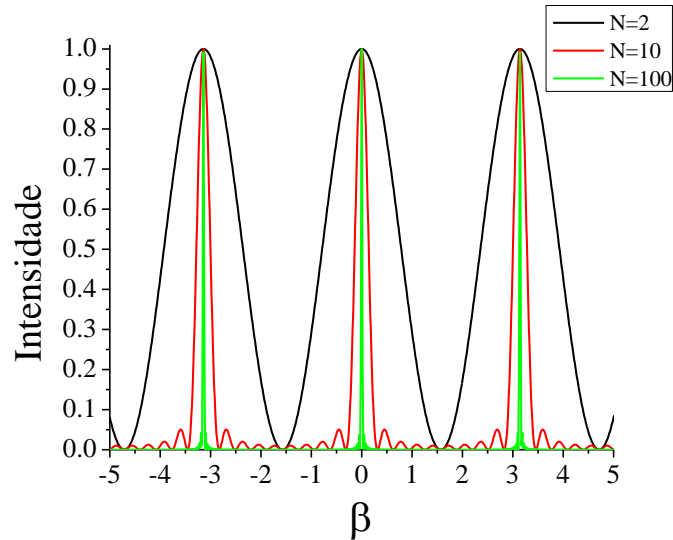


Figura 6.5 - Intensidade da onda difratada para N=2,10 e 100.

### 6.3.4 Difração por cristais

Em um experimento de difração de raios X com uma amostra cristalina são observados picos de interferência construtiva em direções muito específicas, assim como no caso unidimensional da seção anterior. O conjunto destes picos formam uma rede recíproca relacionada à rede da estrutura cristalina da qual ela se deriva. O vetor  $\vec{h}$  descreve esta rede e, é definido por:

$$\vec{h} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^* \quad (47),$$

onde h,k e l são números inteiros e  $\vec{a}^*$ ,  $\vec{b}^*$ ,  $\vec{c}^*$  formam uma base do espaço recíproco.

Geometricamente, observamos difração quando a condição conhecida como Lei de Bragg for satisfeita, ou seja, quando:

$$2d \sin\theta = n \lambda \quad (48),$$

onde  $d$  é a distância entre dois planos cristalográficos,  $\theta$  é o ângulo de incidência da radiação e  $n$  é um inteiro. Pode ser mostrado que:

$$d = \frac{1}{|\vec{n}|} \quad (49).$$

Para estimar a amplitude de um onda espalhada por um cristal considere inicialmente os feixes espalhados por elementos de volume separados de  $\vec{r}$  conforme indicado na Figura 6.6. O número de átomos na região compreendida entre  $\vec{r}$  e  $\vec{r} + \Delta\vec{r}$  é proporcional a  $\rho(\vec{r})\Delta r$ , onde  $\rho(\vec{r})$  é a densidade eletrônica. Observando a figura notamos que, da mesma forma como descrito para uma linha de átomos, a fase da onda incidente sofrerá uma variação de  $i(\vec{k}_d - \vec{k}_i) \cdot \vec{r}$  e portanto a amplitude da onda espalhada elasticamente será dada por:

$$E_d \propto E_o \rho(r) e^{i(\vec{k}_d - \vec{k}_i) \cdot \vec{r}} \Delta r \quad (50),$$

onde  $E_o$  é a amplitude da onda incidente.

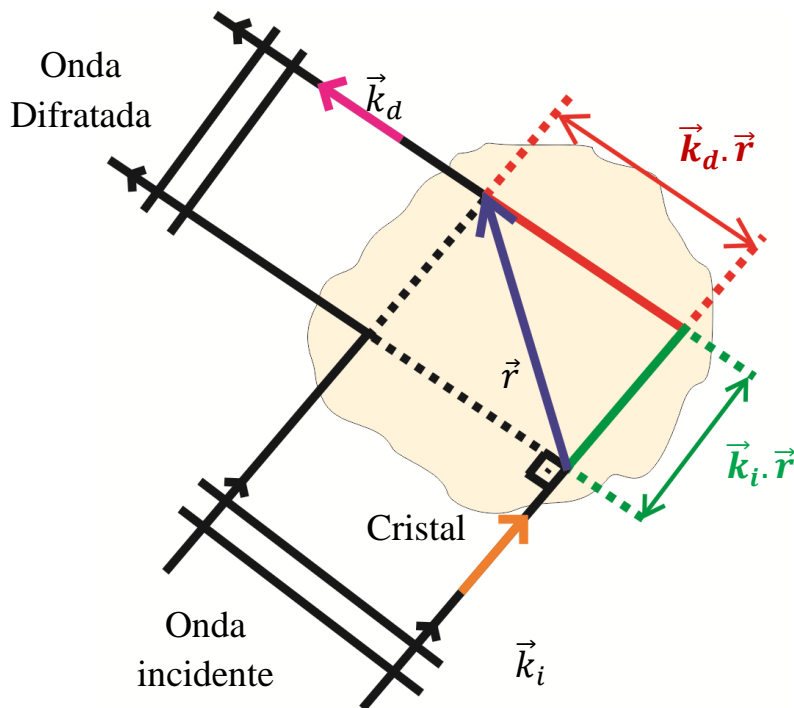


Figura 6.6 - Diferença de caminho óptico na difração em um cristal

Obtemos uma expressão para a amplitude da onda espalhada  $E_d(\mathbf{r})$  por todo o cristal somando a contribuição de cada elemento de volume:

$$E_d \propto \int \rho(\vec{r}) e^{2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}} d\vec{r} \quad (51),$$

onde  $\vec{r}^* = (\vec{k}_d - \vec{k}_i)/2\pi$ , é um vetor genérico do espaço recíproco tal que:

$$r^* = \frac{2\sin\theta}{\lambda} \quad (52),$$

onde  $2\theta$  é o ângulo entre o feixe incidente de raios X e a direção de observação e  $\lambda$  é o comprimento de onda. Desta forma, a amplitude onda espalhada é diretamente proporcional à Transformada de Fourier da densidade eletrônica:

$$E_d \propto F(\vec{r}^*) \quad (53),$$

onde:

$$F(\vec{r}^*) = \int_{\text{vol}} \rho(\vec{r}) e^{2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}} d\vec{r} \quad (54).$$

Para descrever matematicamente o cristal, considere uma rede de pontos representada pela soma de funções Delta de Dirac:

$$L(\mathbf{r}) = \sum_{u,v,w=-\infty}^{\infty} \delta(\vec{r} - \vec{r}_p) \quad (55),$$

onde  $\vec{r}_p = u\vec{a} + v\vec{b} + w\vec{c}$  representa o vetor da rede e  $u, v$  e  $w$  são números inteiros. A densidade eletrônica do cristal é dada por:

$$\rho_{\text{crist}}(\mathbf{r}) = \rho_{\text{cel}}(\vec{r}) \cdot L(\vec{r}) \quad (56).$$

A transformada de Fourier da densidade eletrônica  $F(\vec{r}^*)$  de um cristal será:

$$F(\vec{r}^*) = \int_{\text{Vol}} \rho_{\text{crist}}(\mathbf{r}) e^{2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}} d\mathbf{r} \quad (57),$$

$$F(\vec{r}^*) = \int_{\text{Vol}} (\rho_{\text{cel}}(\vec{r}) \sum_{u,v,w=-\infty}^{\infty} \delta(\vec{r} - \vec{r}_p)) e^{2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}} d\mathbf{r} \quad (58).$$

Utilizando o teorema da convolução:

$$F(\vec{r}^*) = \mathcal{F}\{\rho_{\text{cel}}(\mathbf{r})\} \mathcal{F}\{L(\mathbf{r})\} \quad (59),$$

$$F(\vec{r}^*) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=-\infty}^{\infty} \delta(\vec{r}^* - \vec{h}) F(\vec{r}^*) \quad (60).$$



Logo, pela definição da função Delta de Dirac:

$$F(\vec{h}) = \int_{\text{cel}} \rho_{\text{cel}}(\vec{r}) e^{2\pi i \vec{h} \cdot \vec{r}} d\vec{r} \quad (61).$$

onde  $\vec{h} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*$  é um vetor da rede recíproca. A densidade de carga da célula unitária  $\rho_{\text{cel}}(\vec{r})$  pode ser considerada como o produto do poder de espalhamento por unidade de elementos espalhadores vezes a densidade eletrônica de elementos espalhadores. A primeira parte do produto (espalhamento por elétron) pode ser incluído na equação como uma constante multiplicativa  $\varepsilon$ . A densidade de elementos espalhadores  $\rho_{\text{cel}}(\vec{r})$ , pode ser considerada em primeira aproximação como a soma das distribuições de carga esfericamente simétricas centradas no núcleo de cada átomo da célula unitária como indicado na Figura 6.7.

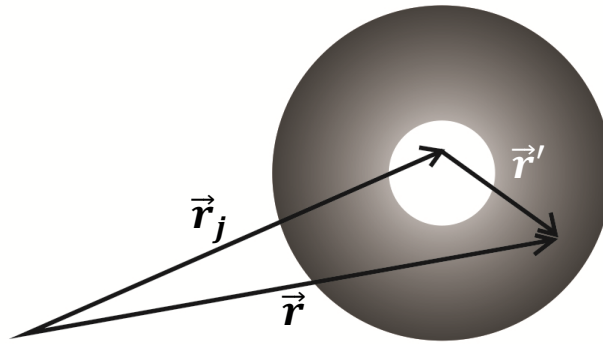


Figura 6.7 - Representação de uma distribuição de carga esfericamente simétrica.

Assim, a densidade de carga da célula unitária será dada por:

$$\rho_{\text{cel}}(\vec{r}) = \varepsilon \sum_{j=1}^N \rho(|\vec{r} - \vec{r}_j|) = \varepsilon \sum_{j=1}^N \rho(r') \quad (62),$$

e portanto:

$$F(\vec{h}) = \int_{\text{cell}} (\varepsilon \sum_{j=1}^N \rho(r')) e^{2\pi i \vec{h} \cdot \vec{r}} d\vec{r} \quad (63).$$

Fazendo a mudança de variável adequada obtemos a expressão do fator de estrutura:

$$F(\vec{h}) = \sum_{j=1}^N f_j(\vec{h}) e^{2\pi i \vec{h} \cdot \vec{r}_j} \quad (64),$$

onde:

$$f_j(\vec{h}) = \mathcal{F}\{\rho_j(r)\} \quad (65).$$

$$f_j(\vec{h}) = \int_0^R \rho(r) e^{2\pi i \vec{h} \cdot \vec{r}} dr \quad (66),$$

é chamado fator de forma atômico do j-ésimo átomo da célula unitária. Para um átomo esfericamente simétrico, modelo que despreza os elétrons de valência, a densidade eletrônica é uma função radial e o fator de forma pode ser calculado utilizando coordenadas esféricas.

Fazendo o vetor  $\vec{h}$  paralelo ao eixo z na equação 66 temos:

$$f_j(h) = \int_0^R \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \rho(r) r^2 \sin\varphi e^{2\pi i h r \cos\varphi} dr d\varphi d\theta \quad (67),$$

$$f_j(h) = 2\pi \int_0^R \rho(r) r^2 \left( \int_0^\pi \sin\varphi e^{2\pi i h r \cos\varphi} d\varphi \right) dr \quad (68).$$

A integral entre parêntesis na expressão acima é uma solução da equação de Bessel[61] cuja solução é dada por[53]:

$$f_j(h) = 4\pi \int_0^R \rho(r) r^2 \frac{\text{sen}(2\pi h r)}{2\pi h r} dr \quad (69).$$

Chamando:

$$U(r) = 4\pi r^2 \rho(r) \quad (70),$$

onde  $U(r)$  é a distribuição radial de cargas do átomo, temos:

$$f_j(h) = \int_0^R U(r) \frac{\text{sen}(2\pi h r)}{2\pi h r} dr. \quad (71).$$

Observe que o fator de estrutura é uma grandeza complexa:

$$F(\vec{h}) = \sum_{j=1}^N f_j(\vec{h}) e^{2\pi i \vec{h} \cdot \vec{r}_j} \quad (72),$$

$$F(\vec{h}) = F_{hkl} e^{i\varphi_{hkl}} \quad (73).$$

onde  $F_{hkl}$  é seu módulo e  $\varphi_{hkl}$  é sua fase.

A densidade eletrônica não pode ser obtida diretamente de um experimento de difração de raios X devido à incoerência temporal e espacial das fontes convencionais de raios X,

baseadas em tubos de raios X<sup>xiv</sup> e Luz Síncrontron<sup>xv</sup> [62]. Somente a intensidade da radiação difratada pode ser medida e esta é proporcional ao quadrado do fator de estrutura:

$$I(\vec{h}) \propto |F(\vec{h})|^2 \quad (74).$$

Desta forma a informação contida nas fases é perdida. Este problema pode ser contornado utilizando técnicas de faseamento como por exemplo o método de Substituição molecular apresentado a seguir. Uma vez obtidas as fases apropriadas, a densidade eletrônica pode ser obtida pela transformada inversa de Fourier:

$$\rho(\vec{r}) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} F_{hkl} e^{-2\pi i \vec{h} \cdot \vec{r}} \quad (75),$$

onde V é o volume da célula unitária.

### 6.3.5 Tensor de Deslocamento

As oscilações da posição dos átomos em um cristal devido à temperatura, ou mesmo imperfeições na rede cristalina, causam alterações da densidade eletrônica obtida utilizando difração de raios X, chamada correção de Debye[53]. O fator de estrutura corrigido é dado por:

$$F(\vec{h}) = \sum_{h,k,l=-\infty}^{\infty} \sum_{j=1}^N f_j(\vec{h}) T_j e^{2\pi i \vec{h} \cdot \vec{r}_j} \quad (76),$$

onde  $T_j$  é o tensor de deslocamento, tal que:

$$T_j = e^{-B \frac{\text{sen}^2 \theta}{\lambda^2}} \quad (77).$$

O tensor de deslocamento pode ser isotrópico, caso não existam direções de oscilação preferenciais. Neste caso:

$$B = -8\pi^2 U_j \quad (78),$$

---

<sup>xiv</sup> Um feixe de elétrons colide com um anteparo e há emissão de radiação branca (*Bremsstrahlung*) e picos acentuados referentes à transições eletrônicas ( $K_\alpha$  e  $K_\beta$ ). Estes últimos são selecionados para a realização de experimentos.

<sup>xv</sup> Neste caso um feixe de elétrons sofre aceleração, emitindo radiação.

onde  $U_j = \vec{u} \cdot \vec{u}$  e  $\vec{u}$  é o deslocamento da posição de equilíbrio. No caso do tensor de deslocamento anisotrópico, o fator B descreve os graus de liberdade impostos por exemplo por ligações químicas presentes no material.

## 6.4 Substituição Molecular

Este método de resolução estrutural se aplica aos casos em que a estrutura de uma proteína similar à estudada é conhecida. Esta molécula similar serve de modelo do qual se obtém um conjunto de fases iniciais.

Um conjunto de seis coordenadas (três angulares e três translacionais) descrevem a transformação do conjunto de coordenadas do modelo ( $x'$ ) para o conjunto que representa a molécula em estudo ( $x$ ):

$$x' = [C]x + t \quad (79).$$

A função de Patterson  $P(u)$ , também chamada de autoconvolução da densidade eletrônica, é definida por :

$$P(\vec{u}) = \int_V \rho(\vec{r}) \rho(\vec{r} + \vec{u}) dv \quad (80).$$

Usando a expressão (72) que relaciona densidade eletrônica e fator de estrutura, podemos mostrar que:

$$P(\vec{u}) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F(\vec{h})|^2 e^{-2\pi i \vec{u} \cdot \vec{h}} \quad (81),$$

podendo, portanto, ser calculada sem o conhecimento das fases.

A função de Patterson será diferente de zero sempre  $\vec{u}$  indicar um vetor que descreve a distância entre átomos na célula unitária. Entre os vários algoritmos utilizados nos cálculos de Substituição Molecular, algoritmos estes que comparam a função de Patterson do modelo e da molécula em estudo, destaca-se o algoritmo AMORE[63].

As etapas de obtenção das coordenadas angulares e das coordenadas translacionais podem ser separadas graças à uma importante propriedade da função de Patterson[62]. Os picos da função de Patterson que representam a convolução de uma molécula com ela mesma (auto-vetores) são encontrados no interior de um volume da mesma ordem do volume da molécula.

Desta forma, se esta molécula sofrer rotação somente os picos no interior deste volume sofrem alterações.

Definimos a função de auto-rotação  $R(\alpha, \beta, \gamma)$  pela convolução entre a função de Patterson ( $P_{\text{obs}}$ ) do modelo e a função do modelo ( $P_{\text{mod}}$ ):

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \int_U P_{\text{obs}}(u) P_{\text{mod}}(u) du \quad (82),$$

onde  $U$  representa o volume do mapa de Patterson que contem os auto-vetores de Patterson. O modelo é rotacionado sistematicamente para obter as coordenadas angulares  $\alpha, \beta, \gamma$  que maximizam a função de rotação, ou seja para obter a matriz de rotação  $[C]$ .

O próximo passo consiste em determinar as melhores coordenadas de posição  $t$  da molécula modelo. Para isto definimos a função de Translação, dada pela convolução da função de Patterson dos fatores de estrutura observados e dos fatores de estrutura do modelo translacionado ( $P_t$ ):

$$T(t) = \int_U P_{\text{obs}}(u) P_t([C]u + t) du \quad (83).$$

Assim como a função de rotação, a função de translação será máxima quando os mapas de Patterson observado e do modelo possuírem maior similaridade. Após obter as coordenadas angulares e translacionais, um conjunto de fases iniciais é atribuído aos módulos dos fatores de estrutura medidos para posterior refinamento e construção de um modelo de densidade eletrônica. Este também é refinado para a determinação da estrutura tridimensional da molécula em estudo.

## 6.5 Refinamento

O refinamento consiste em ajustar o modelo à densidade calculada, respeitando, no caso da cristalografia de proteínas, a posição espacial da cadeia principal, a sequência de aminoácidos que definem as cadeias laterais e as moléculas de água de hidratação. Este ajuste é feito com a ajuda de métodos de otimização tais como Mínimos Quadrados ou Máxima Entropia[62]. A evolução do refinamento é acompanhada pelo monitoramento da quantidade chamada  $R$ -

*factor*, que estima a diferença entre o fator de estrutura observado ( $F_{\text{obs}}(\vec{h})$ ) e calculado ( $F_{\text{calc}}(\vec{h})$ ) definido por:

$$R = \frac{\sum_{hkl} F_{\text{obs}}(\vec{h}) - F_{\text{calc}}(\vec{h})}{\sum_{hkl} F_{\text{obs}}(\vec{h})} \quad (84).$$

Os ajustes no modelo podem ser realizados em cada resíduo de aminoácido com as ferramentas gráficas tais como o COOT[64]. O algoritmo REFMAC[65] pode ser utilizado para realizar o refinamento, baseado no método de Maximização da Entropia. O algoritmo FFT (*Fast Fourier Transform*) é utilizado obter o novo mapa de densidade eletrônica. Estes algoritmos estão disponíveis livremente na interface CCP4[2].

## Capítulo 7 - Resultados

### 7.1 Crescimento de cristais por Difusão de vapor e Batch

A lisozima cristaliza-se de forma otimizada para concentrações de proteína entre 20 e 100 mg/mL em solução aquosa de pH 4.6 tampão: acetato de sódio 0.2 a 4M e concentrações de NaCl entre 0.5 a 2M[66,67].

Ensaio de crescimento para soluções nessas condições mostraram a formação de cristais com tempo inferior a doze horas. O ensaio escolhido foi filmado à temperatura ambiente por uma câmera acoplada a uma binocular[68] empregando um filtro vermelho para comprimentos de onda abaixo de 600nm, pois a radiação de 280nm promove a excitação do aminoácido triptofano o que influencia a taxa de agregação da proteína[69]. A Figura 7.1 mostra fotografias em alguns instantes do processo de cristalização. Foi determinado o tempo para surgimento dos primeiros cristais visíveis de lisozima de aproximadamente nove horas.

A temperatura pode influenciar o produto final de experimentos de cristalização por alterar a solubilidade[70], a taxa de difusão e facilitar ou dificultar os contatos entre as moléculas[71] e até mesmo mudar a simetria do cristal obtido[72]. No entanto, este parâmetro não é comumente verificado e seus efeitos podem inviabilizar a cristalização[9].

Com o objetivo de analisar a dinâmica da cristalização e a influência da temperatura no número de cristais obtidos, foram realizados ensaios repetidos de cristalização de Lisozima para temperaturas entre 4°C e 30°C utilizando estufas de temperatura controlada[73]. Para cada temperatura foram realizados dez ensaios utilizando a técnica de gota depositada com concentração de proteína utilizada foi de 45mg/ml, NaCl 0.5M, tampão acetato 0.25M pH4.5 e volume de gota de 2µl.

A análise do número médio de cristais obtidos por gota de 2µl, após treze horas de crescimento, em função da temperatura (Figura 7.2) revela uma mudança no regime de formação de cristais em aproximadamente 12°C, que já havia sido relatado na literatura[74].

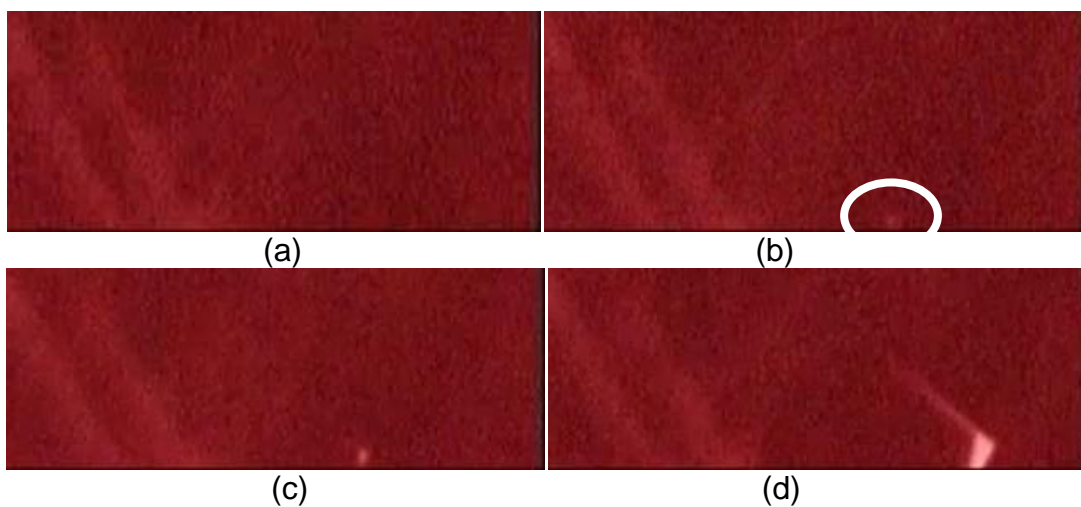


Figura 7.1 - Ensaio de cristalização de lisozima por difusão de vapor observado com aumento de 50 vezes após (a) 7 horas, (b) 9 horas, (c) 9hs30min e (d) 13 horas. A seta em 6(b) indica o cristal que cresce conforme as figuras subsequentes.

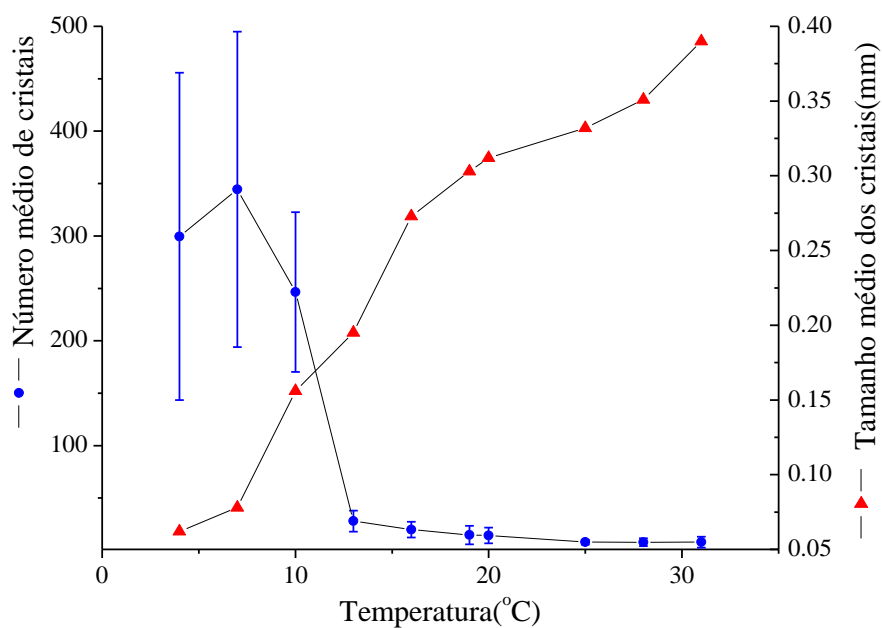


Figura 7.2 - Influência da temperatura no número médio e no tamanho médio de cristais de lisozima obtidos na técnica de gota depositada de volume  $2\mu\text{l}$  após 13 horas de experimento. A concentração de proteína foi  $45\text{mg/ml}$ ,  $\text{NaCl } 0.5\text{M}$ , tampão acetato  $0.25\text{M pH}4.5$ .



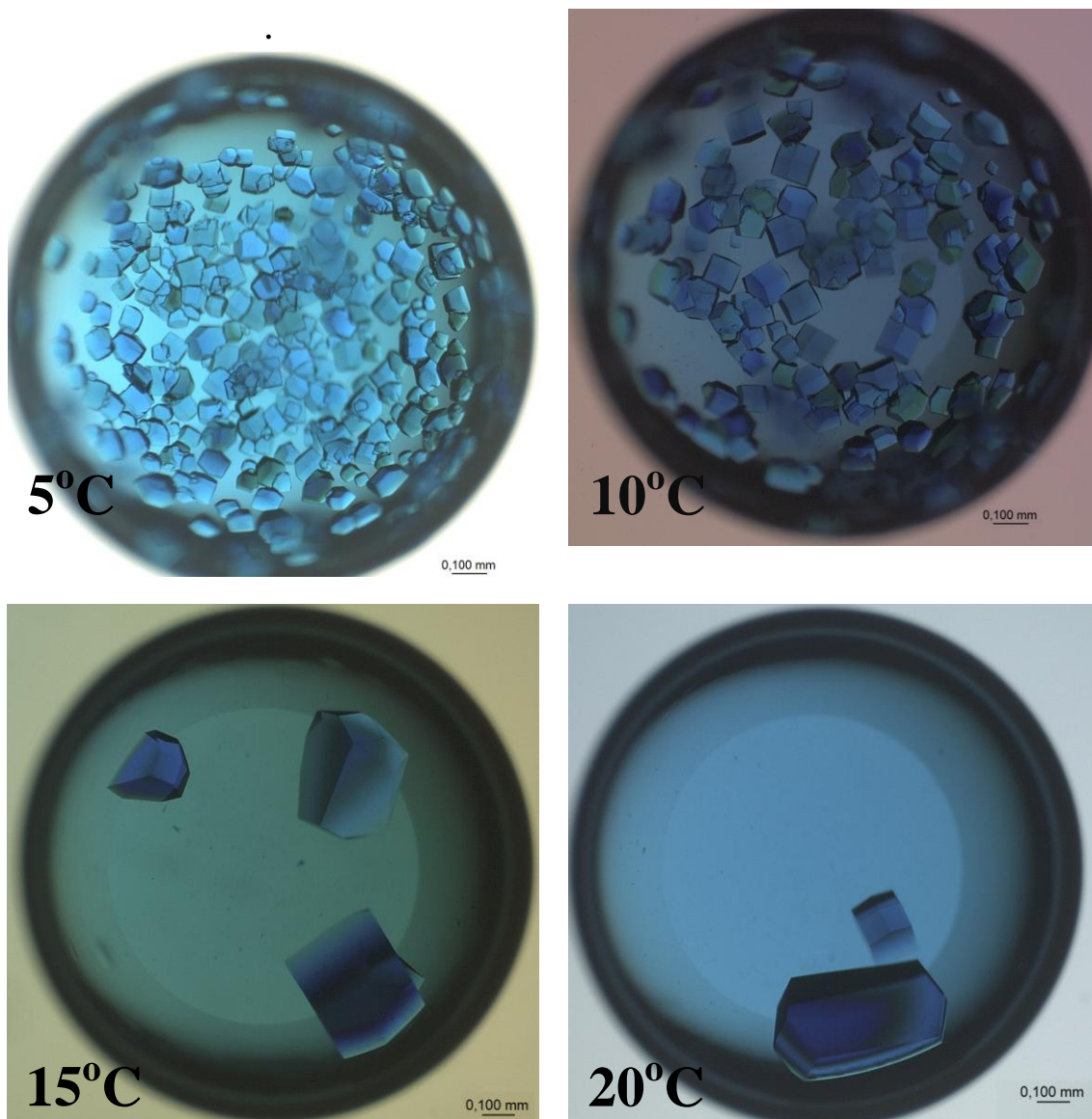


Figura 7.3 – Cristais obtidos em ensaios de cristalização de Lisozima por batch em diferentes temperaturas após treze horas de experimento. A concentração de proteína utilizada foi de 20 mg/ml, NaCl 0.5M, tampão acetato 0.25M pH4.5 e Azul de metileno 2mM.

## 7.2 Análise dinâmica do crescimento

Durante a cristalização por *batch*[9], os cristalitos estão dispersos em solução. Flutuações da intensidade de luz espalhada por estes cristalitos pode ser utilizada para determinar o coeficiente de difusão e consequentemente a distribuição raios das partículas dispersas.

A evolução temporal do raio hidrodinâmico das partículas pode revelar se a temperatura é um fator determinante para a nucleação e crescimento de cristais de proteína. Com este objetivo, foram realizados ensaios de cristalização de Lisozima empregando a técnica de DLS.

## 7.2.1 Medidas de DLS por retroespalhamento

O experimento de espalhamento de luz consiste basicamente em incidir luz polarizada de um laser sobre uma amostra fluida e coletar a luz espalhada pelo meio a uma certa distância e ângulo. O laboratório de *Física de Sistemas Biológicos* do Departamento Física da UFMG possui um sistema para medidas de DLS por retroespalhamento.

A técnica de cristalização de lisozima utilizada foi difusão de vapor/*Sitting drop*, conforme a montagem representada na Figura 7.4. A condição de cristalização utilizada foi de 40mg/ml de lisozima à (solução mãe) e o poço de 1M NaCl e 0.5M tampão acetato de sódio pH 4.6.

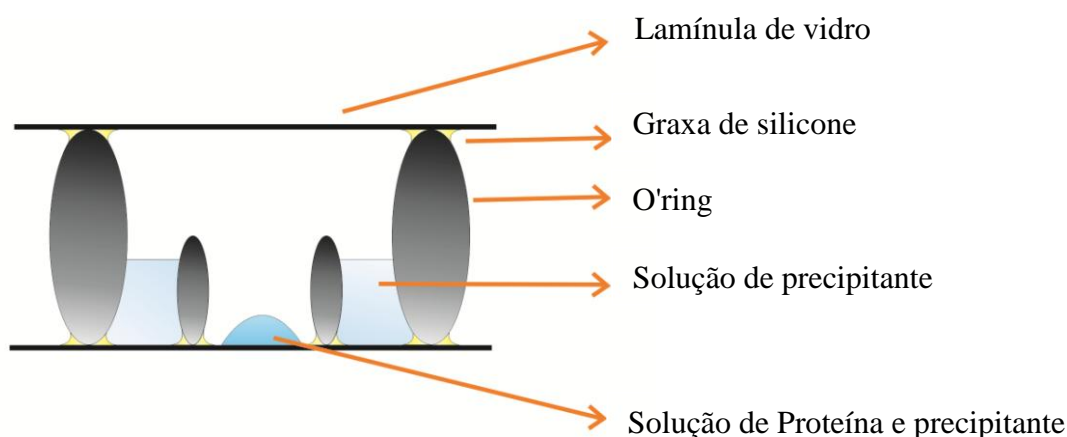


Figura 7.4 - Diagrama esquemático da montagem para cristalização de lisozima por difusão de vapor/ *Sitting drop*.

Conforme a Figura 7.5, um feixe de laser incide em um semi-espelho na base de um microscópio invertido[75] e pode ser colimado pela lente objetiva na amostra. Parte da luz incide sobre a amostra e parte é coletada pela fotomultiplicadora (*EG&G Optoelectronics*) sendo a intensidade de luz detectada convertida em sinal elétrico. Este sinal é analisado pelo correlacionador.

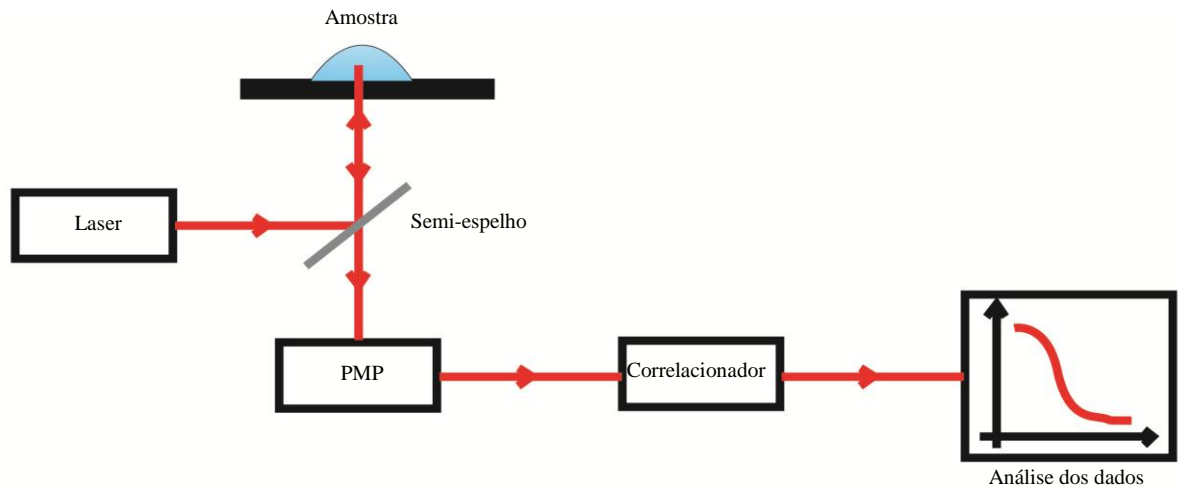


Figura 7.5 - Aparato experimental utilizado nas medidas.

A montagem utilizada é heterodínea, ou seja, o feixe que incide na fotomultiplicadora é composto por luz espalhada pela amostra e luz não espalhada. A Figura 7.6 mostra uma medida de correlação de fótons obtida durante o processo de cristalização.

Os dados obtidos mostram uma oscilação de intensidade da luz espalhada que pode ser decorrente da evaporação da solução de proteína e precipitante na superfície da gota. Assim, os experimentos realizados com a montagem mostrada na Figura 7.5 não permitem a análise da evolução do crescimento de agregados por *DLS*.

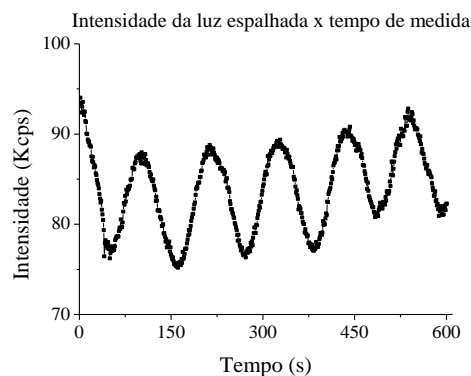


Figura 7.6 - Variação da intensidade de luz no correlacionador durante a amostragem.

## 7.2.1 Medidas de DLS por espalhamento à 90°

Foram realizadas medidas durante o processo de cristalização por DLS no *Laboratório de Fluidos Complexos* do Departamento de Física/UFMG. Este laboratório conta com uma montagem homodínea, em que somente a luz espalhada é coletada por um correlacionador digital (Figura 7.7).

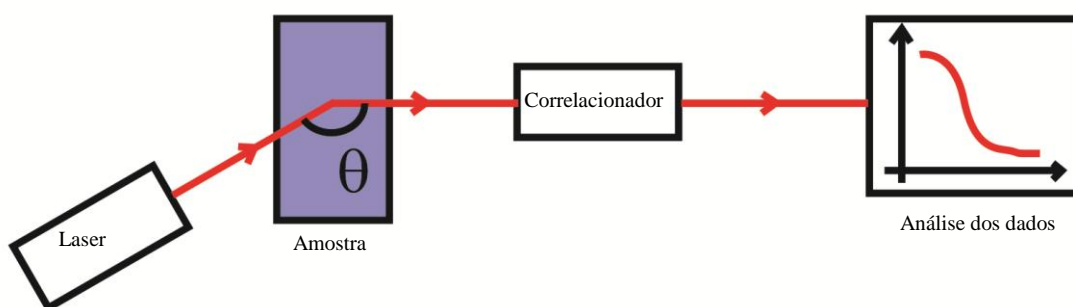


Figura 7.7 - Diagrama esquemático da montagem homodínea utilizada. A temperatura do meio espalhador é controlada por um sistema de resfriamento.

Uma desvantagem desta montagem é o volume de solução empregado. Em ensaios rotineiros de cristalização, cada condição é testada com volumes da ordem de 1-2  $\mu\text{L}$ . Os experimentos de espalhamento de luz foram realizados com amostras de 250  $\mu\text{L}$  de solução com concentração de lisozima de 20mg/ml, concentração de NaCl de 0.5 M e concentração de tampão acetato 0.25M com pH 4.60. Foi utilizada a técnica de batch para cristalização. As medidas foram iniciadas imediatamente após a mistura da solução de proteína e da solução de precipitante para atingir as concentrações já citadas.

Considerando que as partículas executam movimento browniano com posição  $r_j(t)$  e que cada uma destas contribui para a amplitude da onda espalhada com uma parcela exponencial, a intensidade de luz espalhada ( $I$ ) por uma suspensão coloidal é diretamente proporcional ao fator[44]:

$$I \propto \left| \sum_{j=1}^n b_j e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j(t)} \right|^2 \quad (85).$$

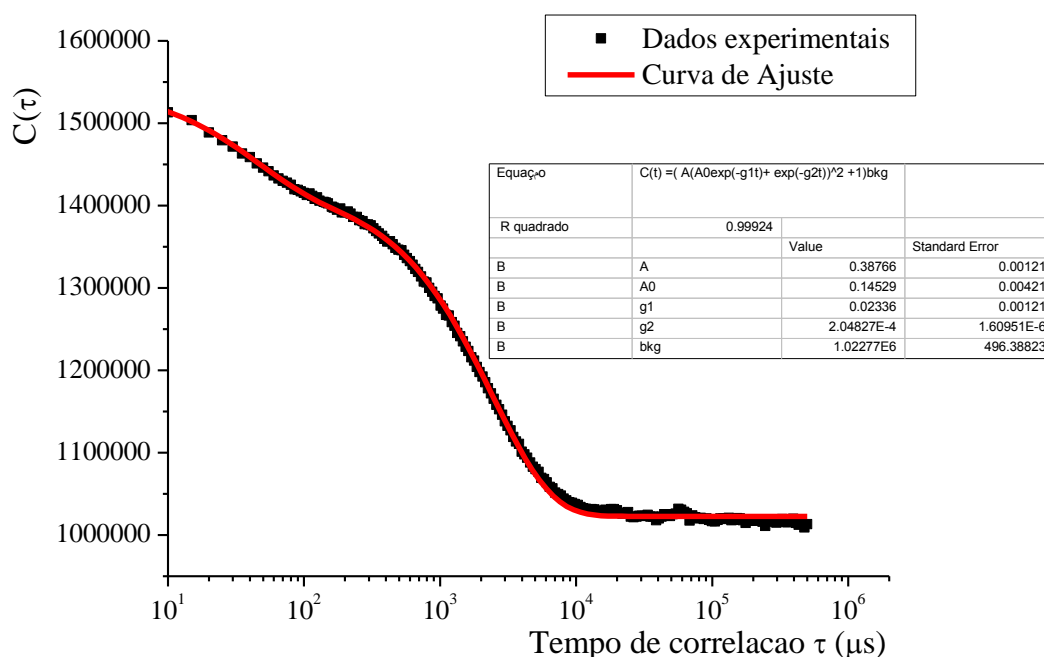
A Figura 7.8 mostra uma curva de correlação de intensidades típica para o sistema estudado em que são observados dois decaimentos exponenciais. Foi suficiente o uso de duas exponenciais no ajuste, conforme a expressão:

$$C(\tau) = A_0(A_1 e^{-\Gamma_1 \tau} + e^{-\Gamma_2 \tau})^2 + \text{bkg} \quad (86),$$

onde as os parâmetros  $A_0$ ,  $A_1$ , e  $\text{bkg}$  são ajustadas aos dados experimentais e as taxas de decaimento  $\Gamma_1$  e  $\Gamma_2$  são dadas por:

$$\Gamma_i = q^2 D \quad (i = 1,2) \quad (87),$$

onde  $D$  é o coeficiente de difusão translacional.



*Figura 7.8 - Função de autocorrelação medida durante a cristalização de Lisozima à temperatura de 5.5°C após 2 minutos de preparo da solução.*

Obtidos os valores experimentais de  $\Gamma_1$  e  $\Gamma_2$ , a relação de Einstein-Stokes permite a obtenção dos raios hidrodinâmicos  $r_{h1}$  e  $r_{h2}$  das partículas em solução, dada por:

$$D = \frac{K_b T}{6\pi\eta r_h} \quad (88),$$

onde  $T$  é a temperatura e  $\eta$  é a viscosidade.

Valores de raios hidrodinâmicos  $r_{h1}$  e  $r_{h2}$  para as partículas (ou agregados) foram calculados a partir dos ajustes dos dados obtidos em  $(5.5+0.3)^\circ\text{C}$  e  $(21.1+0.3)^\circ\text{C}$ . A Figura 7.9 apresenta os raios obtidos para cada uma das temperaturas ao longo do tempo dos experimentos DLS. O tempo total das medidas DLS foram de aproximadamente 10 horas, ou seja, o mesmo no qual foi observada a formação de cristais por difusão de vapor apresentado na Figura 7.1.

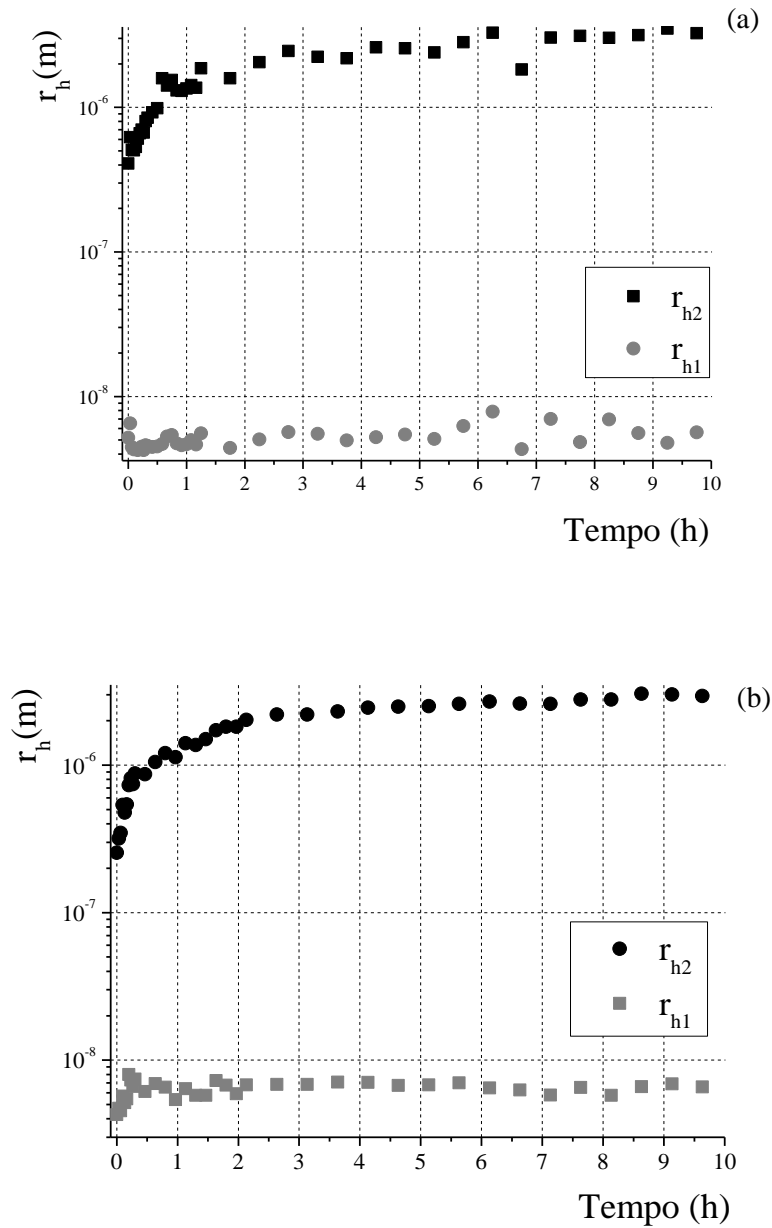


Figura 7.9 - Evolução temporal das distribuições de raio determinadas pelo ajuste de duas exponenciais para as temperaturas de (a) 5.5 °C e (b) 21.1 °C.

Conforme observado na Figura 7.9, as populações de partículas em solução com raios  $r_{h1}$  e  $r_{h2}$  e o regime de crescimento dessas partículas parece não depender da temperatura. A população  $r_{h1}$  flutua em torno de um valor médio constante da ordem de unidades de nanômetros para ambas as temperaturas (Tabela 7.1).

<b>Temperatura(°C)</b>	<b>Raio <math>r_{h1}</math> médio(nm)</b>
(5.5+0.3)	(7±1)
(21.1+0.3)	(5.2±0.9)

*Tabela 7.1 - Raio  $r_{h1}$  médio para as temperaturas utilizadas.*

O crescimento dos agregados ( $r_{h2}$ ) em ambas as temperaturas parece ser por DLA assim como em outros estudos de cristalização de lisozima[40]. No entanto o modelo matemático da agregação DLA[41] para a evolução temporal dos raios hidrodinâmicos não é satisfatório para o conjunto de dados obtido, conforme apresentado no Apêndice I.

Um ajuste da evolução temporal de  $r_{h2}$  foi obtido empregando o modelo de crescimento de partículas coloidais esparsamente recobertas por um adsorvente orgânico[76]. Nele as interações que culminam em agregação ocorrem após muitas colisões entre as partículas e este fenômeno não é limitado somente pela difusão. A evolução dos raios hidrodinâmicos é dada por:

$$r_{h2}(t) = R_{h2}^0 t^{\frac{1}{c}} \quad (89),$$

onde  $R_{h2}^0$  é o raio inicial e  $c$  é uma constante ajustada experimentalmente. Desta forma é possível determinar o tamanho inicial dos agregados que apresentam crescimento. O ajuste obtido utilizando este modelo foi satisfatório para as temperaturas de medida, conforme apresentado na Figura 7.10 e na Tabela 7.2.

<b>Temperatura(°C)</b>	<b>Raio inicial <math>R_{h2}^0</math> (10nm)</b>
(5.5+0.3)	(7±1)
(21.1+0.3)	(8±1)

*Tabela 7.2 - Raio inicial  $R_{h2}^0$  para as temperaturas utilizadas.*

Diferente do que foi observado para a evolução temporal dos raios dos agregados, a temperatura influencia dramaticamente a intensidade de luz espalhada para as soluções em diferentes temperaturas, conforme a Figura 7.11. A intensidade de luz espalhada à baixa temperatura é quase o dobro da intensidade à temperatura de 21.1°C.

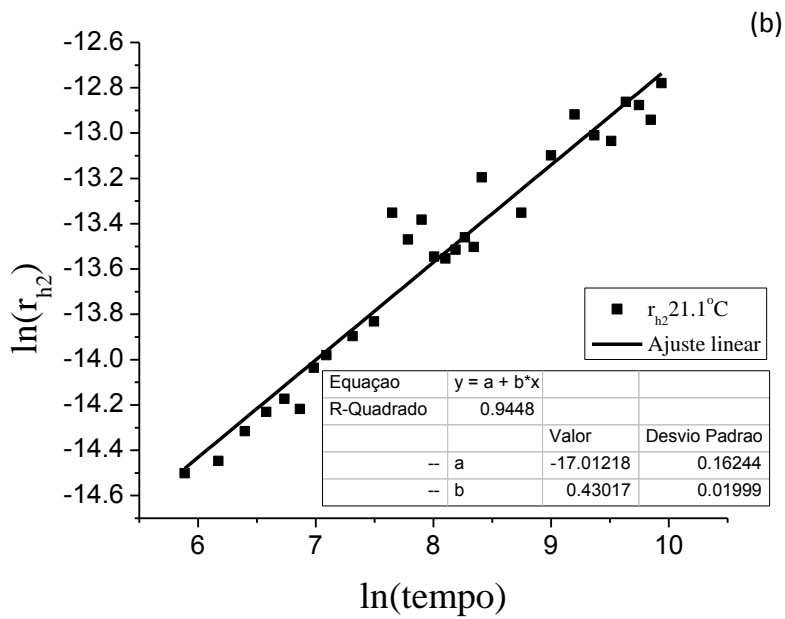
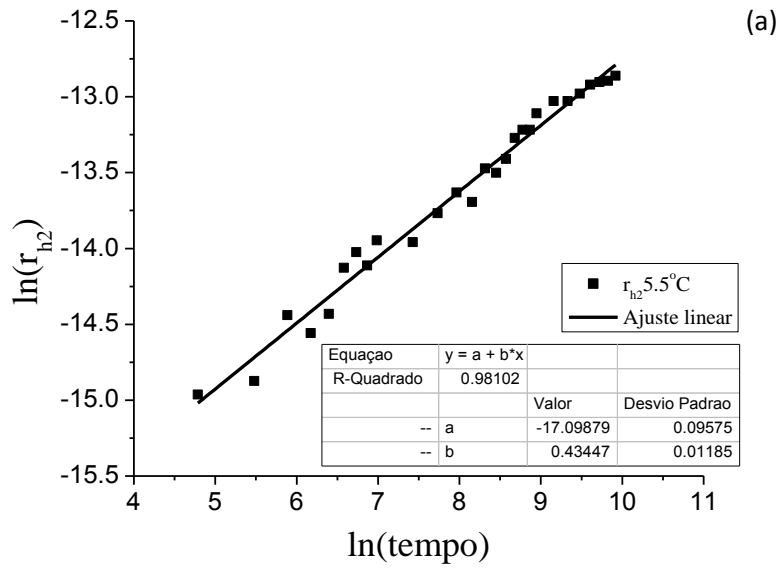


Figura 7.10 - Ajuste da evolução temporal dos raios  $r_{h2}$  para as temperaturas (a)  $5.5^{\circ}\text{C}$  e (b)  $21.1^{\circ}\text{C}$  utilizando o modelo de crescimento de partículas coloidais esparsamente recobertas por um adsorvente orgânico.



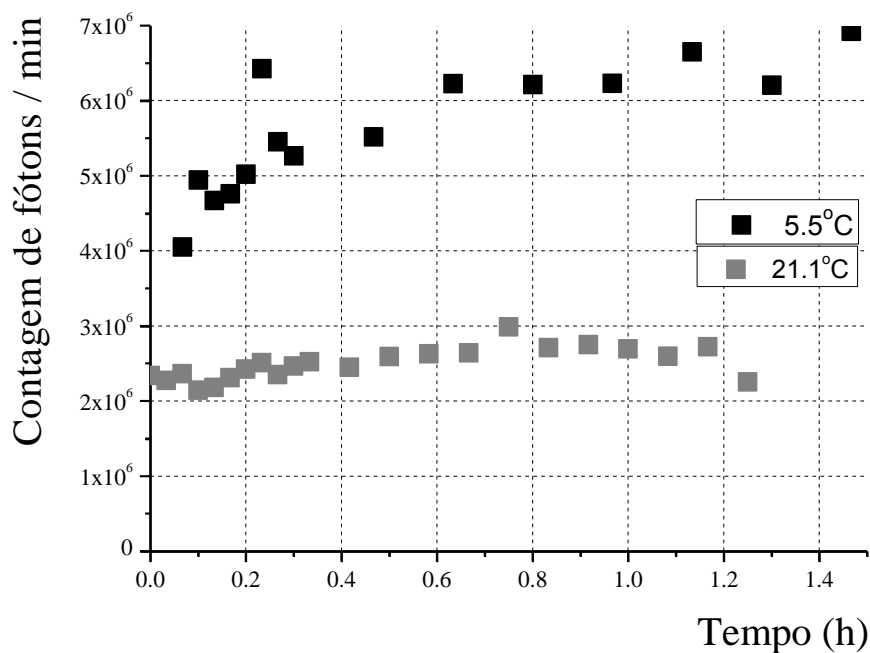


Figura 7.11 - Evolução temporal da contagem de fótons por minuto durante o processo de cristalização.

Incluir valores de  $R_{h2}^0$  e  $c$  numa tabela! Sei que isto foi feito no apêndice mas eu colocaria algo aqui, referente apenas aos ajustes feitos para a equação 88.

### 7.3 Solução e refinamento das estruturas

Com o objetivo de avaliar influência da temperatura nas amostras de lisozima obtidas, foram realizados experimentos de difração de raios X na linha MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncronon (LNLS)[77]. A Figura 7.12 apresenta exemplos de padrões de difração obtidos para esta proteína nas temperaturas de 4°C e 16°C.

Os modelos de estruturas foram obtidos utilizando algoritmo de substituição molecular AMORE e refinados utilizando o algoritmo REFMAC, ambos disponíveis no pacote CCP4[2]. A Figura 7.13 mostra o *Ramachandran plot* obtido para a lisozima em ambas as temperaturas. Os resíduos de

aminoácidos apresentam posições estericamente permitidas. O Apêndice II apresenta os parâmetros coleta de dados de difração de raios X e estatísticas de refinamento realizados neste trabalho.

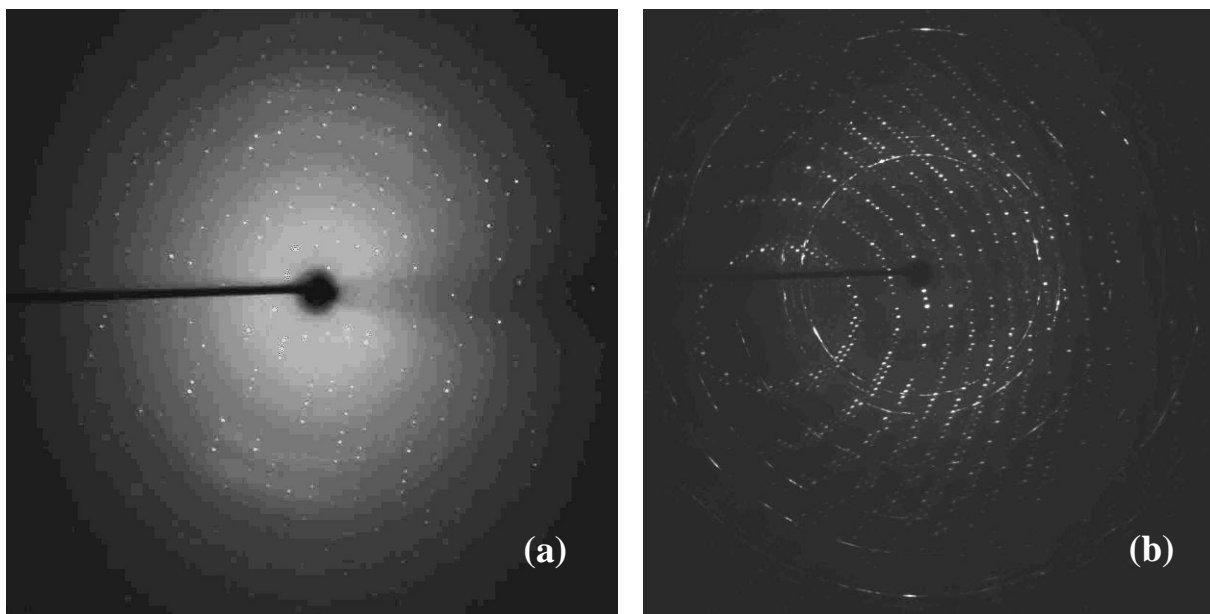


Figura 7.12 - Figuras de difração para cristais de lisozima crescidos à 4°C(a) e 16°C(b).

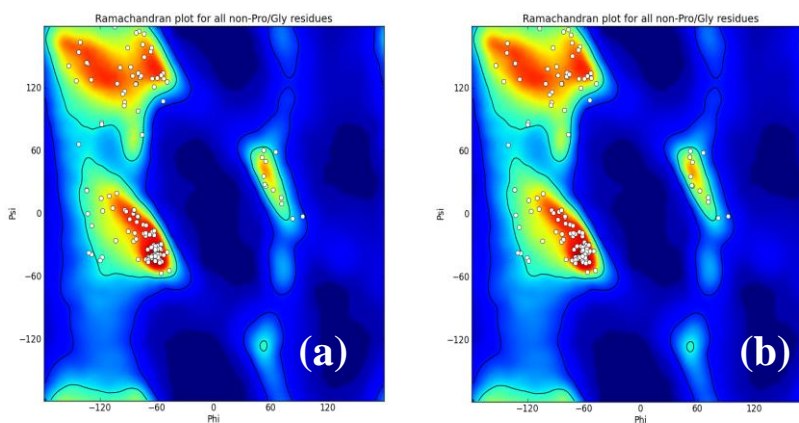


Figura 7.13 - Ramachandran plot para lisozima à (a)4°C e (b)16°C.

As estruturas obtidas para cristais de lisozima crescidos à 4°C e 16°C foram comparadas entre si e com um modelo de referência<sup>xvi</sup> construído e refinado com ajuda de dados medidos até a resolução de 0.94Å. A Figura 7.14 apresenta o fator de desvio isotrópico (B) para lisozima a 4°C, 16°C e para o modelo de referência.

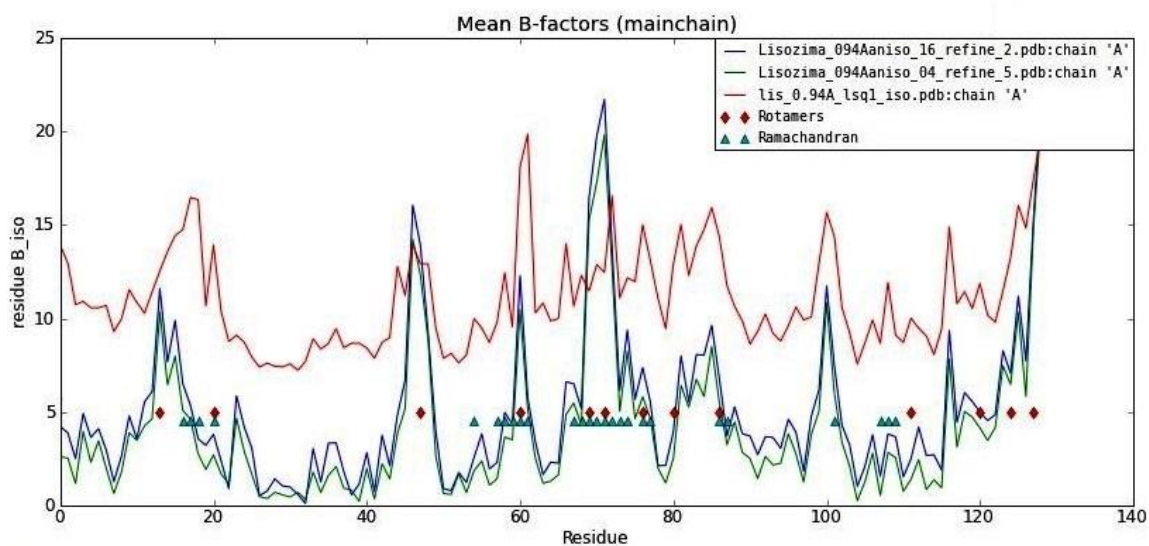


Figura 7.14 - Parâmetro B por resíduo de aminoácido para lisozima à 4°C, 16°C e modelo.

<sup>xvi</sup> PDBID: 1IEE.



## Capítulo 8 - Conclusão

O diagrama de fase da lisozima é conhecido[23] e, portanto, o grau de supersaturação do sistema em relação à temperatura pode ser calculado, conforme a Tabela 8.1. Lembrando que segundo a teoria clássica (equação(8)) o raio crítico é inversamente proporcional ao produto  $T \cdot \ln(S)$ , o raio crítico deveria aumentar da ordem de 17% entre 5.5 °C e 21 °C. No entanto, a análise dos dados obtidos por DLS realizado neste trabalho não foi capaz de detectar o raio crítico durante a nucleação. Estudos preliminares empregando outras técnicas como Ressonância Magnética Nuclear, Espectroscopia Raman e Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS) também não permitiram, definir a natureza física dos núcleos críticos[7].

Temperatura(°C)	S
5,5	14,1
21,1	2,3

*Tabela 8.1 - Grau de Supersaturação (S) em função da temperatura para o sistema medido por DLS.*

Os dados obtidos neste estudo durante a etapa de crescimento mostram a existência de duas populações de agregados. Uma com tamanho da ordem de unidades de nanômetros ( $r_{h1}$ ) e outra que inicia seu crescimento com raio da ordem de 40nm ( $r_{h2}$ ). Resultados semelhante foram relatados em estudos de espalhamento de nêutrons de baixo angulo[78]. Mesmo com a grande variação no grau de supersaturação nas diferentes temperaturas o regime de crescimento de  $r_{h2}$  não sofre alterações. Entre todos os modelos utilizados para ajustar a dinâmica de crescimento da população  $r_{h2}$ , o que melhor se ajusta aos dados experimentais foi o modelo de partículas coloidais esparsamente recobertas por um adsorvente orgânico[76] (Figura 7.10). De acordo com este modelo, a agregação seria limitada pelo número de colisões entre os agregados.

O número de agregados em solução varia dramaticamente com a temperatura. Isto pode ser comprovado pela intensidade de luz espalhada, conforme mostrado na Figura 7.11 e também relatado em experimentos de espalhamento de nêutrons[79] pois, a intensidade de luz espalhada é diretamente proporcional ao número de agentes espalhadores. Desta forma, para temperatura de 5°C o número de agregados é maior que a 21°C. Isto está de acordo com

hipóteses descrita na literatura de que a taxa de nucleação seria superior para temperaturas inferiores[80]. Porém, isto não explica a mudança de regimes de cristalização em 12°C mostrado na Figura 7.2. Este Resultado ainda carece de estudos adicionais.

Embora as amostras apresentem tamanhos diferentes, característicos das temperaturas nas quais foi realizado o crescimento das amostras, não foram observadas mudanças significativas nas estruturas obtidas por difração de raios X. As variações no parâmetro B em relação à temperatura são desprezíveis e o número de moléculas de água das estruturas dos cristais crescidos à 4°C e 16°C, respectivamente 196 e 189, também confirma a semelhança das estruturas.

## Bibliografia

- 1 COX, M. M.; NELSON, D. L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. Artmed, 2011.
- 2 WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica**, v. D67 p. 235-242, 2011.
- 3 WATSON, J. D.; MEYERS, R. M.; CAUDY, A. A. **DNA Recombinante**. W. H. Freeman, 2006.
- 4 DURBIN, S. D.; FEHER, G. Protein Crystallization. **Annual Reviews of Physical Chemistry**, v. 47, p. 171-204, 1996.
- 5 Molecular Dimensions. Disponível em: < <http://www.moleculardimensions.com> >.
- 6 Hampton Research. Disponível em: < [www.hamptonresearch.com](http://www.hamptonresearch.com) >.
- 7 GARCÍA-RUIZ, J. M. Nucleation of Protein Crystals. **Journal of Structural Biology**, v. 142, p. 22-31, 2003.
- 8 LI, X. X. et al. The factors during protein crystallization: a review. **Crystallography Report**, v. 53, n. 7, p. 1291-1296, 2008.
- 9 MCPHERSON, A. **Crystallization of biological molecules**. New York: CSHL Press, 1999.
- 10 DRENTH, J.; HAAS, C. Nucleation in protein crystallization. **Acta Crystallographica**, v. D54, p. 867-872, 1998.
- 11 HAMMADI, Z.; VEESLER, S. New approaches on crystallization under electric fields. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 101, p. 38-44, 2009.
- 12 SAZAKI, G. Crystal quality enhancement by magnetic fields. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 101, p. 45-55, 2009.
- 13 GAVIRA, J. A.; GARCÍA-RUIZ, J. M. Effects of a Magnetic Field on Lysozyme Crystal Nucleation and Growth in a Diffusive Environment. **Journal of Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 6, p. 2610-2615, 2009.
- 14 LU, Q.-Q. et al. Effect of mechanical vibration on protein crystallization. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, p. 473-482, 2010.
- 15 Protein Data Bank. Disponível em: < <http://www.rcsb.org> >.
- 16 RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 95-99, 1963.
- 17 LNBIO. Disponível em: < <http://lnbio.cnpem.br> >.
- 18 SCG. Disponível em: < <http://www.thesgc.org> >.

- 19 SAUTER, C. et al. Structure of tetragonal hen egg-white lysozyme at 0.94 Å from crystals grown by the counter-diffusion method. **Acta Crystallographica** v. D57, p. 1119-1126, 2001.
- 20 LASCHTSCHENKO, P. Über die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung Hühnereiweiß. **Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten**, v. 64, p. 419-427, 1909.
- 21 FLEMING, A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 93, n. 653, p. 306-317, 1922.
- 22 IUPAC Goldbook Disponível em: < <http://goldbook.iupac.org/U06554.html> >.
- 23 CACIOPPO, E.; PUSEY, M. L. The solubility of the tetragonal form of hen egg white lysozyme from pH 4.0 to 5.4. **Journal of Crystal Growth**, v. 114, n. 3, p. 286-292, 1991.
- 24 DESIRAJU, G. R. Crystal: In search of clarity. **Nature**, v. 423, p. 485, 2003.
- 25 ASHERIE, N. Protein Crystallization and Phase Diagrams. **Methods** v. 34, n. 266-272, 2004.
- 26 YOSHIKAWA, I. et al. Systematic analysis of supersaturation and lysozyme crystal quality. **Acta Crystallographica**, v. D57, n. 1621-1629, 2001.
- 27 HOWARD, E. I.; FERNANDEZ, J. M.; GARCÍA-RUIZ, J. M. On the mixing of protein crystallization cocktails. **Journal of Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 6, p. 2707-2712, 2009.
- 28 BAIRD, J. K.; HILL, S. C.; CLUNIE, J. C. Kinetics of protein crystal nucleation and growth in the batch method **Journal of Crystal Growth**, v. 196, n. 2-4, p. 220-225, 1999.
- 29 KOO, E. H.; LANSBURY, P.; KELLY, J. W. Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 9989-9990, 1999.
- 30 AGUZZI, A.; CALELLA, A. M. Prions: protein aggregation and infectious diseases. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 1105-1152, 2009.
- 31 YOUNG, L. R. D.; FINK, A. L.; DILL, K. A. Aggregation of globular proteins. **Accounts of Chemical Research**, v. 26, p. 614-620, 1993.
- 32 KIERZEK, A. M.; ZIELENKIEWICZ, P. Models of protein crystal growth. **Biophysical Chemistry**, v. 91, p. 1-20, 2001.
- 33 GIBBS, J. W. On the Equilibrium of Heterogeneous Substances. **Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences**, v. 3, p. 108-248, 343-524, 1878.
- 34 MARKOV, I. V. **Crystal growth for beginners**. Danvers: World Scientific 1995.
- 35 MULLIN, J. W. **Crystallization**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2001.
- 36 SALINAS, S. R. A. Einstein e a Teoria do Movimento Browniano. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 27, n. 2, p. 263-269, 2005.



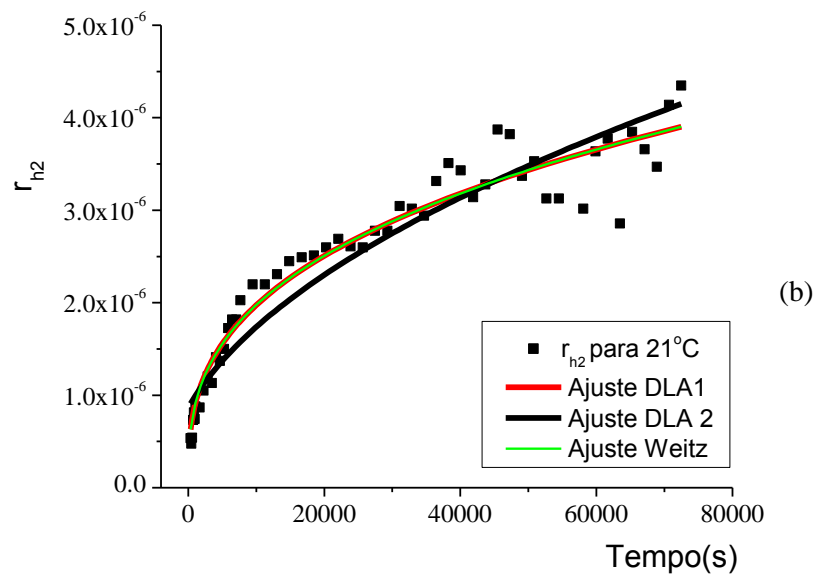
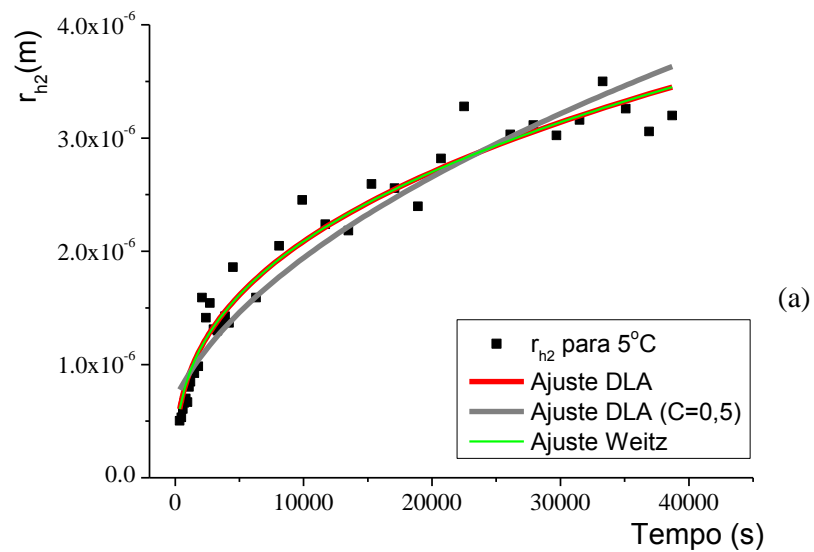
- 37 WANG, Y.; ANNUNZIATA, O. Liquid-liquid phase transition of protein aqueous solutions isothermally induced by protein cross-linking. **Langmuir**, v. 24, p. 2799-2807, 2008.
- 38 FERMANI, S. et al. Heterogeneous crystallization of proteins: is it a prenucleation clusters mediated process? **Journal of Crystal Growth & Design**, v. 13, p. 3110-3115, 2013.
- 39 ILDEFONSO, M.; CANDONI, N.; VEESLER, S. P. Heterogeneous nucleation in droplet-based nucleation measurements. **Journal of Crystal Growth & Design**, v. 13, p. 2107-2110, 2013.
- 40 ERBERSTEIN, W.; GEORGALIS, Y.; SAENGER, W. The influence of temperature on the dynamics of protein precrystallization clusters, studied by photon correlation spectroscopy. **European Biophysics Journal**, v. 22, p. 359-366, 1993.
- 41 GEORGALIS, Y.; SAENGER, W. Time-resolved light scattering studies on protein precrystallization fractal clusters. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 46, p. 165-183, 1993.
- 42 MESQUITA, O. N. **Espectroscopia de correlação de fótons**. 1979. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 43 SATO, T. et al. Effect of Protein Aggregation on the Binding of Lysozyme to Pyrene-Labeled Polyanions. **Langmuir** v. 14, p. 5430-5437, 1998.
- 44 BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic Light Scattering**. New York: John Wiley, 1976.
- 45 COUTO, M. C.; MESQUITA, O. N. Nucleation and aggregation of ZnS crystallites precipitated from a chemical reaction. **Brazilian Journal of Physics**, v. 24, n. 2, p. 502-507, 1994.
- 46 DOAK, A. K. et al. Colloid Formation by Drugs in Simulated Intestinal Fluid. **Journal of Medical Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4259-4265, 2010.
- 47 MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G. A. et al. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, p. 1343-1348, 2008.
- 48 PUSEY, P. N.; PIRIE, A. D.; POON, W. C. K. Dynamics of colloid-polymer mixtures. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 201, n. 1-3, p. 322-331, 1993.
- 49 HARDING, S. E. Applications of light scattering in microbiology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 8, n. 6, p. 489-509, 1986.
- 50 LAUE, M. V. Kritische Bemerkungen zu den Deutungen der Photogramme von Friedrich und Knipping. **Physikalische Zeitschrift** v. 14, n. 10, p. 421-423, 1913.
- 51 BRAGG, W. L. The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Crystal. **Proceedings of the Cambridge Philosophical Society, Mathematical and Physical sciences** v. 17, p. 43-57, 1913.
- 52 RÖNTGEN, W. C. Über eine neue Art von Strahlen. **Annalen der Physik**, v. 300, n. 1, p. 1-11, 1898.

- 53 GIACOVAZZO, C. et al. **Fundamentals of Crystallography**. New York: Oxford University Press, 2011.
- 54 EWALD, P. P. **Dispersion und Doppelbrechung von Elektronengittern**. 1912. 46, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- 55 SCHWARZENBACH, D. **Crystallography**. New Delhi: John Wiley & Sons 1996.
- 56 CULLITY, B. D.; STOCK, S. R. **Elements of X-Ray Diffraction** Massachusetts: Prentice Hall, 2001.
- 57 ALS-NIELSEN, J.; MCMORROW, D. **Elements of Modern X-ray Physics**. London: John Wiley & Sons, 2011.
- 58 EISBERG, R.; RESNICK, R. **Física Quântica**. Editora Campus, 1994.
- 59 FOWLES, G. R. **Introduction to Modern Optics**. Dover Books on Physics, 1989.
- 60 PINHEIRO, C. B. **Estudo Cristalográfico dos Compostos Cs<sub>2</sub>HgBr<sub>4</sub> e Re<sub>6</sub>Se<sub>8</sub>Br<sub>3</sub>**. 1995. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 61 WATSON, G. N. **A Treatise on the Theory of Bessel Functions**. Cambridge: Cambridge Mathematical Library, 1966.
- 62 DRENTH, J. **Principles of Protein X-Ray Crystallography**. New York: Springer, 2010.
- 63 NAVAZA, J. Implementation of molecular replacement in AMoRe. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. D57, n. , p. 1367-1372 2001.
- 64 EMSLEY, P. et al. Features and Development of Coot. **Acta Crystallographica**, v. D66, p. 486-501, 2010.
- 65 MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. **Acta Crystallographica**, v. D53, p. 240-255, 1997.
- 66 GEORGALIS, Y. et al. Lysozyme Aggregation Studied by Light Scattering. I. Influence of Concentration and Nature of Electrolytes. **Acta Crystallographica**, v. D53, p. 691-702, 1997.
- 67 \_\_\_\_\_. Lysozyme Aggregation Studied by Light Scattering. II. Variations of Protein Concentration. **Acta Crystallographica**, v. D53, p. 703-712, 1997.
- 68 Zeiss. Disponível em: < <http://www.zeiss.com> >.
- 69 VEESLER, S. et al. Crystals from Light: Photochemically Induced Nucleation of Hen Egg-White Lysozyme. **Journal of Crystal Growth & Design**, v. 6, n. 7, p. 1631–1635, 2006.
- 70 CHRISTOPHER, G. K.; PHIPPS, A. G.; GRAY, R. J. Temperature-dependent solubility of selected proteins **Journal of Crystal Growth**, v. 191, n. 4, p. 820-826, 1998.
- 71 BARTLING, K.; SAMBANIS, A.; ROUSSEAU, R. W. Dependence of Apoferritin Crystal Growth on Temperature and Cadmium Concentration. **Journal of Crystal Growth & Design**, v. 7, n. 3, p. 569-575, 2007.

- 72 ATAKA, M.; TANAKA, S. The growth of large single crystals of lysozyme. **Biopolymers**, v. 25, n. 2, p. 337-350, 1986.
- 73 IPT-400. Disponível em: < <http://www.memmert.com/> >.
- 74 M. J. LANDSBERG, J. B., C. L. GEE, J. L. MARTIN AND B. HANKAMER. A method for screening the temperature dependence of three-dimensional crystal formation. **Acta Crystallographica**, v. D62, p. 559-562, 2006.
- 75 Nikon. Disponível em: < <http://www.nikon.com/> >.
- 76 WEITZ, D. A.; HUANG, J. S.; SUNG, J. Dynamics of Diffusion-Limited Kinetic Aggregation. **Physical Review Letters**, v. 53, n. 17, p. 1657-1660, 1984.
- 77 LNLS. Disponível em: < <http://lnls.cnpem.br/> >.
- 78 NIIMURA, N. et al. Aggregation in supersaturated lysozyme solution studied by Time-resolved Small Angle Neutron Scattering. **Journal of Crystal Growth**, v. 154, p. 136-144, 1995.
- 79 FINET, S. et al. Lysozyme crystal growth, as observed by small angle X-ray scattering, proceeds without crystallization intermediates. **European Biophysics Journal**, v. 27, n. 3, p. 263-271, 1998.
- 80 SCHMIT, J. D.; DILL, K. Growth Rates of Protein Crystals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 3934-3937, 2012.

# Apêndice I

Ajuste da evolução temporal dos raios  $r_{h2}$  para as temperaturas (a)  $5,5^{\circ}\text{C}$  e (b)  $21,1^{\circ}\text{C}$  utilizando o modelo de crescimento DLA, DLA modificado e modelo de partículas coloidais esparsamente recobertas por um adsorvente orgânico[76].



O modelo de DLA 1 foi apresentado na equação (10):

$$R(t) = R_0(1 + ct)^{\frac{1}{d_f}}$$

O modelo de DLA 2 é dado por:

$$R(t) = A(t + B)^{0.5}.$$

O modelo de Weitz foi apresentado na equação (88).

$$r_{h2}(t) = r_{h2}^0 t^{\frac{1}{c}}.$$

A tabela a seguir mostra os parâmetros de ajuste obtidos para as temperaturas de 5°C e 21°C para os três modelos. Note que C para o modelo DLA 1 não pode ser determinado.

5°C			21°C		
Ajuste DLA 1	Desvio padrão: 0,9578		Ajuste DLA 1	Desvio padrão: 0,94521	
Parâmetros		Erro	Parâmetros		Erro
$R_0$ (m)	1,50E-08	8,92E-05	$R_0$ (m)	3,10E-08	5,90E-05
$c$	58,9902	94594,5627	$c$	17,7927	96809,0006
$d_f$	2,6920	0,2036	$d_f$	2,9068	0,1959

Ajuste DLA 2	Desvio padrão: 0,9296		Ajuste DLA 2	Desvio padrão: 0,90323	
Parâmetros		Erro	Parâmetros		Erro
$A$	1,81E-08	4,65E-10	$A$	1,58E-08	3,43E-10
$B$	1486,2381	429,2644	$B$	3283,3641	890,7885

Ajuste Weitz	Desvio padrão: 0,95901		Ajuste Weitz	Desvio padrão: 0,95067	
Parâmetros		Erro	Parâmetros		Erro
$R_{h2}^0$ (m)	6,82E-08	1,06E-08	$R_{h2}^0$ (m)	8,31E-08	1,36E-08
$1/c$	0,37143	0,01587	$1/c$	0,34397	0,01562

## Apêndice II

Coleta de dados de difração de raios X e estatísticas de refinamento:

	<b>Lisozima (16°C)</b>	<b>Lisozima (4°C)</b>
Comprimento de onda (Å)	1.54056	1.54056
Resolução dos dados (Å) (última camada)	27.05 - 1.65 (1.709 - 1.65)	27.05 - 1.65 (1.709 - 1.65)
Grupo de espaço	P 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Célula Unitária (Å)	a=78.842 b=78.842 c=37.194	a=78.842 b=78.842 c=37.194
Reflexões Únicas	14459 (1438)	14459 (1438)
Completeza (%)	98.86 (99.86)	98.86 (99.86)
$\langle I \rangle / \sigma(I)$	28.85 (8.51)	28.85 (8.51)
Fator R	0.1792 (0.1956)	0.1821 (0.2026)
R-free	0.2269 (0.2632)	0.2220 (0.2663)
Moléculas de água	189	196
Resíduos de aminoácidos	129	129
RMS (Ligações) (Å)	0.008	0.007
RMS(angulos) (°)	1.16	1.12
Ramachandran favorecidos (%)	96	96
Ramachandran discrepantes (%)	0	0
Fator B Médio (Å <sup>2</sup> )	8.60	7.40