

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIAS  
INSTITUTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

LORRAINE ANDRADE MALASPINA

**Estudos bioquímicos e estruturais  
das enzimas Celobiohidrolase e  
Endoxilanase do fungo *Humicola  
grisea* var. *thermoidea***

GOIÂNIA

2014

Lorraine Andrade Malaspina

**Estudos bioquímicos e estruturais das enzimas  
Celobiohidrolase e Endoxilanase do fungo *Humicola  
grisea* var. *thermoidea***

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção de título de Mestre em Física.

**Área de concentração:** Física Experimental e Aplicada

**Orientador:** Prof. Dr. Ivo de Almeida Marques

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria

Goiânia

2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE FÍSICA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA



LORRAINE ANDRADE MALASPINA

Estudos bioquímicos e estruturais das enzimas Celobiohidrolase e  
Endoxilanase do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*

Dissertação apresentada ao Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás  
como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Física.

Aprovada por:

Prof. Dr. Ivo de Almeida Marques  
Instituto de Física  
Universidade Federal de Goiás  
Orientador

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabricia Paula de Faria  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Goiás  
Coorientadora

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Napoleão Fonseca Valadares  
Instituto de Física  
Universidade de Brasília

Goiânia, 08 de dezembro de 2014

*Aos meus filhos.*

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, a minha família, em especial a todos que me ajudaram durante este processo. À minha mãe Ivonete, a minha irmã Thaciana, tia Silvonete, ao meu pai Alfredo. Obrigada Peter Chovanec pelo carinho, grande incentivo, apoio e até mesmo ajuda no laboratório durante o período do desenvolvimento deste projeto, além de edição de figuras presentes neste trabalho, e a todos os outros que acompanharam as dificuldades e ajudaram na medida do possível.

Aos meus professores pela paciência e por compartilharem comigo tamanha sabedoria, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Ivo de Almeida Marques e minha coorientadora Profa. Fabricia Paula de Faria pela ajuda não só durante o desenvolvimento deste trabalho, mas também pela paciência, em especial à Profa. Fabrícia por aceitar o desafio de ensinar um físico em seu laboratório, juntamente com a Profa. Rosália dos Santos Amorim Jesuíno. Aos professores Cirano José Ulhoa, Luiz Artur Mendes Bataus e Silvana Petrofeza da Silva por disponibilizarem seus laboratórios sempre que necessário.

Ao meu antigo Orientador Prof. Carlito Lariucci, a quem eu tenho como meu “pai científico”, que ao longo de toda a minha carreira acadêmica sempre esteve disposto a me ajudar, aconselhar e tirar dúvidas.

Aos Professores Marcos e Ardiley pela paciência e grande contribuição para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos, que mesmo involuntariamente, participaram do meu processo de formação: À Rosane pela amizade e ajuda em cristalografia. A Ana Margarida por me transmitir calma e ajuda nos momentos necessários. A Lais pela energia fornecida via “cupuaçu”. Vanuildo e Emile pela amizade e por conversas valiosas durante os vários “cafés”. Aos novos colegas de laboratório: Saulo, Amanda, Izadora, Ilítia, Carol, Isabelle, Tathiely, Douglas, Alessandro e Syd, que, apesar do pouco tempo de convívio, me aco-

---

lheram em seu laboratório e me contemplaram com uma amizade sincera. Em especial à Lorena, que se tornou uma grande amiga e que me ajudou de forma, sem dúvida, indispensável para a conclusão deste projeto, e a todos os outros que, apesar de não serem citados especificamente aqui, não são ou foram menos importantes.

À Capes pelo suporte financeiro, e ao Laboratório Automatizado de Cristalização de Macromoléculas no Laboratório Nacional de Biociências - CNPEM/ABTLuS em Campinas-SP pela realização dos ensaios robóticos das amostras trabalhadas neste projeto.

Ao Ensino à Distância de Física da UFG, na pessoa do Prof. Osni Silva e Ana Margarida pelo suporte financeiro durante o período em que o apoio financeiro da Capes já havia acabado.

À GE Healthcare pela doação de amostras das membranas de ultra-filtração de material sintético tão difíceis de serem obtidas no laboratório, em especial aos funcionários Alécio e Carolina Aoki pela rica discussão sobre o trabalho, e Rafael Santos que foi muito prestativo e rápido no envio do material.

“Faço tudo o que um homem  
faz, se faço mais, deixo de se-lô.”

William Shakespeare

---

# Sumário

Agradecimentos	IV
Lista de Figuras	XI
Lista de Tabelas	XVII
Resumo	XVIII
Abstract	XX
Introdução	1
<b>1 Fundamentos biológicos</b>	<b>2</b>
1.1 Fontes de energia . . . . .	2
1.2 Biomassa Vegetal . . . . .	4
1.3 Conversão da biomassa via hidrólise enzimática . . . . .	6
1.4 Estruturas Tridimensionais . . . . .	9
1.4.1 Endoxilanasas . . . . .	9
1.4.2 Celobiohidrolases . . . . .	11
1.5 O fungo <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> . . . . .	13
1.6 Sistema celulolítico do fungo <i>H. grisea</i> . . . . .	14
1.7 Sistema xilanolítico do fungo <i>H. grisea</i> . . . . .	15
1.8 Expressão heteróloga em <i>Pichia pastoris</i> . . . . .	16
1.8.1 Clonagem em <i>Pichia pastoris</i> . . . . .	17
1.8.2 Vetores de Expressão . . . . .	19
1.8.3 Linhagens de <i>Pichia pastoris</i> . . . . .	20

---

1.8.4	Produção de proteínas recombinantes em <i>Pichia pastoris</i> em frasco	20
<b>2</b>	<b>Fundamentos cristalográficos</b>	<b>22</b>
2.1	Produção ( <i>In House</i> ) de raios X . . . . .	22
2.2	Difração de raios X . . . . .	27
2.3	Cristais . . . . .	28
2.4	Difração de raios X por cristais . . . . .	33
2.5	Índices de Miller . . . . .	36
2.6	Extinções Sistemáticas . . . . .	39
2.7	Fator de Estrutura . . . . .	40
2.8	Determinação de estruturas monocristalinas . . . . .	41
<b>3</b>	<b>Cristalografia de Macromoléculas</b>	<b>43</b>
3.1	Cristalização de Proteínas . . . . .	44
3.2	Coleta e processamento de dados . . . . .	46
3.3	Determinação da estrutura . . . . .	48
3.3.1	Métodos de Resolução . . . . .	49
3.4	Refinamento . . . . .	51
<b>4</b>	<b>Objetivos</b>	<b>53</b>
4.1	Objetivos gerais . . . . .	53
4.2	Objetivos específicos . . . . .	53
<b>5</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>55</b>
5.1	Materiais . . . . .	55
5.1.1	Microrganismos . . . . .	55
5.1.2	Vetores . . . . .	55
5.1.3	Enzimas - Endonucleases de restrição . . . . .	56
5.1.4	Soluções Estoque . . . . .	57
5.1.5	Soluções para extração de plasmídeos (mini-prep) . . . . .	61
5.1.6	Meios de Cultura . . . . .	62
5.1.7	Soluções utilizadas nos ensaios enzimáticos . . . . .	64
5.1.8	Solução utilizada nos ensaios de dosagem proteica. . . . .	65

5.1.9	Soluções utilizadas nos ensaios de eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida. . . . .	66
5.1.10	Soluções utilizadas nos ensaios de eletroforese em gel de agarose. . .	68
5.1.11	Soluções utilizadas para revelação de géis desnaturantes de poliacrilamida - Azul de coomassie. . . . .	69
5.1.12	Soluções utilizadas para revelação de géis desnaturantes de poliacrilamida - Nitrato de prata. . . . .	70
5.1.13	Kits de uso específico em Biologia Molecular . . . . .	71
5.2	Métodos . . . . .	71
5.2.1	Cultivo e manutenção de microrganismos . . . . .	71
5.2.2	Digestão de DNA com endonucleases . . . . .	72
5.2.3	Preparação de células bacterianas competentes para eletroporação .	72
5.2.4	Transformação de células de <i>E. coli</i> por eletroporação . . . . .	73
5.2.5	Mini-Preparação de Plasmídeos por Lise Alcalina . . . . .	73
5.2.6	Maxi-Preparação de Plasmídeos por Lise Alcalina . . . . .	74
5.2.7	Preparo de Células Competentes de <i>P. pastoris</i> . . . . .	74
5.2.8	Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose . . . . .	75
5.2.9	Precipitação de DNA . . . . .	75
5.2.10	Transformação de Células de <i>P. pastoris</i> por Eletroporação . . . . .	75
5.2.11	Seleção dos Transformantes Produtores de CBH1.2r . . . . .	75
5.2.12	Produção das enzimas CBH1.2r e HXYN2r em frasco . . . . .	76
5.2.13	Determinação da atividade celulolítica pelo método dos Açúcares Redutores . . . . .	77
5.2.14	Dosagem de proteínas . . . . .	80
5.2.15	Eletroforese de ácidos nucléicos em gel de agarose . . . . .	80
5.2.16	Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) . . . . .	80
5.2.17	Purificação através da precipitação de proteínas em sais neutros. . .	82
5.2.18	Ensaio de cristalização . . . . .	83
5.2.19	Coleta de dados por difração de raios X . . . . .	84
5.2.20	Resolução de estrutura . . . . .	84

---

<b>6</b>	<b>Resultados e Discussões</b>	<b>85</b>
6.1	Expressão das proteínas . . . . .	85
6.2	Dosagem da Atividade Enzimática . . . . .	87
6.3	Purificação das Proteínas . . . . .	89
6.4	Ensaio de cristalização das proteínas. . . . .	93
6.5	Obtenção de novos produtores da enzima CBH1.2 . . . . .	95
6.5.1	Transformação de células de <i>E. coli</i> . . . . .	96
6.5.2	Transformação de células de <i>P. pastoris</i> . . . . .	98
6.5.3	Seleção dos melhores transformantes . . . . .	100
6.5.4	Expressão da enzima CBH para novos transformantes . . . . .	101
6.6	Lisozima e teste do novo difratômetro . . . . .	102
6.7	Coleta de dados para cristal de Lisozima . . . . .	103
6.8	Resolução de estrutura . . . . .	104
<b>7</b>	<b>Conclusão</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>108</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>109</b>

# Lista de Figuras

1.1	Biomassa lignocelulósica. . . . .	4
1.2	Representação esquemática de uma microfibrila de celulose. . . . .	5
1.3	Representação esquemática de uma microfibrila de celulose mostrando as regiões amorfa e cristalina. . . . .	6
1.4	Visualização esquemática do sistema celulolítico . . . . .	7
1.5	Uma visão esquemática de um sistema hemicelulolítico. As enzimas ativas no substrato estão listadas na tabela. . . . .	8
1.6	Estrutura representativa das famílias de glicosídeo hidrolases . . . . .	10
1.7	Estrutura tridimensional da endoxilanasase <i>NpXyn11A</i> , de <i>N. patriciarum</i> . . . . .	11
1.8	Imagem esquemática dos domínios catalíticos das CBH's I e II conectado <i>hinge</i> flexível. . . . .	12
1.9	Estrutura tridimensional do domínio catalítico da CBH I do fungo <i>T. reesei</i> . Visualização das duas folhas $\beta$ antiparalelas, quatro $\alpha$ -hélices e alças conectando as fitas $\beta$ . . . . .	13
1.10	Representação do sítio ativo de uma celobiohidrolase e de uma endoglicanase. <b>A.</b> Sítio ativo em forma de túnel de uma celobiohidrolase (código PDB 1BVW). <b>B.</b> Sítio ativo em forma de fenda de uma endoglicanase (código PDB 1TML). . . . .	14
1.11	Integração no genoma de <i>P. pastoris</i> , por inserção (A e B) e por substituição do gene (C). . . . .	18
2.1	Representação de um tubo de raios X. . . . .	22
2.2	Representação esquemática da produção de raios X. . . . .	23
2.3	Espectro do Molibdênio. . . . .	25

2.4	Transições atômicas e emissão de raios X. . . . .	26
2.5	Princípio de Huygens. . . . .	27
2.6	Cristal de quartzo. . . . .	28
2.7	(A) Obra de Maurits C. Escher simbolizando simetria. (B) Construção por translação tridimensional. . . . .	29
2.8	Operação de inversão em torno de um ponto. . . . .	30
2.9	Imagem de um arabesco gerado por reflexão. . . . .	30
2.10	Célula unitária com parâmetros de rede. . . . .	32
2.11	Redes de Bravais. . . . .	34
2.12	Imagem esquemática do experimento de Laue. . . . .	34
2.13	Fotografia do padrão de difração de um cristal de sulfato de cobre. . . . .	35
2.14	Interferência entre raios a nível planar. . . . .	35
2.15	Planos representados pelos índices de Miller. . . . .	36
2.16	Difração por dois centros espalhadores. . . . .	37
2.17	Vetores do espaço direto e recíproco. . . . .	39
3.1	Diagrama de fases bidimensional de uma proteína. . . . .	45
5.1	Representação esquemática do mapa físico do vetor pHIL-D2 para expressão em <i>P. pastoris</i> . Esse vetor possui 8,2 kb, possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção em bactéria, origem de replicação em bactéria (ori-pBR322), marca de seleção auxotrófica HIS4, promotor e terminador AOX1 . . . . .	56
5.2	Placa contendo os clones transformantes de <i>P. pastoris</i> produtores da enzima CBH1.2r após 3 dias de incubação a 30 °C em meio MD. . . . .	77
6.1	Perfil proteico, em função do tempo de expressão, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura <i>P. pastoris</i> contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo <i>H. grisea</i> . Amostras preparadas diretamente do sobrenadante. Gel corado com azul de coomassie. . . . .	86

- 6.2 Perfil proteico, em função do tempo de expressão, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Amostras preparadas diretamente do sobrenadante. Gel corado com nitrato de prata. . . . . 86
- 6.3 Perfil proteico, em função do tempo de expressão, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima HXYN2 do fungo *H. grisea*. Amostras preparadas com precipitante TCA. Gel corado com azul de coomassie. . . . . 86
- 6.4 Perfil de atividade CMCase, em função do tempo de expressão, para o sobrenadante do meio de cultura da levedura *P. pastoris* (linhagem GS115) produtora da enzima CBH1.2 de *H. grisea*. Cultivo em meio BMMY-U a 30 °C e 200 rpm. . . . . 88
- 6.5 Perfil de atividade xilanolítica, em função do tempo de expressão, para o sobrenadante do meio de cultura da levedura *P. pastoris* (linhagem GS115) produtora da enzima HXYN2 de *H. grisea*. Cultivo em meio BMMY-U a 30 °C e 200 rpm. . . . . 88
- 6.6 Perfil proteico, em função da concentração de sulfato de amônio, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Gel corado com azul de coomassie. . . . . 90
- 6.7 Perfil proteico do precipitado e sobrenadante, para adições de 30 e 40% de sulfato de amônio, após centrifugação do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Gel corado com azul de coomassie. . . . . 90
- 6.8 Perfil proteico do precipitado e sobrenadante, para adições de 30, 33 e 36% de sulfato de amônio, após centrifugação do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Gel corado com azul de coomassie. . . . . 91

- 6.9 Perfil proteico, em função da concentração de sulfato de amônio, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima HXYN2 do fungo *H. grisea*. Gel corado com azul de coomassie. . . . . 91
- 6.10 Perfil proteico do precipitado e sobrenadante, para adições de 12, 14 e 24% de sulfato de amônio, após centrifugação do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima HXYN2 do fungo *H. grisea*. Gel corado com azul de coomassie. . . . . 92
- 6.11 Amostra da enzima HXYN2r no concentrador com corte de peso molecular de 10 kDa de corte. Vemos que a solução proteica concentrada apresenta coloração mais escura. . . . . 92
- 6.12 Perfil proteico, em gel desnaturante, para HXYN2r após os ensaios de purificação com membranas de ultrafiltração com corte de peso molecular de 10 e 30 kDa. Amostras preparadas com precipitante TCA e coradas com nitrato de prata. A amostra purificada foi diluída sete vezes em comparação ao sobrenadante inicial. . . . . 93
- 6.13 Precipitados granulares obtidos nos ensaios robóticos de cristalização no Laboratório Automatizado de Cristalização de Macromoléculas (Robolab/LNBio/ CNPEM) em campinas - SP, para a enzima CBH1.2r. . . . . 94
- 6.14 Cristais obtidos em ensaios manuais utilizando como solução precipitante 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 2%(v/v) PEG 400 e 2 M Sulfato de Amônio. . . . . 95
- 6.15 Cristais obtidos em ensaios manuais utilizando como solução precipitante 0,1 M HEPES sodium salt pH 7,5, 2%(v/v) PEG 400 e 2 M Sulfato de Amônio. . . . . 95
- 6.16 (A) Vetor aberto no sítio de reconhecimento da enzima de restrição EcoR I com inserto de cDNA (sticky ends). (B) Vetor aberto no sítio de reconhecimento da enzima de restrição EcoR I com inserto de cDNA com extremidades compatíveis com EcoR I. . . . . 96
- 6.17 Vetor com inserto de cDNA com extremidades compatíveis com EcoR I no sítio de reconhecimento da enzima de restrição EcoR I. O inserto contendo o cDNA da enzima de interesse se encontra em vermelho. . . . . 97

- 6.18 **(A)** Simulação do perfil de fragmentos de DNA em gel de agarose após a digestão do vetor pHIL-D2 contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea* com a enzima de EcoR I. **(B)** Gel de agarose contendo o produto da digestão do vetor pHIL-D2 contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea* com a enzima de EcoR I revelado utilizando a incidência de luz ultravioleta no sistema Gel Doc<sup>TM</sup> EZ System da Bio-Rad. . . . . 98
- 6.19 **(A)** Simulação do perfil de fragmentos de DNA em gel de agarose após a digestão do vetor pHIL-D2 contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea* com a enzima de Not I. **(B)** Gel de agarose contendo o produto da digestão do vetor pHIL-D2 contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea* com a enzima de Not I revelado utilizando a incidência de luz ultravioleta no sistema Gel Doc<sup>TM</sup> EZ System da Bio-Rad. . . . . 99
- 6.20 Produção de transformantes de *P. pastoris* em placa deepwell. . . . . 100
- 6.21 Perfil proteico dos sobrenadantes de cultura dos transformantes 2, 7, 20, 25 e 26 da nova transformação da levedura *P. pastoris* produtores da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Amostras preparadas com precipitante TCA e coradas com azul de coomassie. . . . . 100
- 6.22 Perfil proteico, em função do tempo de expressão, do sobrenadante de cultura da linhagem SMD1168 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Amostras preparadas com precipitante TCA. Gel corado com azul de coomassie. . . . . 101
- 6.23 Perfil de atividade CMC<sub>Case</sub>, em função do tempo de expressão, para o sobrenadante do meio de cultura da levedura *P. pastoris* (linhagem SMD1168) produtora da enzima CBH1.2 de *H. grisea*. Cultivo em meio BMMY-U a 30 °C e 200 rpm. . . . . 102
- 6.24 Cristais de lisozima obtidos em ensaios manuais. **A:** Concentração 1:1 de solução contendo lisozima e solução precipitante. **B:** Concentração 2:1 de solução contendo lisozima e solução precipitante. . . . . 103
- 6.25 Imagem de difração do cristal de lisozima coletada no difratômetro KAPPA APEX DUO, no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da UFG. 104

6.26 Representação da estrutura tridimensional obtida para a Lisozima. Figura gerada com o software Pymol [1]. . . . . 105

# Lista de Tabelas

1.1	Composição química de biomassas lignocelulósicas ( <i>in natura</i> ) com potencial para produção de etanol de segunda geração. . . . .	5
1.2	Exemplos de proteínas de fungos expressas em <i>P. pastoris</i> . . . . .	19
2.1	Os 32 grupos grupos de ponto. . . . .	31
2.2	Elementos de simetria (nomenclatura de Hermann-Mauguin). . . . .	31
2.3	Sistemas cristalinos. . . . .	33
2.4	Extinções sistemáticas provocadas por elementos de simetria. . . . .	40
5.1	Dosagem de atividade celulolítica em CMC pela enzima CBH1.2r. . . . .	78
5.2	Dosagem de atividade xilanolítica em xilana pela enzima HXYN2r. . . . .	78
6.1	Concentrações totais de proteínas no sobrenadante de cultura após 24, 48, 96 e 144 horas de expressão para a enzima CBH1.2 (linhagem GS115). Quantificação via método de Bradford. . . . .	87
6.2	Concentrações totais de proteínas no sobrenadante de cultura após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de expressão para a enzima HXYN2 (linhagem GS115). Quantificação via método de Bradford. . . . .	87
6.3	Concentrações totais de proteínas no sobrenadante de cultura após 24, 48, 72 e 96 horas de expressão para a enzima CBH1.2r (linhagem SMD1168). Quantificação via método de Bradford. . . . .	102

# Resumo

A obtenção da estrutura tridimensional de uma enzima pode ser utilizada como passo inicial em projetos de engenharia genética e engenharia enzimática com intuito de otimização da atividade catalítica e/ou a produção em escala industrial de enzimas alvo. Atualmente, a cristalografia é o método mais empregado para a determinação de estruturas tridimensionais de macromoléculas.

A biomassa vegetal, na forma de celulose, hemicelulose e lignina, apresenta grande potencial para aplicações biotecnológicas. Com a crescente demanda por fontes renováveis de energia, tem-se proposto sua utilização para a obtenção de energia, os ditos biocombustíveis. Para esse fim, a principal abordagem que se tem procurado é a degradação da biomassa via hidrólise enzimática. Neste contexto, o estudo de micro-organismos capazes de realizar a degradação da biomassa e o estudo das enzimas envolvidas no processo apresentam papel chave.

Particularmente, o fungo termófilo *Humicola grisea* var. *thermoidea* apresenta produção significativa de enzimas lignocelulolíticas ativas a alta temperatura e tem sido considerado um forte candidato para aplicações industriais. Contudo, a literatura científica ainda carece de informações estruturais sobre as enzimas do fungo envolvidas na hidrólise da lignocelulose. Em trabalhos anteriores, a enzima celulolítica celobiohidrolase (CBH1.2) de *H. grisea* foi identificada e clonada em *Pichia pastoris* bem como uma das endoxilanases (HXYN2) deste mesmo organismo.

Neste projeto de mestrado, foram expressadas as enzimas CBH1.2 e HXYN2 utilizando sistema heterólogo de expressão, obtendo rendimento satisfatório para ensaios *in vitro*. Foram estabelecidos protocolos de purificação via precipitação por sulfato de amônio e realizados experimentos iniciais de atividade enzimática via o método dos açúcares redutores para as duas enzimas.

Foi encontrada condição de cristalização para a enzima CBH1.2r onde foram obtidos pequenos cristais em forma de agulha nos ensaios de cristalização. Além deste, também foi realizada a clonagem da enzima CBH1.2 de *Hemicola grisea* no vetor de expressão pHIL-D2 (para expressão extracelular). Este vetor foi utilizado para transformar as linhagens SMD1168 e GS115 da levedura *P. pastoris* ambas com o genótipo his4-. Foram detectados transformantes capazes de secretar a proteína ativa em ambas as linhagens.

# Abstract

Obtaining 3-dimensional structure of an enzyme can be used as an initial step in projects of genetic engineering and enzymatic engineering when aiming for optimization of catalytic activity and/or production of target enzymes on an industrial scale. Currently, crystallography is the most widely used method for the determination of three-dimensional structures of macromolecules.

The plant biomass in the form of cellulose, hemicellulose and lignin, have great potential for biotechnological applications. With the growing demand for renewable energy sources, its been proposed it's use to obtain energy, called biofuels. For such purpose, the main approach is the search of the degradation of biomass via enzymatic hydrolysis. In this context, the study of microorganisms capable of carrying out the degradation of biomass and the study of the enzymes involved in this process play a key role.

Particularly, the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* presents significant production of active lignocellulolytic enzymes at high temperature and has been considered a strong candidate for industrial applications. However, the scientific literature still lacks of structural information on fungal enzymes involved in the hydrolysis of lignocellulose. In previous work, the cellulolytic enzyme cellobiohydrolase (CBH1.2) from *Humicola grisea* has been identified and cloned into *Pichia pastoris* as well as one of the endoxylanases (HXYN2) from this same organism.

In this master's project, the enzymes CBH1.2 and HXYN2 were expressed using heterologous expression system obtaining satisfactory yield for *in vitro* assays. Purification protocols were established via precipitation by ammonium sulfate and initial experiments of enzyme activity were performed via the reducing sugars method for both enzymes.

Crystallization conditions were found for the enzyme CBH1.2r, where small needle-shaped crystals were obtained in crystallization trials. In addition to this, the cloning of the enzyme CBH1.2 from *Hemicola grisea* with the pHIL-D2 expression vector (for extracellular expression) was performed. This vector was used to transform GS115 and SMD1168 strains of the yeast *P. pastoris* both with the genotype his4-. Transformants that were able to secrete active protein were detected in both strains.

# Introdução

O presente trabalho apresenta pesquisa em região de fronteira entre física, biologia e biologia molecular, por esta razão, dividiremos o mesmo em 8 capítulos, para sua melhor compreensão. Nos capítulos 1, 2 e 3 expomos a revisão bibliográfica necessária para a compreensão do projeto de pesquisa de mestrado. No capítulo 1 apresentamos as fontes de energia, biomassa vegetal, enzimas e hidrólise enzimática, características e estudos anteriores sobre o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* e expressão heteróloga da enzima alvo em *Pichia pastoris*. No capítulo 2, apresentamos os fundamentos da cristalografia, desde a geração de raios X até os métodos de resolução de estruturas, e no capítulo 3 se encontram fundamentos específicos de cristalografia de macromoléculas. Caso o leitor já possua conhecimento suficiente nos tópicos apresentados nestes 3 capítulos iniciais, ele poderá, sem perda de entendimento, iniciar sua leitura a partir do quarto capítulo desta dissertação. No Capítulo 4 apresentamos, de forma sucinta, os objetivos gerais e específicos deste trabalho. A primeira parte do Capítulo 5 temos a descrição dos materiais, enquanto que na segunda parte apresentamos a metodologia utilizada nos experimentos. A leitura do quinto capítulo desta dissertação é opcional para o leitor que já possui conhecimento dos métodos utilizados, tais como: transformação de células bacterianas, transformação em *P. pastoris*, expressão heteróloga de proteínas, análises de atividades enzimáticas, eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poli(acrilamida), dosagem por método de Bradford, purificação por precipitação em sulfato de amônio, cristalização de macromoléculas e resolução de estruturas cristalinas por difração de raios X. No capítulo 6, apresentamos os resultados obtidos e discussão dos mesmos. A conclusão deste trabalho se encontra no capítulo 7. Por fim, no último Capítulo listamos as perspectivas para futuros projetos cristalográficos para as demais enzimas do fungo *Humicola grisea* envolvidas na hidrólise enzimática da lignocelulose.

# Capítulo 1

## Fundamentos biológicos

### 1.1 Fontes de energia

Os combustíveis fósseis: petróleo, gás natural e seus derivados, suprem atualmente 55% do consumo mundial de energia. Porém estimativas mostram que em aproximadamente 40 anos a população mundial demandará uma quantidade de combustíveis maior do que a disponibilidade de combustíveis fósseis [2]. Logo, novas fontes de energia são necessárias.

As fontes de energia podem ser divididas em duas classes quanto ao tempo de reposição natural, temporárias (ou não permanentes) e renováveis (ou permanentes). As fontes de energia temporárias são aquelas cujo tempo de reposição natural é muito longo, milhares ou milhões de anos. Estas provém, em grande parte, da queima de combustíveis fósseis, o qual libera gases envolvidos no efeito estufa apresentando assim alto impacto ambiental [3]. Por outro lado, as fontes renováveis são mais rapidamente repostas pela natureza. Combustíveis obtidos destas fontes de energia são aqueles que usam como matéria-prima elementos tais como a cana-de-açúcar (utilizada para a fabricação do etanol) e a mamona (utilizada para a fabricação do biodiesel).

A energia pode ser obtida da biomassa através da transformação de produtos de origem animal ou vegetal para a produção de energia calorífica, elétrica, entre outras, a partir da transformação de resíduos orgânicos é possível obter combustíveis (chamados de biocombustíveis), como o biogás, o bioetanol e o biodiesel. Convém destacar que a biomassa embora renovável, não é inesgotável. No Brasil o etanol, produzido a partir

da cana-de-açúcar, já substitui metade da gasolina que seria consumida [4, 5, 6], influenciando, desta forma, o seu uso no mercado externo como alternativa energética [7]. Biocombustíveis de primeira geração, a partir da cana-de-açúcar, são aqueles gerados pelo processamento industrial do colmo (caldo) da planta. No caldo há açúcares disponíveis para sofrerem o processo de fermentação e, assim, consegue-se a obtenção do etanol.

Na cana-de-açúcar, cerca de um terço da energia solar absorvida é fixada como açúcar [8], enquanto o restante da energia absorvida corresponde, entre outras coisas, a fibra vegetal, composta de celulose, hemicelulose e lignina, que constituem o bagaço e a palha.

A utilização de resíduo de bagaço de cana em bioprocessos é uma alternativa racional para produção de substratos, uma ajuda para solucionar o problema da poluição ambiental, além de reduzir a probabilidade do esgotamento natural da fonte.

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto da cultura da cana-de-açúcar que se acumula em grande quantidade nas usinas no Brasil, e poderiam ser utilizados na produção de etanol [9]. Esse biocombustível obtido através da fermentação de açúcares presentes no bagaço da cana são chamados de biocombustíveis de segunda geração. Tais biocombustíveis ainda não estão no mercado, porém estão em fase de intensa pesquisa para a busca de um processo industrial economicamente viável, que faça com que açúcares presentes nos polissacarídeos da parede celular possam ser convertidos a monossacarídeos para sofrerem a fermentação, tal como o que ocorre com a sacarose oriunda do caldo da cana.

A obtenção de bioetanol com base em materiais lignocelulósicos envolverá a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis para a produção do bioetanol. Para executar essa tarefa, utilizar-se-ão de tecnologias complexas e multifásicas, com base no uso de rotas ácidas e/ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina.

Diante da prospecção por uma tecnologia economicamente viável, o setor ambiental pode se beneficiar uma vez que, se os biocombustíveis de segunda geração começarem a ser produzidos, a produtividade de etanol por hectare de terra plantada com cana aumentará, já que além do caldo, o bagaço e a palhada estariam também fornecendo açúcares para a produção de etanol [10].

## 1.2 Biomassa Vegetal

A biomassa vegetal (ou biomassa lignocelulósica) produzida nas florestas e demais vegetações é composta por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e pela lignina, polímero complexo de grupos metoxi e fenilpropânicos, que mantém as células unidas [11], formando assim a microfibrila celulósica (Figura 1.1). A fração de cada uma destas partes na biomassa vegetal varia de acordo com a sua fonte. A Tabela 1.1 apresenta esse fracionamento para algumas fontes [12].

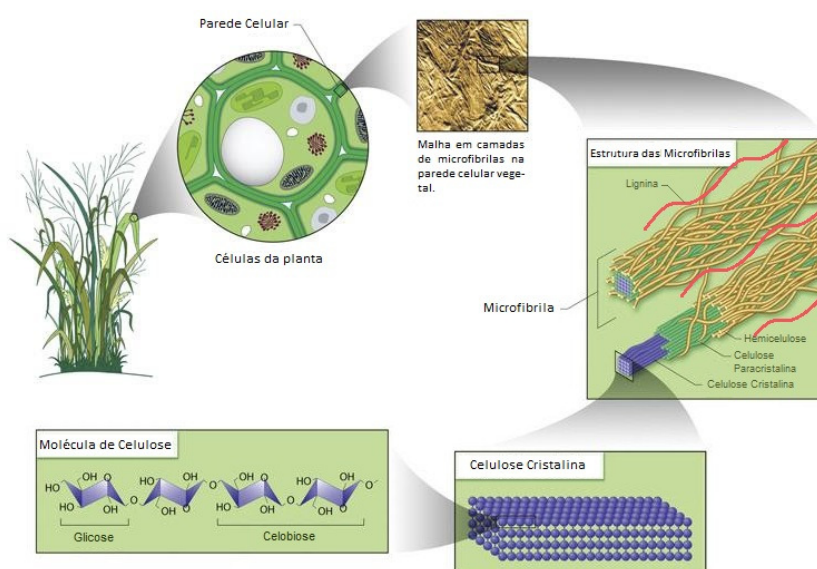


Figura 1.1: Biomassa lignocelulósica (Adaptada de [13]).

A fração celulósica (40%-60% da matéria seca)<sup>1</sup> é formada pela junção de polímeros lineares do dímero glicose-glicose (celobiose), que formam fibrilas com, em média, cem monômeros de glicose, os quais se empacotam paralelamente formando microfibrilas de celulose. Esse empacotamento envolve ligações de van der Waals e de hidrogênio. Devido a essas interações intermoleculares e a completa ausência de água na estrutura da microfibrila, a celulose se torna uma estrutura mais rígida e insolúvel, garantindo proteção osmótica e resistência mecânica, dificultando assim a sua conversão em monossacarídeos fermentáveis [14, 15].

A celulose, é definida pela sequência de resíduos  $\beta$ -D-glicopiranosídicos unidos por ligações covalentes, formando o homopolímero de anidroglicose, ou seja, um homo-

<sup>1</sup>Para o bagaço da cana-de-açúcar

Tabela 1.1: Composição química de biomassas lignocelulósicas (*in natura*) com potencial para produção de etanol de segunda geração [12].

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

polissacarídeo de açúcares de D-Glicose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -D (1 $\rightarrow$ 4), de fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$  (Figura 1.5). Cada resíduo de D-glicose apresenta orientação de 180° em relação ao resíduo adjacente. A extremidade da cadeia de celulose onde se encontra o carbono anomérico livre é chamada de extremidade redutora, ao passo que a extremidade onde o carbono anomérico não está disponível é chamada de extremidade não redutora.

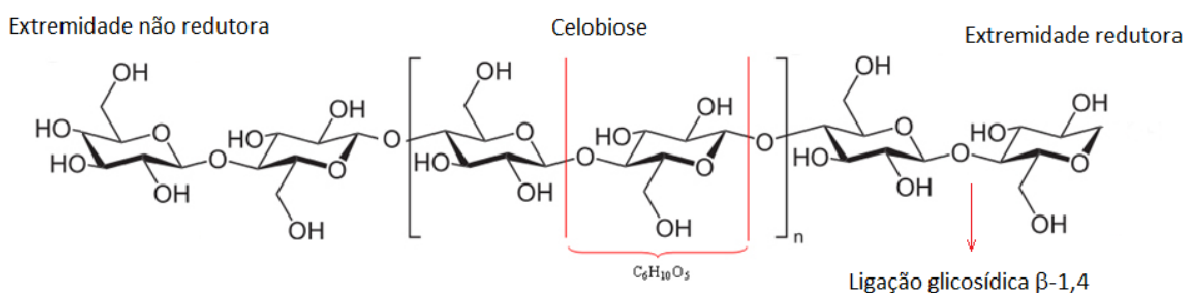


Figura 1.2: Representação esquemática de uma microfibrila de celulose.

As fibras de celulose apresentam duas regiões estruturalmente distintas: regiões cristalinas, com alto grau de cristalinidade, e regiões amorfas, menos compactas e com maior distanciamento entre as microfibrilas (Figura 1.3).

Por sua vez, a hemicelulose (20%-40%), em geral, é um hetero-polissacarídeo, constituída de uma cadeia principal de xilose com várias ramificações, os principais monossacarídeos que compõem a hemicelulose são: D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose,

### 1.3 Conversão da biomassa via hidrólise enzimática Fundamentos biológicos

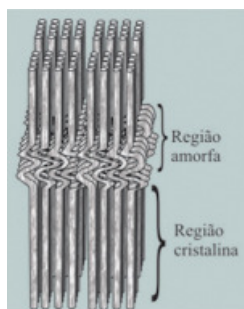


Figura 1.3: Representação esquemática de uma microfibrila de celulose mostrando as regiões amorfa e cristalina.

D-galactose, L-raminose, ácido D-galacturônico e ácido D-glicurônico. As ligações glicosídicas são, em maioria, do tipo  $\beta$ -1,4 (Figura 1.2). As ramificações interagem com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade [16]. A hemicelulose é muito mais fácil de ser hidrolisada do que a celulose, esta característica é usualmente atribuída ao caráter amorfo destes polissacarídeos [15], mas a fermentação dos açúcares de cinco carbonos (pentoses) é menos favorável energeticamente quanto os processos envolvendo a glicose. Apesar de não ser energeticamente favorável a fermentação dos açúcares provenientes da xilana (xilose), esta desempenha importante papel na ligação das fibras e na integridade da parede celular, dificultando assim o acesso a celulose, logo o estudo da hidrólise da xilana para atuação das celulosas se torna um fator importante, tendo em vista que a xilana constitui o principal componente da hemicelulose.

Já a lignina (10%-25%) não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo pretendida, pois, para a produção de bioetanol por rotas fermentativas. Essa fração, no entanto, desempenha um papel crítico para o sucesso da tecnologia de hidrólise da biomassa, pois no processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina e, conseqüentemente, influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise [17].

### 1.3 Conversão da biomassa via hidrólise enzimática

Os fungos são muito importantes na natureza, pois sua principal função é decompor toda matéria orgânica morta, fazendo assim a reciclagem de elementos químicos fundamentais para os demais organismos, como por exemplo, o carbono. Alguns deles

### 1.3 Conversão da biomassa via hidrólise enzimática Fundamentos biológicos

são capazes de degradar a celulose e hemicelulose da biomassa vegetal, pois produzem um complexo enzimático capaz de hidrolisar estes polissacarídeos.

As enzimas que degradam celulose, ou seja, celulases, são produzidas por microorganismos como bactérias e fungos [14]. Em fungos as celulases são classificadas em: endoglicanase (EG), celobiohidrolase (CBH) ou exoglicanase, e beta-glicosidase ou celobiase (BGL) [18, 19].

As EGs hidrolisam ligações glicosídicas no interior da cadeia, principalmente nas regiões amorfas, elas atacam de forma randômica, gerando oligossacarídeos de cadeias menores de celotriose e celobiose. As celobiohidrolases hidrolisam ligações glicosídicas nas extremidades redutoras ou não redutoras da cadeia, ou ainda nas extremidades dos oligossacarídeos produzidos pela ação das endoglicanases, formando principalmente, moléculas de celobiose (Figura 1.4). Durante sua atuação, as CBHs possuem maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina. As beta-glicosidases atuam clivando a celobiose liberando glicose [20, 21].

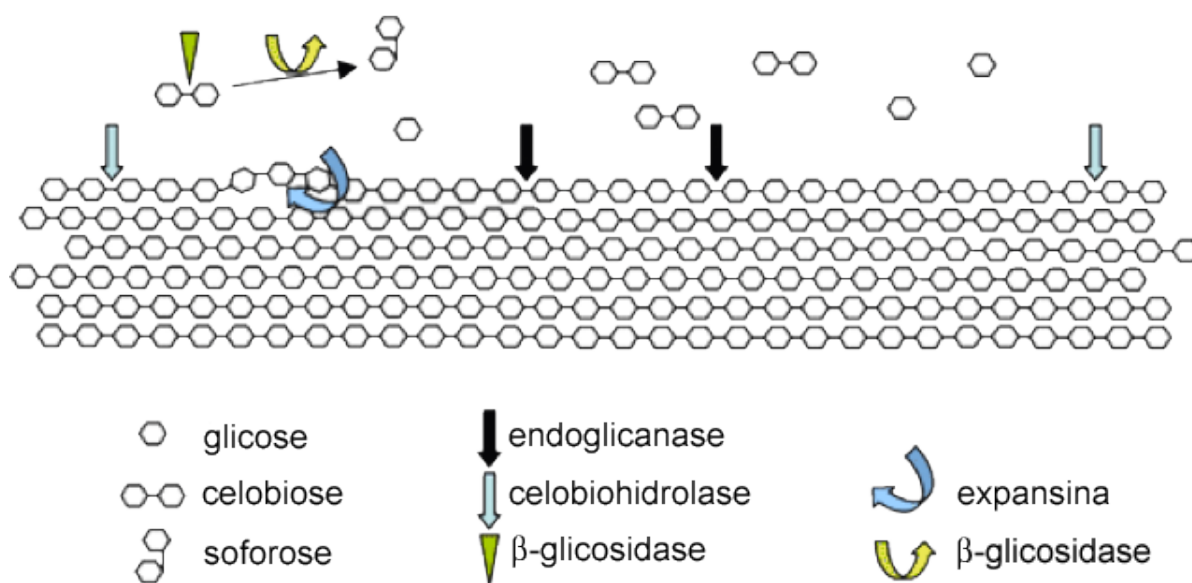


Figura 1.4: Visualização esquemática do sistema celulolítico. (Adaptada de [20])

As CBH's são divididas em dois tipos: as do tipo I clivam a cadeia de celulose a partir da extremidade redutora e as do tipo II pela extremidade não redutora.

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases, porém apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão e papel de

### 1.3 Conversão da biomassa via hidrólise enzimática Fundamentos biológicos

filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exoglicosidas e para medir a atividade do complexo celulolítico total [22].

As endoxilanases são classificadas como glicosil hidrolases e catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, entre os resíduos de xilose cadeia central da xilana [23]. Estas também podem exibir reação cruzada e hidrolisar as ligações  $\beta$ -1,4 de outros polissacarídeos como as da celulose microcristalina [24].

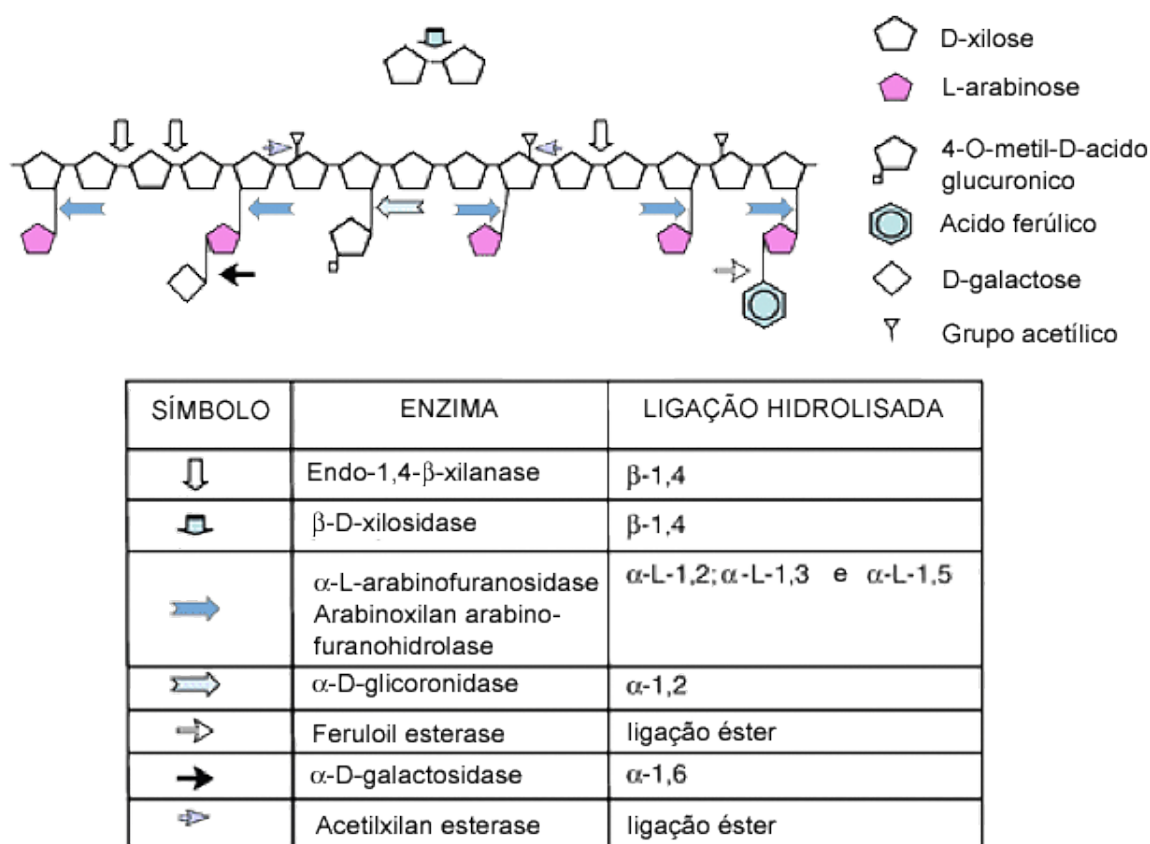


Figura 1.5: Uma visão esquemática de um sistema hemicelulolítico. As enzimas ativas no substrato estão listadas na tabela. (Adaptada de [20])

Devido a grande heterogeneidade e complexidade da xilana, sua completa hidrólise requer uma ampla variedade de enzimas agindo cooperativamente para convertê-la em unidades de xilose, porém as endoxilanases formam o maior grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana(Figura 1.5).

Neste contexto, os estudos de micro-organismos capazes de realizar a degradação da biomassa e o estudo das enzimas envolvidas no processo são de vital importância para viabilizar o uso da biomassa como fonte renovável de energia [25].

## 1.4 Estruturas Tridimensionais

### 1.4.1 Endoxilanases

As endoxilanases são classificadas juntamente com as glicosil-hidrolases em famílias de acordo com a similaridade da estrutura primária do domínio catalítico [26]. Como a estrutura primária é relacionada com a estrutura tridimensional e o mecanismo de ação da enzima, esta classificação reflete características estruturais e funcionais. Atualmente o grupo das glicosil-hidrolases abrange 106 famílias, sendo que as endoxilanases são classificadas nas famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43. Os membros destas famílias diferem em suas propriedades físico-químicas, estruturais, modo de ação e especificidade ao substrato.

Dentre as 106 famílias descritas até o momento, as endoxilanases encontram-se principalmente nas famílias 10 (41%) e 11 (55%) [27, 28], além do enquadramento de endoxilanases também nas famílias 5, 7, 8, e 43 [29]. A estrutura tridimensional de cada uma destas famílias pode ser observada na Figura 1.6.

Em relação às propriedades catalíticas, as endoxilanases da Família 10 têm menor especificidade ao substrato (frequentemente tendo atividade de endoglicanase) e hidrolisam heteroxilanas em uma maior proporção quando comparadas com as da Família 11 [36]. Biely [37] concluiu que as endoxilanases da Família 10, em contraste com as da Família 11, são capazes de atacar as ligações glicosídicas próximas aos pontos de ramificação e da extremidade não-redutora.

As endoxilanases da Família 11, atuam exclusivamente em substratos contendo resíduos de D-xilose. Elas apresentam menor versatilidade catalítica do que as endoxilanases da Família 10 e os produtos de hidrólise liberados pela ação desta classe de enzimas contém fragmentos de xilo-oligossacarídeos maiores, os quais podem ser hidrolisados por beta-xilosidases da Família 10 [38, 39].

A estrutura tridimensional de algumas endoxilanases fúngicas da Família 11 foram reportadas, como as de *Trichoderma harzianum* [34, 40, 41]. A estrutura tridimensional dessas enzimas consiste de um domínio único de folhas  $\beta$  antiparalelas organizadas de uma forma regular e uma única  $\alpha$ -hélice. A estrutura dessas enzimas se assemelha a uma mão semi-aberta onde as folhas  $\beta$ -11 e  $\beta$ -12 se encontram organizadas formando o “polegar” e a folha  $\beta$ -3 encontra-se perpendicular a estas, formando a “palma” da mão. O sítio de

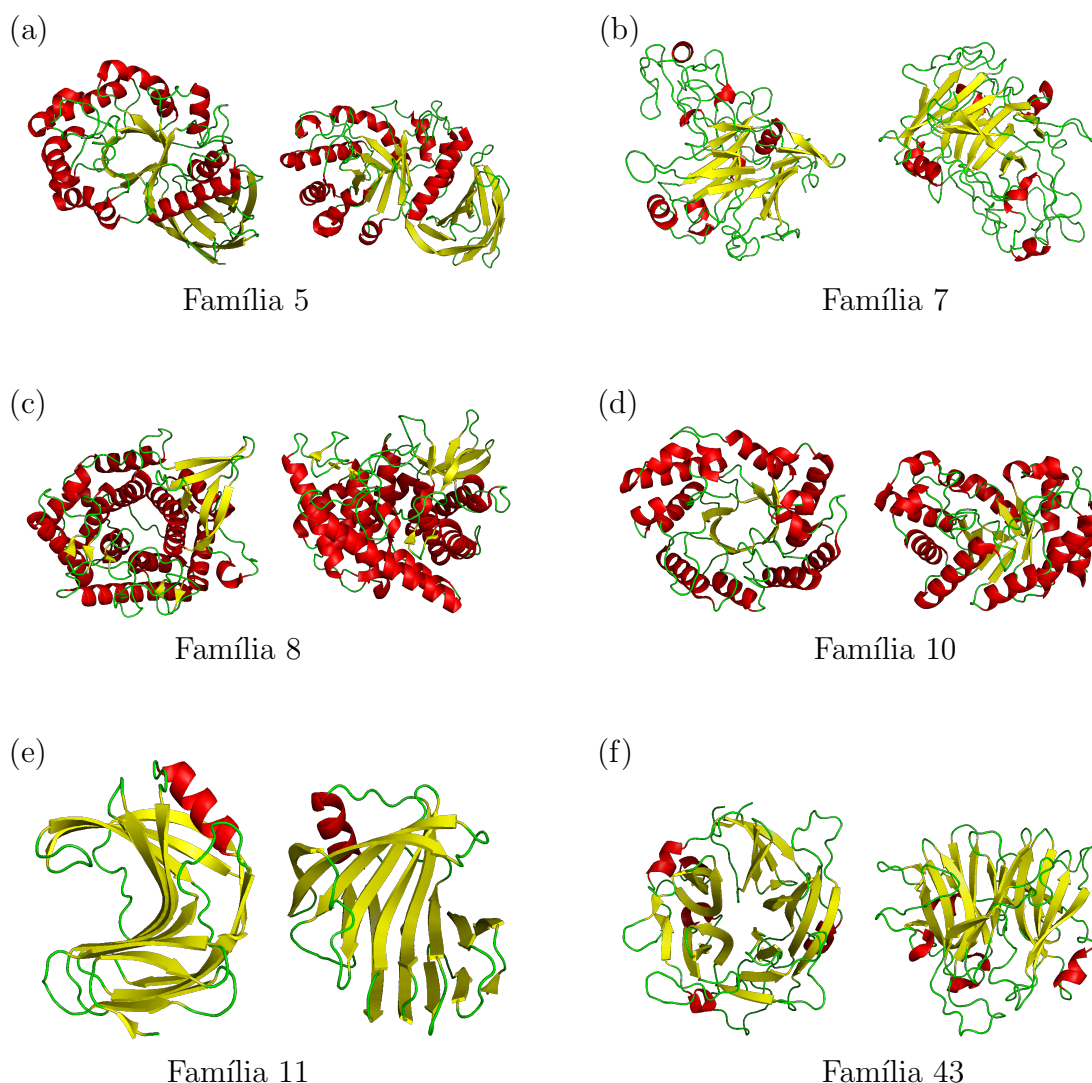


Figura 1.6: Estrutura representativa das famílias de glicosídeo hidrolases [29] (a) Estrutura de uma enzima da família 5, XynA, de *Erwinia chrysanthemi* (Código PDB 1NOF) [30]; (b) Estrutura da família 7, *Trichoderma reesei* (código PDB 1EG1) [31]; (c) Estrutura da família 8, pXyl, *Pseudoalteromonas haloplanktis* (código PDB 1H12) [32]; (d) Estrutura da família 10, *Streptomyces lividans* (código PDB 1XAS) [33]; (e) Estrutura da família 11, endoxilanase de *T. reesei* (código PDB 1EXN) [34]; (f) Estrutura da família 43,  $\alpha$ -L-arabinase de *Cellvibrio japonicus* (código PDB 1GYH) [35].

ligação ao substrato se situa na cavidade formada entre o “polegar” e a “palma”. A única estrutura do tipo hélice ( $\alpha$ -hélice) se localiza na parte superior da “palma” no lado oposto a cavidade do sítio catalítico [42, 43].

Os resíduos de aminoácidos conservados entre as endoxilanases da Família 11 incluem os dois resíduos catalíticos de ácido glutâmico descritos por Wakarchuk e colaboradores [44] e localizados em lados opostos da cavidade da “palma”. Foi descrito também um conjunto conservado de resíduos aromáticos (triptofano e tirosina) que se situam dentro da cavidade e que estão envolvidos na ligação ao substrato [42, 43]. O sítio catalítico

acomoda uma cadeia de cinco a sete unidades de xilopiranosose. Vardakou e colaboradores [45] descreveram uma endoxilanase de *Neocallimastix patriciarum* pertencente a Família 11 que contém um único domínio composto de 14 folhas  $\beta$  antiparalelas formando uma estrutura côncava, uma  $\alpha$ -hélice unindo as folhas  $\beta$ -13 e  $\beta$ -14 e três  $\alpha$ -hélices entre  $\beta$ -6 e  $\beta$ -7 (Figura 1.7). No centro do sítio ativo estão dois resíduos catalíticos, Glu 113 (nucleófilo) e Glu 201 (ácido-base), localizados nas fitas  $\beta$ -9 e  $\beta$ -14, respectivamente.

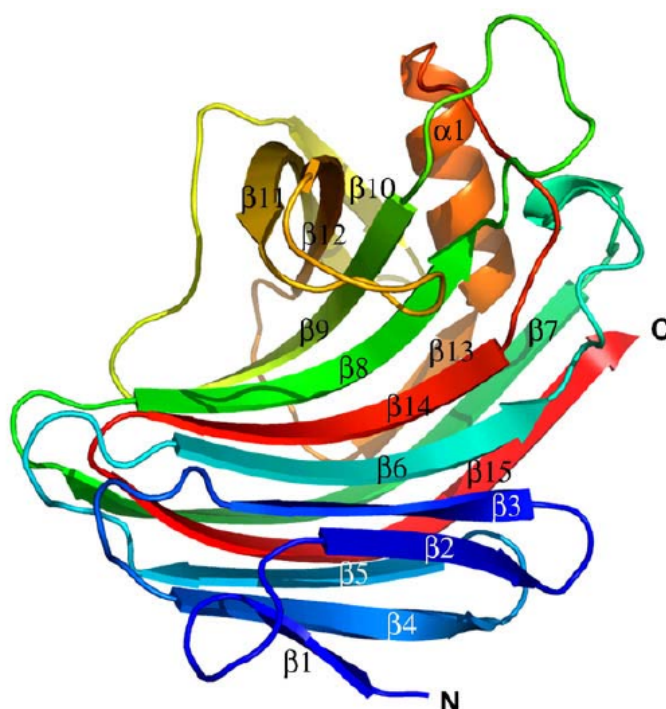


Figura 1.7: Estrutura tridimensional da endoxilanase *NpXyn11A*, de *N. patriciarum*. O N-terminal da proteína é representado em azul e o C-terminal em vermelho [45].

### 1.4.2 Celobiohidrolases

Estruturalmente, celobiohidrolases (CBHs), em geral, possuem dois domínios funcionalmente distintos: um domínio de ligação a celulose (CBD) e um domínio com atividade catalítica, sendo os domínios conectados por uma região flexível [18, 19, 13] como mostrado na Figura 1.8.

Embora os domínios de ligação a celulose não sejam essenciais para a atividade catalítica, eles modulam a ligação específica das enzimas em substratos celulolíticos solúveis e insolúveis. O CBD se liga na celulose cristalina enfraquecendo as ligações de hidrogênio entre as microfibrilas, ajudando na separação das mesmas e na progressão da enzima.

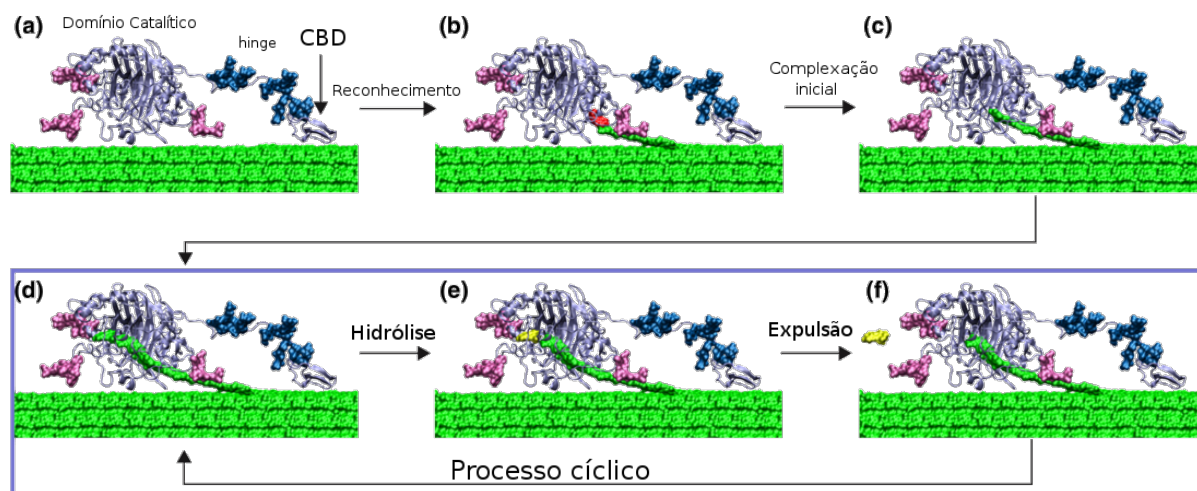


Figura 1.8: Imagem esquemática dos domínios catalíticos das CBH's I e II conectado *hinge* flexível (adaptada de [13]).

As enzimas que possuem o CBD apresentam maior afinidade por substratos insolúveis, principalmente celulose cristalina, mas em substratos solúveis a falta do CBD não afeta a atividade enzimática [46, 47].

No caso da estrutura tridimensional das CBHs I, o domínio catalítico já foi elucidado para CBHs de diferentes fungos como *Trichoderma reesei*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Talaromyces emersonii*, e foi possível verificar que existe similaridade na estrutura deste domínio [48]. A estrutura do domínio catalítico da CBH I de *T. reesei*, da CBH IB de *T. emersonii* e da CBH (CEL7D) de *P. chrysosporium*, consiste de duas folhas beta (folhas  $\beta$ ) antiparalelas dispostas frente a frente formando uma estrutura do tipo  $\beta$ -sanduíche, quatro  $\alpha$ -hélices e longas alças conectando as fitas  $\beta$  [49, 48, 50]. As duas folhas  $\beta$  formam uma superfície côncava e outra convexa, que contêm sete e oito fitas  $\beta$  antiparalelas, respectivamente (Figura 1.9). As alças que conectam as fitas  $\beta$  formam um túnel de aproximadamente 50 Å, que representa o sítio ativo, onde o substrato da celulase é acomodado. A presença dessas alças na estrutura das CBHs é a principal diferença entre a estrutura do sítio ativo das CBHs e endoglicanases (EGs), que possuem o sítio ativo em forma de fenda [49, 48] (Figura 1.10).

Apesar da alta similaridade entre os domínios catalíticos das CBHs do tipo I, existem diferenças quanto a estrutura geral dessas enzimas. A celobiohidrolase Cel7A de *T. reesei* apresenta o domínio catalítico e o CBD [49], enquanto que a CBH IB de *T. emersonii* apresenta somente o domínio catalítico [48]. A enzima CBH IB de *T. emersonii* também apresenta o sítio ativo na forma de túnel porém com uma abertura maior que

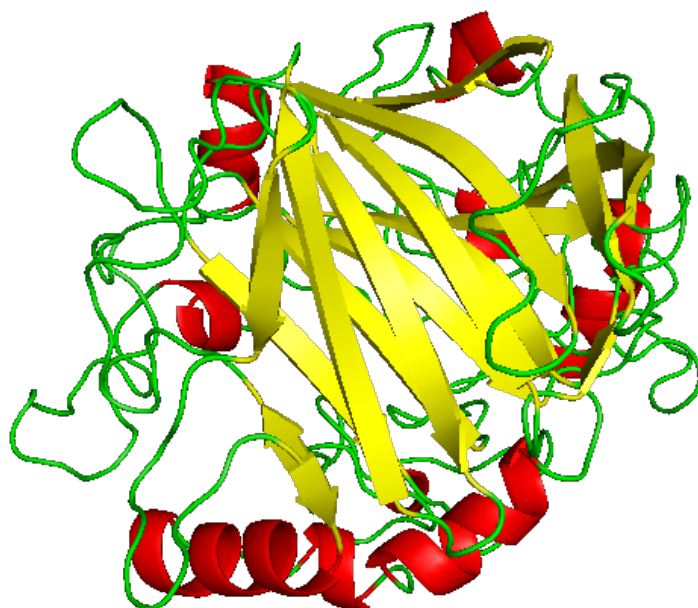


Figura 1.9: Estrutura tridimensional do domínio catalítico da CBH I do fungo *T. reesei* [49]. Visualização das duas folhas  $\beta$  antiparalelas, quatro  $\alpha$ -hélices e alças conectando as fitas  $\beta$ . As folhas  $\beta$  formam uma superfície côncava e outra convexa, e as alças que conectam as fitas  $\beta$  formam um túnel característico das celobiohidrolases I (código PDB 1CEL).

da Cel7A de *T. reesei*, o que tem sugerido que esta estrutura do sítio ativo seja uma adaptação para permitir que cadeias de oligossacarídeos menores tenham mais acesso ao sítio ativo [48].

A estrutura do domínio catalítico das CBHs I apresenta diferenças quando comparada a do domínio das celobiohidrolases II já determinadas [49]. A estrutura do domínio catalítico da CBH II de *T. reesei* consiste de um domínio único, em que sete fitas  $\beta$  estão arranjadas em estrutura de barril e as seis primeiras fitas são conectadas por  $\alpha$ -hélices, sendo que a conexão entre a sexta e a sétima fita é irregular. A estrutura de barril juntamente com as alças formam um túnel fechado de aproximadamente 20 Å, duas vezes mais curto que o túnel da CBH I [18].

## 1.5 O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*

Existe uma grande variedade de microrganismos envolvidos na produção de celulasas e endoxilanasas tais como fungos e bactérias aeróbias e anaeróbias [52, 53].

Fungos do gênero *Humicola* se destacam na produção de celulasas e endoxilana-

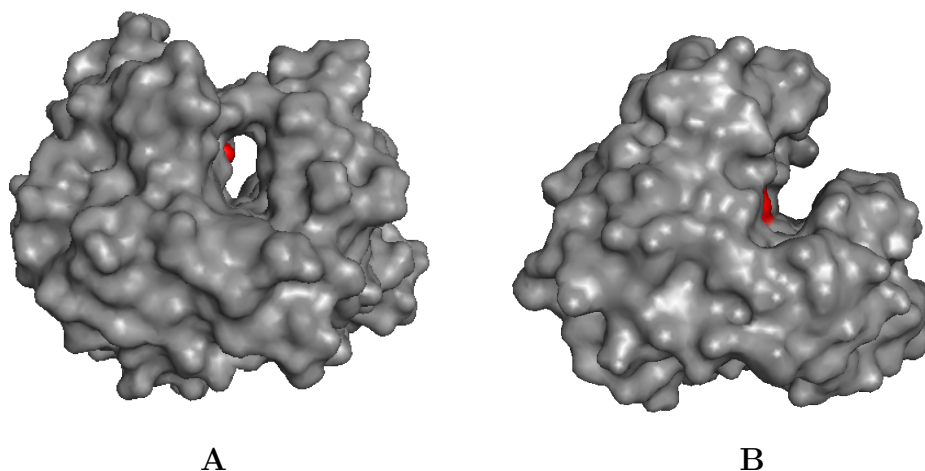


Figura 1.10: Representação do sítio ativo de uma celobiohidrolase e de uma endoglicanase [51] **A.** Sítio ativo em forma de túnel de uma celobiohidrolase (código PDB 1BVW). **B.** Sítio ativo em forma de fenda de uma endoglicanase (código PDB 1TML).

ses capazes de degradar substratos lignocelulolíticos. A maioria dos trabalhos descritos inicialmente sobre o gênero *Humicola* trata da capacidade de degradação da celulose e hemicelulose apresentada por algumas de suas espécies como *H. grisea* [54, 55, 56].

Em 1982, Chaves [57] isolou uma linhagem de fungo celulolítico que produzia celulases em altas temperaturas, que foi classificado como *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Este fungo, isolado de compostagem do solo brasileiro, apresenta crescimento ótimo entre 40 e 42 °C e produção significativa de enzimas lignocelulíticas ativas a temperaturas entre 20 e 50 °C, além de ser um fungo aeróbico.

Várias análises já foram realizadas com o gênero *H. grisea*, dentre as quais: estudo da indução da produção de celulases por substratos lignocelulíticos [58], purificação e caracterização bioquímica das enzimas secretadas [59], caracterização dos genes que codificam as enzimas celulolíticas [60, 61] e expressão heteróloga dos genes que codificam as enzimas [61, 62, 63, 64]. Mas, até o momento, não há relato na literatura científica estudos estruturais de enzimas chave do fungo *H. grisea* var. *thermoidea*.

## 1.6 Sistema celulolítico do fungo *H. grisea*

Em trabalhos desenvolvidos por De Paula [58, 65] e colaboradores foi demonstrado que quando o fungo *H. grisea* é cultivado na presença de glicose ocorre a repressão da produção de celulases, entretanto, quando o mesmo é cultivado em substratos lignocelulíticos

lulósicos a produção de celulases é altamente estimulada.

Em trabalho realizado por Azevedo e colaboradores [66] foi identificado dois genes de celobiohidrolases do fungo *H. grisea*, o primeiro foi descrito como uma celobiohidrolase *cbh1.1* e posteriormente o segundo gene foi analisado por Poças-Fonseca e colaboradores (1997) e descrito como o segundo gene de celobiohidrolase (*cbh1.2*). O gene *cbh1.1* possui 3,5 kpb e codifica uma celobiohidrolase (CBH1.1) com massa molecular de 55 kDa, sendo constituída de um domínio catalítico e um domínio de ligação a celulose (CBD), e apresenta 60% de identidade com um gene de celulase de *T. reesei*. O gene *cbh1.2* possui 5,0 kpb e codifica uma celobiohidrolase (CBH1.2) com massa molecular de aproximadamente 47 kDa e é constituída apenas pelo domínio catalítico.

Quando o fungo *H. grisea* é cultivado em bagaço de cana-de-açúcar e BMS (Ball-Milled Straw – Palha de cereal moída) ocorre a secreção de um complexo de enzimas hidrolíticas, e entre estas enzimas foi identificada uma proteína de aproximadamente 47 kDa, 451 resíduos de aminoácidos e pI de 5,27, que representa a principal proteína secretada pelo fungo sob o cultivo em substratos lignocelulósicos [58]. Análises da sequência de aminoácidos demonstram que esta proteína corresponde ao produto do gene *cbh1.2*, sendo então chamada de CBH1.2 (EC 3.2.1.91). A proteína CBH1.2 predita apresenta alto grau de identidade sequencial (aminoácidos) com celobiohidrolases fúngicas da família 7 das glicosil hidrolases.

A CBH1.2 do fungo *Hemicocola grisea* var. *thermoidea* apresenta atividade contra papel de filtro, carboximetil celulose(CMC) e celulose microcristalina (Avicel), demonstrando tratar-se de uma celulase bifuncional que atua como endoglicanase e celobiohidrolase já que a mesma atua contra substratos solúveis (CMC) e insolúveis (Avicel).

O cDNA correspondente ao gene *cbh1.2* (cDNA/*cbh1.2*) do fungo *H. grisea*, contendo o seu próprio peptídeo de sinal, foi expresso na levedura *P. pastoris*, utilizando o vetor de expressão pHIL-D2 da Life technologies [67].

## 1.7 Sistema xilanolítico do fungo *H. grisea*

A maioria das endoxilanases comerciais são enzimas mesofílicas produzidas pelos fungos filamentosos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*. Este processo reflete bem o

fato de que fungos filamentosos são excelentes secretores de proteínas e podem produzir enzimas em altas quantidades para aplicações industriais. Entretanto, endoxilanasas fúngicas podem não ser eficientes em condições nas quais altas temperaturas sejam necessárias. Consequentemente, enzimas de microrganismos termofílicos têm se destacado devido ao seu emprego em diferentes setores industriais.

Nos estudos realizados por Faria e Moraes e colaboradores [68, 61] foi descrito que o fungo *H. grisea* produziu um complexo enzimático com atividade xilanolítica quando crescido em vários substratos como: BCA (Bagaço de cana de açúcar), farelo de cereal BMS, sabugo de milho, farelo de trigo além de substratos menos complexos como a xilana “oat-spelt” (Sigma®) e xilana “birch-wood” (Sigma ®). Quando o fungo foi cultivado em BMS e BCA foram detectadas três bandas de atividade xilanolítica por ensaio de zimograma, correspondendo a proteínas com massa molecular aproximada de 23, 25 e 35 kDa.

Em trabalho realizado por Faria [68] foi clonado e caracterizado um dos genes de endoxilanasase do fungo *H. grisea*, o gene Hxyn2. A sequência de resíduos de aminoácidos deduzida da proteína HXYN2 apresentou alta identidade com endoxilanasas fúngicas da Família 11 como XYN1 do *H. insolens* (97,8%) [69] e XYL1 do *C. carbonun* (63,5%) [70]. A predição da sequência de aminoácidos de HXYN2 descreve uma proteína com 227 resíduos de aminoácidos, massa molecular estimada de 23 kDa e pI 8,0 [61]. Com objetivo de produzir, purificar e caracterizar a endoxilanasase HXYN2, o gene Hxyn2 foi expresso na levedura *P. pastoris*. Para a expressão heteróloga o cDNA correspondente ao gene (cDNA-xyn2) foi clonado no vetor de expressão pHILD2 (pHILD2-xyn2) e a enzima HXYN2 recombinante foi secretada como uma endoxilanasase ativa de 23 kDa [71].

## 1.8 Expressão heteróloga em *Pichia pastoris*

Um dos organismos eucariotos amplamente utilizados para a expressão de proteínas heterólogas é a levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. A mesma possui propriedades favoráveis como: altos níveis de expressão sob o controle do promotor derivado do gene AOX1 que permite a transcrição dos produtos gênicos a ele fusionados sob a regulação de metanol e integração do cassete de expressão no genoma da levedura de forma estável

[72].

Além disso, a levedura também possui padrão de glicosilação compatível com células eucarióticas, integração de várias cópias do gene heterólogo no cromossomo, secreção de altos níveis de proteínas heterólogas, alta taxa de crescimento e facilidade de aumento de escala na produção [73, 74, 75, 76, 77].

Por ser um microrganismo eucarioto, este modelo de expressão faz com que proteínas que necessitem de modificações pós-traducionais possam ser sintetizadas conservando sua estrutura, possibilitando a utilização destas proteínas recombinantes em vários segmentos [78]. Essas modificações podem ser, por exemplo, formação de pontes de dissulfeto, dobramento correto da proteína recombinante, e glicosilação [72, 79].

Devido a esses fatores citados acima, *P. pastoris* tornou-se uma hospedeira de uso industrial, e vários genes foram clonados e expressos utilizando este microrganismo [80]. Baseado em pesquisas do banco de dados PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), a utilização de *P. pastoris* para a expressão de proteínas heterólogas aumentou de 4% a 17% do total de 1995-2009 [81].

### 1.8.1 Clonagem em *Pichia pastoris*

Uma das características importantes comuns a todos os vetores de expressão em *P. pastoris*, é que a expressão do gene que codifica a enzima recombinante esta sob o controle do promotor do gene da enzima álcool oxidase (AOX). A expressão da AOX é induzida na presença de metanol e reprimida na presença de glicose ou glicerol. A enzima AOX é codificada por dois genes distintos: AOX1 e AOX2 [82]. Em células expostas ao metanol como única fonte de carbono, o início da transcrição a partir do promotor de AOX1 é altamente eficiente [83] e comparável aos promotores dos genes expressos da via glicolítica. O promotor de AOX1 é controlado pela fonte de carbono adicionada ao meio de cultura. A indução da produção de proteínas heterólogas pela *P. pastoris* é facilmente obtida em todas as escalas, desde frascos até fermentadores [84].

A integração do vetor de expressão no genoma da levedura *P. pastoris* pode ocorrer via recombinação homóloga quando o vetor de expressão contém regiões que são homólogas no genoma de *P. pastoris* e, portanto, a integração pode ocorrer através da inserção do gene ou substituição (Figura 1.11 A, B e C). A integração pela inserção do

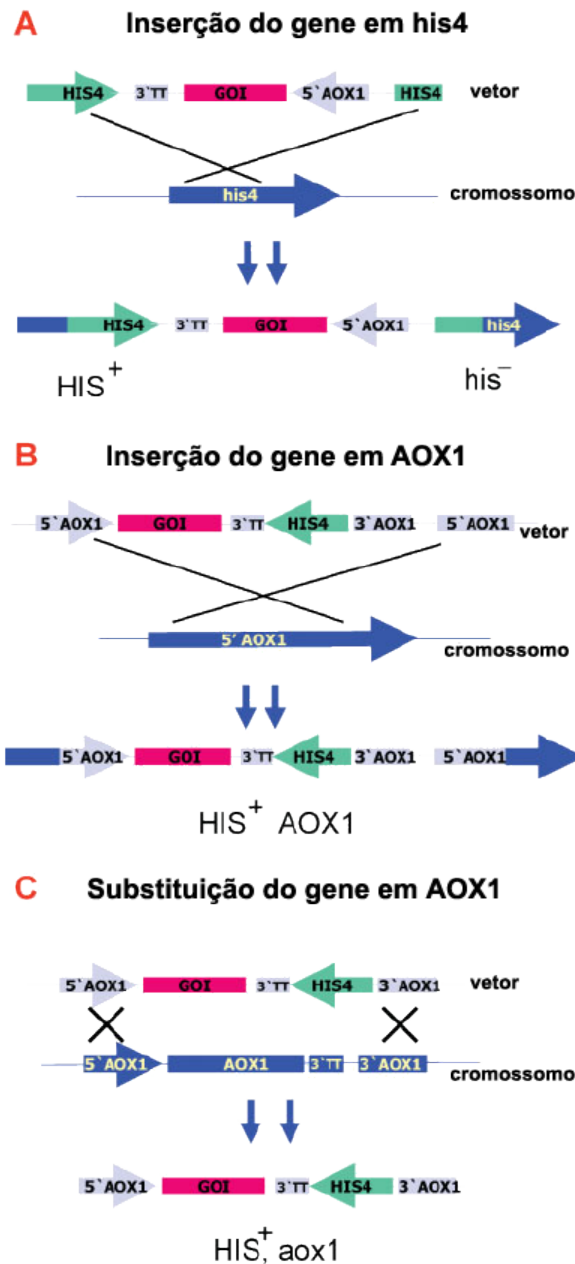


Figura 1.11: Integração no genoma de *P. pastoris*, por inserção (A e B) e por substituição do gene (C). A figura apresenta como exemplo o gene de interesse. (Adaptado de [79]).

gene pode resultar em vários eventos de integração de múltiplas cópias a uma taxa de 1-10% dos transformantes [85]. As integrações que ocorrem pela substituição do gene alvo, geralmente resultam em transformantes de cópia única que são, geralmente, mais estáveis geneticamente [77, 85].

O primeiro passo quando se objetiva produzir uma proteína recombinante, é considerar se a proteína será intracelular ou extracelular. A levedura *P. pastoris* tem sido usada tanto para a obtenção de proteínas recombinantes intracelulares quanto para

Tabela 1.2: Exemplos de proteínas de fungos expressas em *P. pastoris*.

Fungo	Proteína	Níveis de expressão	Formas de expressão
<i>Aspergillus awamori</i>	glucoamilase	400 mg/l	Secretada
<i>Aspergillus fumigatus</i>	catalase	2,3 g/l	Secretada
<i>Aspergillus fumigatus</i>	dipeptidil peptidase V	0,15 mg/l	Secretada
<i>Aspergillus niger</i>	fitase ( <i>phyA</i> )	65 U/ml	Secretada
<i>Candida guilliermondii</i>	xilose redutase ( <i>xyII</i> )	0,65 U/mg	Intracelular
<i>Candida guilliermondii</i>	xilose redutase ( <i>xyII</i> )	0,18 U/mg	Secretada
<i>Candida rugosa</i>	lipase 1 (CRL)	150 U/ml	Secretada
<i>Fusarium solani</i>	Pectato liase ( <i>pelC</i> )	1 mg/l	Secretada
<i>Rhizopus oryzae</i>	lipase	60 mg/l	Secretada
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	invertase	2,5 g/l	Secretada
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\alpha$ -1,2-mannosiltransferase	40 mg/l	Secretada
<i>Trichoderma harzianum</i>	L-(1-6)-glucanase	9,3 mg/l	Secretada
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	Tiorredoxina	0,9 g/l	Secretada
<i>Hansenula fabianii</i>	fitase	23 g/l	Secretada
<i>Paecilomyces thermophila</i>	$\beta$ -1,3-1,4-glucanase	9,1 g/l	Secretada

proteínas secretadas (Tabela 1.2). Essa escolha depende da proteína a ser expressa. Se, por exemplo, a proteína alvo não é secretada no seu sistema nativo, então induzir a proteína a passar pela via de secreção pode resultar na alteração desta por glicosilação e/ou a falta de outras modificações pós-traducionais que podem ser essenciais.

### 1.8.2 Vetores de Expressão

Existem muitos vetores comercialmente disponíveis que podem ser usados para a expressão de genes heterólogos em *P. pastoris*. Os vetores geralmente são do tipo integrativo. Vetores de expressão para *P. pastoris*, como pHIL-D2 e pPIC9, contêm o gene funcional histidina desidrogenase (HIS4), que é usado como um marcador de seleção auxotrófica dos transformantes.

A levedura *P. pastoris* secreta poucas proteínas endógenas, fazendo com que a purificação da proteína recombinante a partir do sobrenadante de cultura se torne uma tarefa relativamente simples.

### 1.8.3 Linhagens de *Pichia pastoris*

Um dos problemas do sistemas de expressão em *P. pastoris* é a proteólise das proteínas de interesse. Entretanto, algumas soluções para esse problema têm sido relatadas, por exemplo, a utilização de linhagens deficientes em proteases [76].

As células da linhagem GS115 de *P. pastoris* são deficientes na síntese de histidina pois o gene que codifica a enzima histidina desidrogenase (HIS4) é mutado e as células transformadas são selecionadas pela capacidade de crescer em meio de cultura sem histidina.

As células da linhagem SMD1168 de *P. pastoris*, também são deficientes na síntese de histidina (HIS4). Além disso, estas são deficientes na síntese da enzima vacúolo peptidase A (pep4) que é responsável pela ativação da carboxipeptidase Y e protease B1 e, portanto, a SMD1168 é deficiente na síntese destas proteases [86].

### 1.8.4 Produção de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris* em frasco

A levedura *P. pastoris* é capaz de secretar altos níveis da proteína recombinante, o produto secretado pode compreender mais de 40% da proteína total no meio de cultura. A correta secreção da proteína heteróloga depende de fatores, tais como o reconhecimento da sequência do peptídeo sinal, do correto processamento pós-traducional e a minimização da ação de proteases extracelulares da levedura [87]. A produção de proteínas heterólogas pela *P. pastoris* depende de fatores como: densidade celular inicial, concentração de metanol, concentração de fonte de nitrogênio no meio, taxa de oxigênio dissolvido e pH do meio de cultura.

A produção das enzimas recombinantes CBH1.2 e HXYN2 pela levedura *P. pastoris* em frasco foi otimizada utilizando o meio de cultura BMMY-U (seção 5.1.6.9) por Carvalho e colaboradores [88] e por Oliveira e colaboradores [67].

Para a produção da enzima CBH1.2r utilizou-se a densidade celular inicial de 10, meio contendo 1% de metanol e 2,34% de fonte de nitrogênio, produção por 96 h de cultivo [67].

Para a produção da enzima HXYN2r, empregou-se densidade celular inicial de

20, meios de cultura contendo 1% de metanol e 2,34% de fonte de nitrogênio, cultivo por 96 h [88].

# Capítulo 2

## Fundamentos cristalográficos

### 2.1 Produção (*In House*) de raios X

Os raios X são produzidos após a desaceleração rápida de elétrons que contenham energia cinética suficiente. A radiação é produzida num tubo de raios X (Figura 2.1) contendo uma fonte de elétrons e dois eletrodos de metal. A alta voltagem, mantida entre os eletrodos, cria um campo elétrico de grande magnitude, que acelera os elétrons a uma velocidade muito alta. [89]

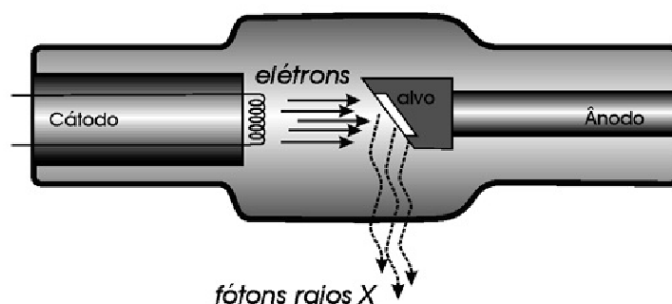


Figura 2.1: Representação de um tubo de raios X.

Quando esses elétrons atingem o alvo, elétrons ligados às camadas internas dos átomos do alvo são arrancados e liberados na forma de fotoelétrons, fazendo com que haja uma vacância nessas camadas dos átomos. Para ocupar os níveis de energia vagos deixado por esse elétron, outro elétron de uma camada mais externa passa a camada em questão, liberando energia na forma de um fóton de raio X (Figura 2.2). A energia desse fóton corresponde a diferença de energia entre as duas camadas. Os raios X são produzidos no ponto de impacto e irradiados em todas as direções. Sendo  $e$  a carga do elétron ( $1,6 \cdot 10^{-19}$

C) e  $V$  a voltagem entre os eletrodos, a energia cinética é dada pela equação:

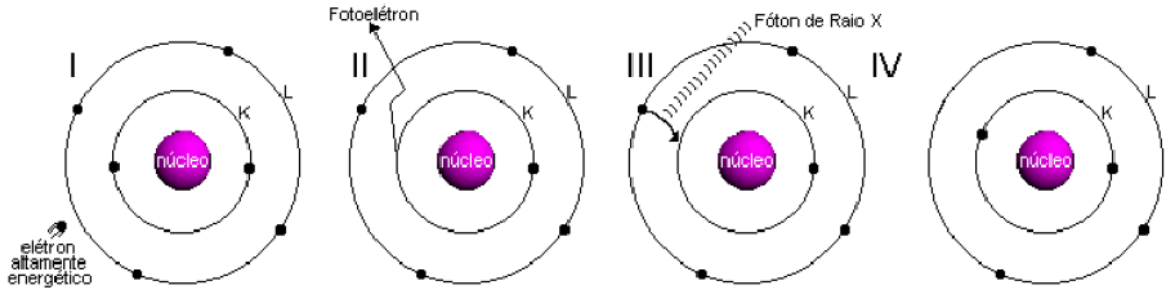


Figura 2.2: Representação esquemática da produção de raios X.

$$K = eV = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2.1)$$

onde  $m$  é a massa do elétron ( $9,11 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$ ) e  $v$  é sua velocidade, no momento do impacto. Para um tubo com uma voltagem de 30 kV, por exemplo, esta velocidade é cerca de um terço da velocidade da luz. Logo, sua energia cinética ( $K$ ) será:

$$K = eV = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2}(9,11 \cdot 10^{-31} \text{ kg}) \cdot \left(\frac{3 \cdot 10^8 \text{ m/s}}{3}\right)^2 \approx 4,6 \cdot 10^{-15} \text{ J} \approx 29000 \text{ eV} \quad (2.2)$$

A maior parte da energia cinética dos elétrons que se chocaram com o alvo é convertida em calor e somente cerca de 1% é transformada em raios X. Os raios X produzidos pelo alvo possuem uma mistura de diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ).

Nem todo elétron é desacelerado da mesma forma, alguns são parados em um impacto, perdendo toda sua energia de uma vez, outros são desviados deste caminho pelos átomos do alvo, perdendo sucessivamente frações de sua energia cinética total. Os elétrons que são parados em um impacto dão origem a fótons de energia máxima, isto é, a raios X de comprimento de onda mínimo (já que a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda). Por meio do comprimento de onda, podemos encontrar qual a frequência ( $\nu$ ) dos raios X, uma vez que a frequência da onda é definida como sendo:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (2.3)$$

A partir da frequência da onda, pode-se encontrar o valor da energia transportada por esta onda, considerando o postulado de Planck de que átomos oscilando em uma

frequência  $\nu$ , só podem absorver ou emitir energia em valores de múltiplos inteiros de um “quantum” de energia, ou seja, utilizando a equação:

$$E = h\nu \quad (2.4)$$

onde  $h$  é a constante de Planck, com valor igual a  $6,63 \cdot 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg/s}$ .

Logo para os raios X (que possuem comprimento de onda da ordem de  $10^{-10} \text{ m}$ , tem-se:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} = (6,63 \cdot 10^{-34}) \cdot \frac{3 \cdot 10^8}{10^{-10}} \approx 2 \cdot 10^{-15} \text{ J} \approx 12400 \text{ eV} \quad (2.5)$$

Tais elétrons, possuem energia cinética  $K=eV$ , e transferem-na em sua totalidade para o fóton, assim pode-se escrever:

$$\lambda_{min} = \frac{hc}{eV} = \frac{hc}{e} \cdot \frac{1}{V} = \frac{6,63 \cdot 10^{-34} \cdot 3 \cdot 10^8}{1,6 \cdot 10^{-19}} \cdot 10^{10} \cdot \frac{1}{V} \approx \frac{12400}{V} \text{ \AA}$$

Esta equação nos dá o  $\lambda_{min}$  (limite mínimo de comprimento de onda), em ângstroms, em função da voltagem  $V$  aplicada. Se compararmos com o valor calculado anteriormente para o tubo submetido a 30 kV, teremos:

$$\lambda_{min} \approx \frac{12,4 \cdot 10^6}{30000} \approx 0,4 \text{ \AA}$$

Substituindo esse comprimento de onda na equação (2.5) tem-se:

$$E = h \frac{c}{\lambda} = 6,63 \cdot 10^{-34} \cdot \frac{3 \cdot 10^8}{0,4 \cdot 10^{-10}} \approx 4,97 \cdot 10^{-15} \text{ J} \approx 31000 \text{ eV} \quad (2.6)$$

Se um elétron não é freado completamente em um choque, sua energia decresce parcialmente, então somente uma fração de sua energia é emitida como radiação e o fóton produzido tem energia menor que  $h\nu_{max}$ . Em termos do movimento da onda, os raios X correspondentes têm uma frequência inferior a  $\nu_{max}$  e o comprimento de onda maior que  $\lambda_{min}$ . A totalidade destes comprimentos de onda, acima de  $\lambda_{min}$ , constituem o espectro contínuo. A Figura 2.3, mostra os tipos de curvas obtidas para um tubo de raios X utilizando um alvo de Molibdênio quando se altera o potencial aplicado  $V$ .

A intensidade é zero abaixo do comprimento de onda mínimo ( $\lambda_{min} = \text{Small Wavelength} = \text{SWL}$ ), aumenta rapidamente para um máximo e então decresce mais lentamente,

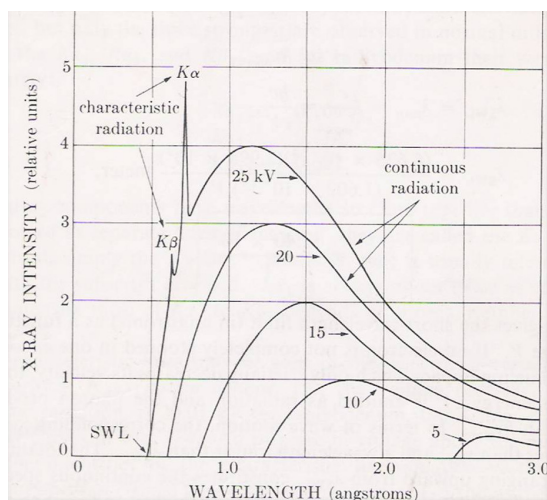


Figura 2.3: Espectro do Molibdênio.

tendendo para zero. Trataremos agora das curvas “lisas” da Figura 2.3, estas correspondem a aplicação de voltagens até 20 kV no caso de um alvo de molibdênio. A radiação representada por essas curvas é chamada de policromática e contínua, ou radiação branca. A radiação branca é também chamada *bremsstrahlung*, que vem do alemão “radiação de frenamento”, por que ela é causada pela desaceleração dos elétrons.

Quando a voltagem no tubo de raios X é aumentada até um certo valor crítico, específico para cada alvo metálico, linhas estreitas de intensidade máxima aparecem em certos comprimentos de onda, superposto no espectro contínuo. Essas linhas são chamadas de linhas características. As linhas mais importantes são as linhas  $K$  (Figura 2.3).

Existem várias linhas  $K$ , entre elas  $K\alpha_1$ ,  $K\alpha_2$ <sup>1</sup> e  $K\beta_1$ , cujos comprimentos de onda são 0,709 Å, 0,713 Å e 0,632 Å respectivamente. As linhas  $K\alpha_1$  são duas vezes mais intensas que as linhas  $K\alpha_2$ , e em média cinco vezes mais intensas que as linhas  $K\beta_1$ . Para o molibdênio, a voltagem crítica é de 20 kV o que explica porque estas linhas não aparecem nas curvas com voltagens menores na Figura 2.3. A partir da voltagem limite, o aumento da mesma, só causa o aumento na intensidade destas linhas.

A intensidade de uma linha característica é dada por:

$$I_{\text{linha}K} = BI(V - V_K)^n \quad (2.7)$$

onde  $B$  é uma constante,  $I$  é a corrente,  $V$  a voltagem aplicada,  $V_K$  a voltagem carac-

<sup>1</sup>A diferença entre as linhas  $K\alpha_1$  e  $K\alpha_2$  vem de fatores devidos ao acoplamento spin-órbita.

terística do material, e  $n$  é uma constante com valor próximo de 1,5 [89].

Basicamente, a diferença entre as linhas  $K\alpha$  e  $K\beta$  existe devido a sua origem, as linhas  $K\alpha$  se referem a radiação emitida pelos elétrons que transicionaram da camada atômica L para a camada K, enquanto que as linhas  $K\beta$  se devem aos elétrons que transicionaram da camada M diretamente para a camada K (Figura 2.4).

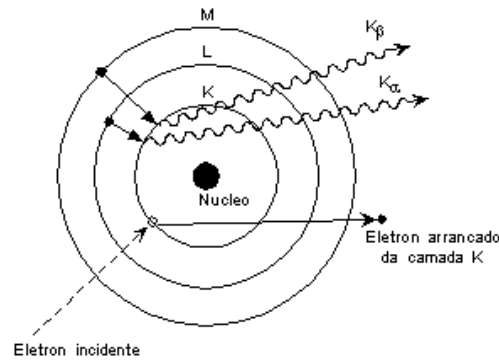


Figura 2.4: Transições atômicas e emissão de raios X.

Quando raios X encontram qualquer tipo de matéria, são em parte absorvidos. Logo, quando um feixe de raios X, tendo intensidade incidente  $I_0$ , atravessa um objeto de espessura  $x$ , a intensidade transmitida será dada por:

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (2.8)$$

onde  $\mu$  é o coeficiente linear de absorção e depende da substância irradiada, sua densidade e do comprimento de onda dos raios X incidentes. Este coeficiente é chamado de linear pelo fato de ser linearmente proporcional a densidade do material ( $\rho$ ), logo a razão  $\mu/\rho$  é uma constante e chamada de coeficiente de absorção de massa [89].

Para garantir que o tubo de raios X contenha apenas os comprimentos de onda das linhas características, filtros são utilizados nas “janelas” de saída dos raios para bloquear os comprimentos de onda indesejados <sup>2</sup>.

<sup>2</sup>Monocromadores possuem uma estrutura mais complexa do que a aqui citada, aqui enfatizamos apenas a sua finalidade

## 2.2 Difração de raios X

Dentre as características dos raios X, estamos mais interessados em sua capacidade de difração. A difração é um fenômeno ondulatório que ocorre quando uma onda passa por um orifício ou contorna um objeto cujas dimensões sejam da mesma ordem de grandeza de seu comprimento de onda. A difração então está relacionada com a interação de uma onda com um obstáculo, ou quando encontra um orifício através do qual possa atravessar o obstáculo. A onda então toma diferentes caminhos (diferentes trajetórias), cujos comprimentos totais podem variar. Da variação dos comprimentos totais atravessados, diversas ondas oriundas da original acabam por se recombinar ao passar por um dado ponto do espaço. Isso pode ser descrito em termos do princípio de Huygens, que afirma que pode-se perceber que cada ponto localizado na frente de onda se comporta como uma nova fonte pontual de emissão de novas ondas esféricas, que ao se somarem formarão uma nova frente de onda e assim sucessivamente (Figura 2.5).

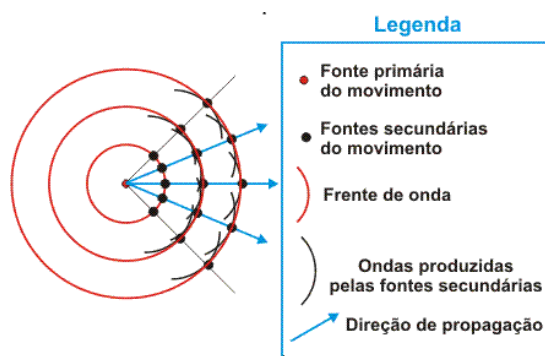


Figura 2.5: Princípio de Huygens.

Ao passarem por esse ponto do espaço, as ondas difratadas de uma mesma origem, tem a mesma fase e por isso podem se superpor umas com as outras naquele ponto. O resultado disso varia entre dois extremos: num caso, num dado ponto, um máximo de amplitude se combina com um mínimo, produzindo uma anulação parcial ou total da amplitude da onda. Por outro lado, quando dois ou mais máximos se encontram, a amplitude observada é maior.

Para a luz visível, pode-se utilizar a chamada rede de difração para “dividir” o feixe de onda incidente em vários outros que irão se superpor entre si. Esta rede é formada por uma superfície reflexiva ou transparente em que se marcam vários sulcos, bem próximos uns dos outros (décimos ou centésimos de milímetro, pois o comprimento

de onda da luz é da ordem de  $5 \cdot 10^{-7} \text{m}$ ).

Neste ponto, é interessante parar e analisar os aspectos ondulatórios e corpusculares dos raios X, tais como:

- velocidade de propagação igual a 300.000 km/s no vácuo;
  - comprimento de onda da ordem de  $10^{-10} \text{ m}$ , ou seja, da ordem de Angstrom;
- (os raios X utilizados em difração tem comprimento de onda entre 0,5 e 2,5 Å).

Por conseguinte os raios X ocupam a região entre os raios gama e os raios ultravioleta no espectro eletromagnético completo.

Para o caso de raios X, esse tipo de interação ocorrerá se utilizarmos uma “rede” que tenha “orifícios” ou obstáculos da ordem de  $10^{-10} \text{ m}$ , que é exatamente a ordem de grandeza da separação entre os átomos. Logo, pode-se utilizar um sólido que seja ordenado o suficiente para agir como uma rede de difração, e é neste ponto que devemos entrar no conceito de cristais.

## 2.3 Cristais

Podemos, numa definição simples e concisa, dizer que cristais são arranjos de uma unidade básica cuja estrutura se repete numa forma periódica tridimensional de longo alcance.



Figura 2.6: Cristal de quartzo.

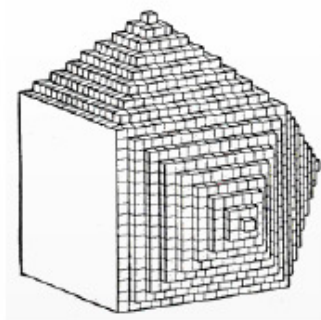
Desde o século XVI, mineralogistas já notavam que ao quebrar um cristal, os pedaços mantinham sempre a mesma forma do cristal inicial. Em 1669, Nicolas Steno demonstrou que os ângulos entre as faces de um dado cristal são sempre constantes,

consequência do ordenamento interno de uma unidade básica. Na Figura 2.6 pode-se notar que o ângulo entre as faces do cristal se mantém constante em seu interior. Esta base, possui toda a informação estrutural do cristal necessária para a construção do cristal. Observe que nessa construção, é necessário descrever como essa base se distribui no espaço. Para isto, utilizamos de operações para descrever o arranjo periódico cristalino.

Em termos de simetria, imagens como as das Figuras 2.7 (A) e (B), possuem características similares a de um cristal, pois apresentam uma periodicidade, neste caso a primeira através de rotações de 180 graus em torno do eixo que passa pelo centro da figura e na segunda através de translações em três dimensões.



(A)



(B)

Figura 2.7: (A) Obra de Maurits C. Escher simbolizando simetria. (B) Construção por translação tridimensional.

Essas operações utilizadas para descrever o arranjo periódico cristalino, recebem o nome de operações de simetria, e elas podem ser:

- Rotação em torno de um eixo, simbolizada pelo número  $n$  definido como sendo<sup>3</sup>:

$$n = \frac{360}{\text{ângulo de rotação}} \quad (2.9)$$

- Inversão, que indica uma inversão da figura em relação a um ponto. Um exemplo de inversão é mostrado na Figura 2.8;

- Reflexão, ou espelho, que é a reflexão da imagem por um plano, exemplo na Figura 2.9.

<sup>3</sup>Note que a operação para  $n=1$ , ou seja com ângulo de rotação igual a 360 graus, existe para todos os cristais e é denominada por identidade.

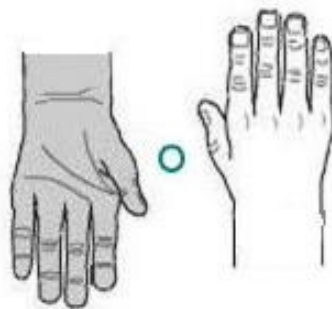


Figura 2.8: Operação de inversão em torno de um ponto.



Figura 2.9: Imagem de um arabesco gerado por reflexão.

Note que as operações do tipo inversão e espelho são operações impróprias, ou seja, operações que trocam a quiralidade<sup>4</sup> do objeto. O conjunto dos elementos de simetria que descrevem um objeto definem o que denominam de Grupos de Ponto (em cristalografia os grupos de ponto são aqueles descritos por simetrias de ponto fixo). Existem apenas 32 grupos de ponto possíveis, estes são mostrados na Tabela 2.1<sup>5</sup>.

Pode-se construir também os chamados Grupos de Espaço, que são gerados a partir da combinação dos elementos de simetria de ponto fixo com simetrias translacionais.

Essas combinações de operações de simetria, também geram operações de simetria como o eixo helicoidal ou planos de deslizamento. Chamamos de eixo helicoidal a combinação de uma rotação e uma translação este também é chamado comumente de parafuso ou roto translação (ou pelo seu nome em inglês *screw axis*). A combinação entre uma reflexão e uma translação é chamada de plano deslizante ou plano de deslizamento (ou *glide plane*).

<sup>4</sup>A quiralidade é uma propriedade de assimetria importante em vários ramos da ciência. Um objeto ou um sistema é quiral se não pode ser sobreposto à sua imagem especular. Um objeto quiral e a sua imagem especular são designados enantiomorfos ou, quando referindo-se a moléculas, enantiômeros.

<sup>5</sup>Há materiais que desenvolvem polarização mesmo na ausência de campos, tais materiais são designados por polares, sendo esta propriedade determinada exclusivamente pela estrutura cristalina. Apenas 10 das 32 classes de cristais exibem comportamento polar (marcados com \* na Tabela 2.1), esse grupo coincide com aquelas classes que não têm centro de simetria.

Tabela 2.1: Os 32 grupos de ponto.

Sistema cristalino	Centrossimétrico	Não-centrossimétrico Não-enantimorfo	Não-centrossimétrico Enantimorfo
Triclínico	$\bar{1}$	—	1*
Monoclínico	2/m	$\bar{2} = m^*$	2*
Ortorrômico	2/m 2/m 2/m (mmm)	mm2*	222
Tetragonal	4/m 2/m 2/m (4/mmm) 4/m	4mm*, 4m2 $\bar{4}$	422 4*
Trigonal	$\bar{3}2/m$ ( $\bar{3}m$ ) $\bar{3}$	3m* —	32 = 322 3*
Hexagonal	6/m 2/m 2/m (6/mmm) 6/m	6mm*, $\bar{6}2m$ $\bar{6}=3/m$	622 6*
Cúbico	2/m $\bar{3}$ ( $m\bar{3}$ ) 4/m $\bar{3}$ 2/m ( $m\bar{3}m$ )	— $\bar{4}3m$	23 = 322 432

Tabela 2.2: Elementos de simetria (nomenclatura de Hermann-Mauguin).

Elementos de Simetria	Símbolos Hermann-Mauguin
Eixo de simetria de rotação	1, 2, 3, 4 ou 6.
Eixo de simetria de inversão rotatória	$\bar{1}, \bar{2}, \bar{3}, \bar{4}, \bar{6}$
Plano de simetria ou plano de reflexão	$m$
Eixo de roto translação	$2_1, 3_1, 3_2, 4_1, 4_2, 4_3, 6_1, 6_2, 6_3, 6_4, 6_5$
Plano de deslizamento	$a, b, c, n, d$

As operações com elementos de simetria de roto translação possíveis são  $2_1, 3_1, 3_2, 4_1, 4_2, 4_3, 6_1, 6_2, 6_3, 6_4,$  e  $6_5$  onde o primeiro número está relacionado ao ângulo de rotação e o número subscrito com a fração do parâmetro de rede na direção a qual será efetuada a translação.

Já as operações de planos de deslizamento ocorrem paralelamente aos eixos que definem o cristal tendo como símbolos  $a, b, c,$  ou  $n,$  quando ocorrem paralelos a quaisquer das diagonais do cristal.

Usualmente, em cristalografia utiliza-se a nomenclatura de Hermann-Mauguin para simbolizar esses elementos de simetria. (Tabela 2.2)

Os Grupos de Espaço cristalográficos constituem-se do conjunto de operações de simetria que descrevem o objeto espacialmente. Existem 230 grupos de espaço, que não serão mostrados aqui por serem muito numerosos e visto que pouco acrescentariam para este trabalho.

Tendo em vista sua característica simétrica, os cristais podem ser divididos em fragmentos menores que carregam informação sobre sua estrutura, e operações de simetria,

logo, podemos falar sobre a célula unitária. A célula unitária é definida como sendo a menor unidade que possui toda a simetria do cristal (Esta informação é muito importante, pois diferencia a célula unitária da unidade assimétrica, que é a menor parte do cristal que é repetida, porém não leva necessariamente a informação sobre seus elementos de simetria).

Através das operações de simetria contidas na célula unitária pode-se definir sete sistemas cristalinos<sup>6</sup>: cúbico, tetragonal, ortorrômbico, romboédrico (ou trigonal), hexagonal, monoclinico e triclínico. A diferença entre esses sistemas pode ser vista através de seus parâmetros de rede, que são definidos na célula unitária como sendo o comprimento dos seus eixos ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ), e os ângulos existentes entre eles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Figura 2.10). Além deste, os sistemas cristalinos também podem ser identificados/diferenciados pela existência ou não de operações de simetria. A Tabela 2.3 mostra as restrições sobre os parâmetros de rede para cada um dos sete sistemas cristalinos.

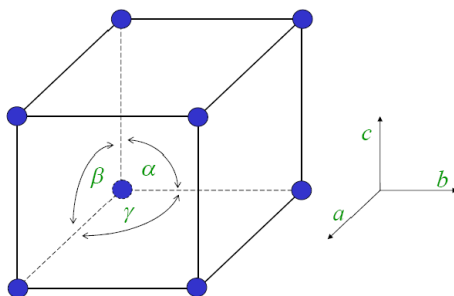


Figura 2.10: Célula unitária com parâmetros de rede.

A definição de eixos de referência de acordo com as restrições impostas por elementos de simetria determinam 6 redes primitivas, ao adicionarmos pontos de centragem a cada uma destas obteremos outras 8 possíveis redes sem que sejam alterados os respectivos sistemas cristalinos nem as restrições impostas sobre seus eixos, este grupo contendo então 14 redes é denominado por Redes de Bravais.

Uma Rede de Bravais é um conjunto de pontos construídos por translação a partir de um único ponto em intervalos discretos determinados por um conjunto de vetores denominados vetores de base. Todos os materiais cristalinos existentes na natureza (até

<sup>6</sup>Os únicos possíveis para representar um cristal, qualquer outro tipo de sistema diferente destes, ou seria uma equivalência de um deles, ou simplesmente não “preencheriam” todo o espaço na formação do cristal, resultando em algo “não cristalino”

Tabela 2.3: Sistemas cristalinos.

Sistema cristalino	Parâmetros de rede	
Cúbico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Trigonal ou romboédrico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma < 90^\circ$
Tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Ortorrômico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Monoclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta \neq 90^\circ$
	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma \neq 90^\circ$
Triclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \gamma \neq \beta \neq 90^\circ$

agora identificados) pertencem a uma das 14 redes de Bravais. Esta característica foi mostrada por Auguste Bravais, um cristalógrafo francês em 1948<sup>7</sup>. As 14 redes de Bravais podem ser vistas na Figura 2.11<sup>8</sup>.

Sabendo que os aminoácidos que constituem as proteínas são quirais (L-aminoácidos), teremos que, em um cristal proteico não observaremos as simetrias com operações impróprias, ou seja, não teremos simetrias que envolvam operações de inversão ou espelho, reduzindo assim o número de grupos espaciais possíveis, para um cristal proteico, para 65 (grupos quirais).

## 2.4 Difração de raios X por cristais

No ano de 1912, Max von Laue concebeu a possibilidade de realizar difração de raios X, utilizando uma estrutura cristalina como rede de difração tridimensional. As primeiras experiências foram realizadas Walter Friedrich e Paul Knipping sob a orientação de Laue. Um dos experimentos realizados por Laue e seus alunos (Friedrich e Knipping) em 21 de abril de 1912, consistia em incidir um feixe de raios X em um cristal. O esquema do experimento montado por Laue, pode ser visto na Figura 2.12. A Figura 2.13, mostra

<sup>7</sup>As exceções conhecidas são os chamados quasicristais de Shchtmann, os quais contudo não são verdadeiros cristais por não possuírem uma malha com repetição espacial uniforme.

<sup>8</sup>Note que os pontos dentro das células unitárias podem representar, por exemplo, átomos de uma estrutura, mas não necessariamente. Estes pontos podem representar, qualquer coisa que apresente a periodicidade da rede, como por exemplo uma molécula inteira ou um íon, etc., porém tudo o que aparece em um destes pontos deve, obrigatoriamente, aparecer em todos os outros, pois são equivalentes por simetria.

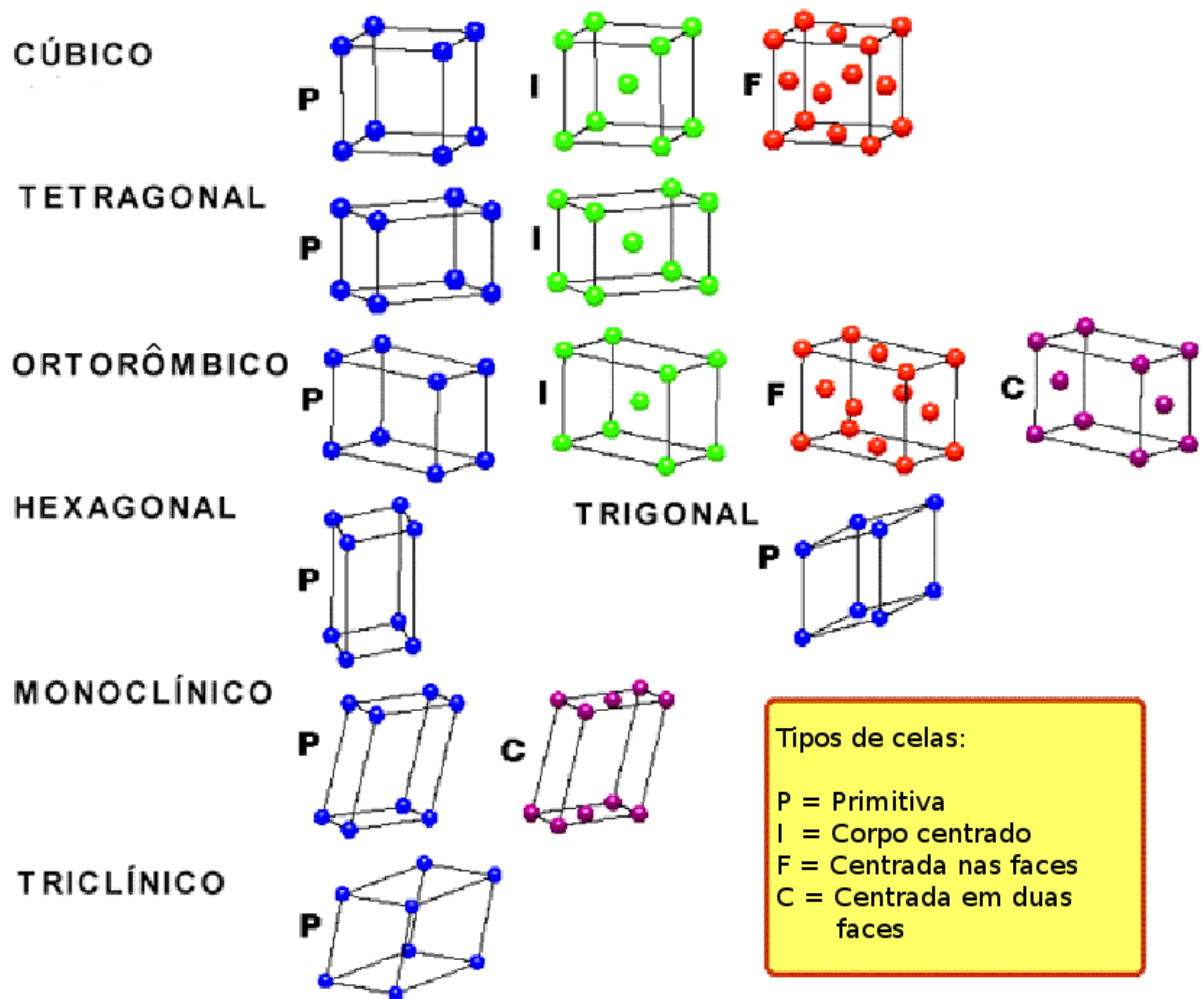


Figura 2.11: Redes de Bravais.

a chapa fotográfica após ter sido sensibilizada pelos raios X no experimento de Laue, Friedrich e Knipping.

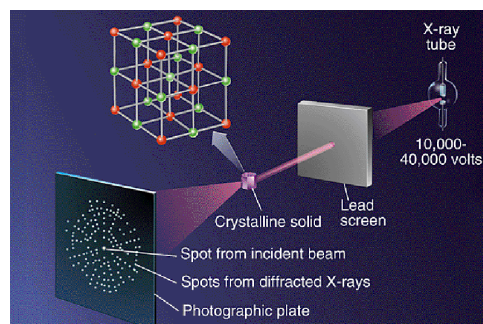


Figura 2.12: Imagem esquemática do experimento de Laue.

Logo depois William Lawrence Bragg demonstrou a relação que passou a ser conhecida como Lei de Bragg, fundamental para o estudo de estruturas cristalinas com o uso da difração de raios X.

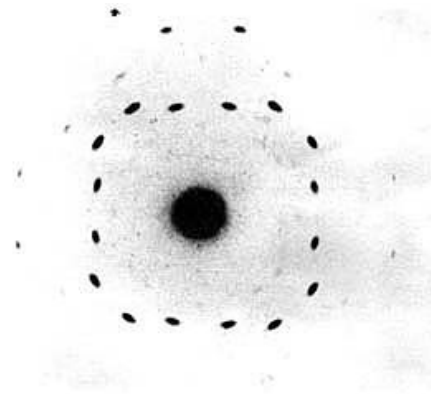


Figura 2.13: Fotografia do padrão de difração de um cristal de sulfato de cobre.

A interação entre as ondas espalhadas corresponde ao chamado fenômeno de interferência, que ocorre quando duas ondas em fase se encontram. Para que estas ondas estejam “em fase” elas precisam se encontrar exatamente no mesmo ponto sobre a onda, ou seja, uma crista coincidindo com uma crista, ou um vale coincidindo com um vale, e assim por diante. Vamos entender o que isto significa geometricamente.

Os raios X, incidem sobre um átomo da rede cristalina e após esta incidência, se encontraram em fase, isso implica, de acordo com a figura abaixo que a diferença de caminho entre estas duas ondas, deve ser igual a um número inteiro de seu comprimento de onda, caso contrário, estas estariam fora de fase.

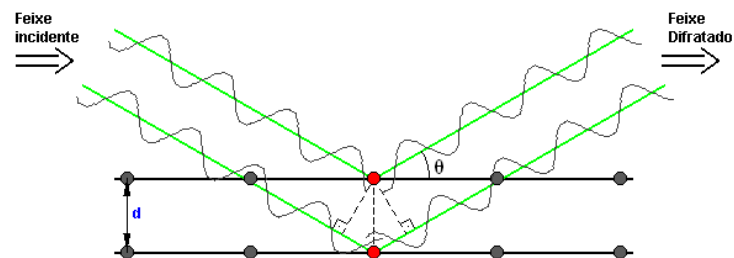


Figura 2.14: Interferência entre raios a nível planar.

Logo pela Figura 2.14, podemos concluir que:

$$n\lambda = 2d\text{sen}(\theta) \quad (2.10)$$

onde  $n$  é um número inteiro. Este resultado nos conduz a primeira formulação da Lei de Bragg. Esta relação indica a direção onde teremos um máximo de difração. Mas sabe-se que:

$$\text{sen}(\theta) \leq 1 \Rightarrow \frac{n\lambda}{2d} \leq 1 \quad (2.11)$$

ou seja, novamente mostramos que o comprimento de onda deve ser da ordem do espaçamento entre os átomos.

Este foi um método quantitativamente simples de se obter as condições de difração em função dos planos cristalinos, que são os planos que passam por pontos da rede cristalina e são separados por uma distância  $d$ , como mostrado na Figura 2.14. Estes planos são identificados pelos chamados Índices de Miller ( $hkl$ ), e pelo espaçamento entre eles ( $d_{hkl}$ ).

## 2.5 Índices de Miller

A orientação de um plano, em uma rede cristalina, pode ser representada por ( $hkl$ ), onde  $h$ ,  $k$  e  $l$  representam as intersecções fracionárias  $1/h$ ,  $1/k$ ,  $1/l$  que o plano faz com os eixos ( $a$ ,  $b$  e  $c$ ) da célula unitária ( $a/h$ ,  $b/k$ ,  $c/l$ ). Dois exemplos são mostrados na Figura 2.15, onde temos, na primeira imagem, um plano cortando o eixo  $a$  em 1, o eixo  $b$  em 1 e o eixo  $c$  também em 1, e, na segunda imagem, um segundo plano cortando o eixo  $a$  em  $1/2$ , o eixo  $b$  em  $1/2$  e o eixo  $c$  em 1. Invertendo estes valores fracionários, resultam os índices dos planos em questão (111) e (221).

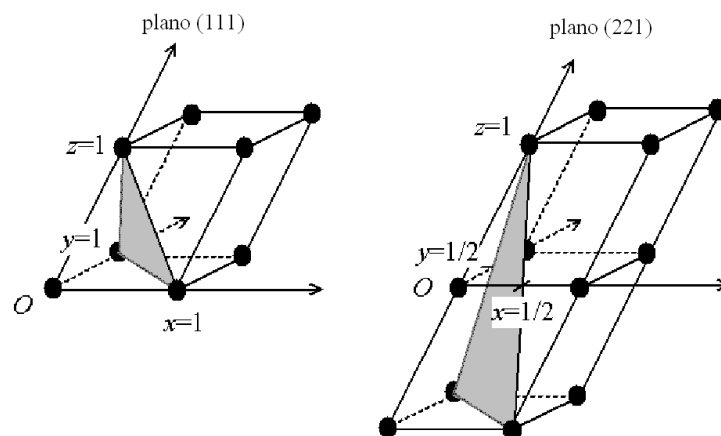


Figura 2.15: Planos representados pelos índices de Miller.

A distância interplanar  $d$  representa a distância entre dois planos consecutivos de uma família de planos ( $hkl$ ). Também pode ser definida como a distância da origem da célula unitária ao plano ( $hkl$ ) mais próximo, perpendicularmente a este plano. Logo, existe um conjunto de planos paralelos, equidistantes entre si, um dos quais passa pela origem dos eixos cristalográficos. A distância  $d$  é uma função dos índices de Miller do

plano  $(hkl)$  e dos parâmetros de rede  $(a, b, c, \alpha, \beta, \gamma)$ .

Considere agora que cada átomo do cristal é um centro espalhador, ou seja, cada um desses átomos possui um potencial espalhador que será sentido pela onda (ou partícula) que se aproximar deste. Como a difração de raios X ocorre devido a interação dessa radiação com os átomos, o meio espalhador constituído por centros discretos deverá ser substituído pela função densidade eletrônica média  $\rho(\vec{r})$  do objeto espalhador.

Uma onda plana monocromática de comprimento de onda  $\lambda$  pode ser descrita pela função:

$$Ae^{i(\vec{k}\cdot\vec{r}+\alpha)} \quad (2.12)$$

onde  $\vec{r}$  é o vetor posição de um ponto do espaço,  $A$  é a amplitude e  $\alpha$  a fase inicial da onda. Sua direção de propagação é definida pelo vetor de onda  $\vec{K}$  cujo módulo é  $K = 2\pi/\lambda$ .

Um exemplo esquemático é dado na Figura 2.16, onde considera-se dois centros espalhadores (O e O'). Coloca-se a origem do sistema referencial sobre o centro O e traçamos o vetor  $\vec{r}$  que localiza o centro O', de acordo com a figura abaixo.

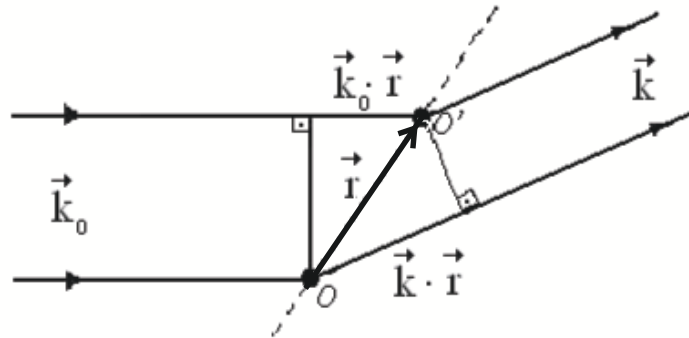


Figura 2.16: Difração por dois centros espalhadores.

Por conseguinte, a diferença de caminho entre estes dois raios é dada por  $\vec{r}\cdot(\vec{k}-\vec{k}_0)$ , e haverá interferência quando esta diferença for igual a  $n\lambda$ . Essas são as condições de Laue.

Portanto para um objeto com  $n$  centros espalhadores, cada um localizado por  $\vec{r}_i$ , a amplitude total  $f_K$  da onda espalhada, chamada de amplitude de espalhamento do objeto é:

$$f_K = \int_V \rho(\vec{r})e^{2\pi i(K\cdot\vec{r}_i)} \quad (2.13)$$

esta equação para cada valor de  $i$  é chamada de fator de espalhamento atômico.

O espalhamento total da célula unitária pode ser escrito como o somatório sobre as contribuições de todos os átomos dentro da célula unitária. Esta grandeza é chamada de Fator de Estrutura que é uma função da distribuição da densidade eletrônica na célula unitária, dado por:

$$F_{hkl} = \sum_K f_K e^{2\pi i(hx_K + ky_K + lz_K)} = |F_{hkl}| e^{i\alpha} \quad (2.14)$$

onde  $f_K$  é o fator de espalhamento atômico do  $k$ -ésimo átomo na célula unitária que tem coordenadas  $x_k, y_k, z_k$  e  $\alpha$  é a fase do fator de estrutura  $F(hkl)$ .

Os picos de intensidade máxima serão detectados para vetores do tipo:

$$\vec{K} = h\vec{A} + k\vec{B} + l\vec{C} \quad (2.15)$$

e os vetores  $\vec{A}$ ,  $\vec{B}$  e  $\vec{C}$  são dados por:

$$\vec{A} = 2\pi \cdot \frac{\vec{b} \times \vec{c}}{\vec{a} \cdot (\vec{b} \times \vec{c})} \quad \vec{B} = 2\pi \cdot \frac{\vec{c} \times \vec{a}}{\vec{a} \cdot (\vec{b} \times \vec{c})} \quad \vec{C} = 2\pi \cdot \frac{\vec{a} \times \vec{b}}{\vec{a} \cdot (\vec{b} \times \vec{c})} \quad (2.16)$$

Estes vetores são chamados de vetores do espaço recíproco<sup>9</sup>, e como pode ser visto a partir das equações 2.13 e 2.14 a estrutura (eletrônica) cristalina e seu padrão de difração (densidade eletrônica) são relacionadas entre si por uma Transformada de Fourier. O padrão de difração é uma Transformada de Fourier da densidade eletrônica da estrutura. Embora uma estrutura cristalina seja adequadamente descrita no espaço direto (ou espaço físico), pelo vetor  $\vec{r}$  do tipo:

$$\vec{r} = x\vec{a} + y\vec{b} + z\vec{c} \quad (2.17)$$

que localiza qualquer ponto de rede e qualquer átomo, é necessário a introdução do espaço recíproco, varrido pelo vetor  $\vec{K}$  para podermos compreender a interação da radiação com os átomos da estrutura cristalina.

Os vetores do espaço recíproco podem ser construídos geometricamente, pois

<sup>9</sup>Por esta razão, é comum ouvir a expressão de que “o que visualizamos após a difração é o espaço recíproco e não o espaço direto”.

são perpendiculares aos vetores  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$ , e  $\vec{c}$  que são os vetores no espaço direto (que pode ser visto nas equações (2.16)). Com isto, o vetor  $\vec{K}$  da rede recíproca, representando uma rede bidimensional de linhas normais a um plano de Bragg, pode ser escrito como  $\vec{K}_{hk} = h\vec{A} + k\vec{B}$ . A Figura 2.17 mostra a construção da rede recíproca em duas dimensões do plano (100).

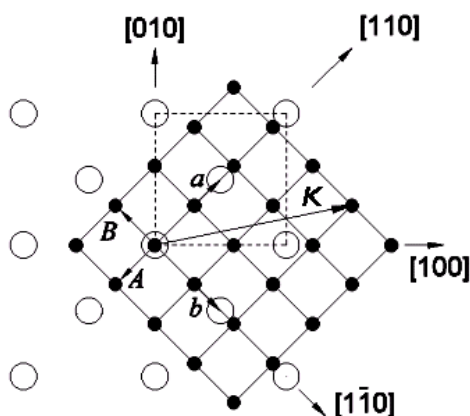


Figura 2.17: Vetores do espaço direto e recíproco.

## 2.6 Extições Sistemáticas

Devido a geometria das redes cristalinas, alguns pontos da mesma podem ficar “escondidos” por outros pontos que tenham posições equivalentes a este se olhados através de determinadas direções.

Tais pontos estão relacionados por operações de simetria translacionais, e portanto a intensidade de uma dada reflexão pode ser extinta (reflexões que possuem zero de intensidade) devido a interferência das ondas espalhadas por átomos nestas posições. Por exemplo, um eixo de roto-translação ocasiona extições em reflexões ao longo da linha axial a qual o eixo é paralelo e os planos de deslizamento provocam extições em reflexões no plano paralelo ao elemento de simetria, cortando a origem da rede recíproca. As extições sistemáticas mais comuns e os elementos de simetria translacionais que as provocam estão relacionadas na Tabela 2.4.

Informações sobre o grupo espacial podem ser obtidas pela análise das Extições Sistemáticas de algumas famílias de reflexões.

Tabela 2.4: Extinções sistemáticas provocadas por elementos de simetria.

Reflexões afetadas	Elementos de simetria translacional	Condições
Nenhuma	P-rede primitiva	Nenhuma
hkl	A-rede centrada	$k + l = 2n + 1$
hkl	B-rede centrada	$h + l = 2n + 1$
hkl	C-rede centrada	$h + k = 2n + 1$
hkl	F-rede centrada	$k + l = 2n + 1$ $h + l = 2n + 1$ $h + k = 2n + 1$
hkl	I-corpo centrado	$h + k + l = 2n + 1$
0kl	b-planos de deslizamento $\parallel (100)$ c-planos de deslizamento $\parallel (100)$ n-planos de deslizamento $\parallel (100)$ d-planos de deslizamento $\parallel (100)$	$k = 2n + 1$ $l = 2n + 1$ $k + l = 2n + 1$ $k + l = 4n + 1$
h0l	a-planos de deslizamento $\parallel (010)$ c-planos de deslizamento $\parallel (010)$ n-planos de deslizamento $\parallel (010)$ d-planos de deslizamento $\parallel (010)$	$h = 2n + 1$ $l = 2n + 1$ $h + l = 2n + 1$ $h + l = 4n + 1$
hk0	a-planos de deslizamento $\parallel (001)$ b-planos de deslizamento $\parallel (001)$ n-planos de deslizamento $\parallel (001)$ d-planos de deslizamento $\parallel (001)$	$h = 2n + 1$ $k = 2n + 1$ $h + k = 2n + 1$ $h + k = 4n + 1$
h00	$2_1$ -eixo helicoidal ao longo de $a$	$h = 2n + 1$
0k0	$2_1$ -eixo helicoidal ao longo de $b$	$k = 2n + 1$
00l	$2_1, 4_2$ -eixo helicoidal ao longo de $c$	$l = 2n + 1$

## 2.7 Fator de Estrutura

Se construíssemos um padrão de difração usando apenas aspectos geométricos (Lei de Bragg), seria esperado que, como em todos os picos há interferência construtiva, eles deveriam ter a mesma intensidade. Porém, há vários aspectos físicos que interferem na intensidade. O primeiro a ser considerado é o fator de espalhamento atômico ( $f_k$  (2.13)). Tal fator indica o quanto um átomo pode espalhar a um dado ângulo e um certo comprimento de onda.

Assim como o fator de espalhamento atômico, o fator de estrutura é um quociente de duas amplitudes, no caso, a amplitude da onda espalhada por todos os átomos da célula unitária e a amplitude da onda espalhada por um elétron. Para calcular o fator de estrutura  $F(\vec{K})$ , usa-se a seguinte equação:

## 2.8 Determinação de estruturas monocristalinas Fundamentos cristalográficos

$$F_{hkl} = \sum_{n=1}^N f_n e^{2\pi i(\vec{r}_n \cdot \vec{K})} \quad (2.18)$$

A equação 2.18 pode ser utilizada para calcular o padrão de difração esperado para a estrutura modelo, e então ser usado durante o refinamento da estrutura cristalina. Os fatores calculados desta forma são chamados de Fatores de Estrutura Calculados  $F_c$ , e descrevem matematicamente a amplitude observada quando os raios X são difratados por um cristal durante a coleta de dados.

Experimentalmente só é possível determinar o módulo do fator de estrutura, mas não sua fase. A função  $F$  é definida no espaço recíproco dos vetores  $\vec{K}$ , e é a transformada de Fourier da densidade eletrônica, ou seja, é uma “imagem” no espaço recíproco da função  $\rho(\vec{r})$ , que descreve a estrutura do objeto no espaço físico.

## 2.8 Determinação de estruturas monocristalinas

Comparando-se a equação (2.18) com a equação (2.13), pode-se encontrar uma equação para as densidades de carga em função dos índices de Miller, através de uma transformada de Fourier, ou seja, da seguinte forma:

$$\rho_{hkl} = \frac{1}{V} \sum |F_{hkl}| \exp(i\alpha_{hkl}) \exp(-2\pi i(hx + ky + lz)) \quad (2.19)$$

Portanto, conhecendo as amplitudes e as fases desta equação, pode-se calcular o padrão esperado para uma estrutura, através do somatório anteriormente citado, já que os picos de  $\rho$  fornecem as posições dos átomos [90].

Analisando por exemplo, os planos cristalográficos  $(\bar{h}\bar{k}\bar{l})$ , vê-se que os mesmos são indistinguíveis geometricamente dos planos  $(hkl)$ , pois têm mesmo espaçamento e orientação. Mas, num cristal sem centro de simetria eles são fisicamente diferentes, logo é de se esperar que as reflexões  $(hkl)$  e  $(\bar{h}\bar{k}\bar{l})$  sejam diferentes.

Porém, as amplitudes das reflexões  $(hkl)$  e  $(\bar{h}\bar{k}\bar{l})$  são grandezas reais, ou seja, complexo conjugadas ( $F_{hkl} = F_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}^*$ ). Este fato é conhecido como lei de Friedel. Dessa forma, as intensidades observadas serão idênticas, e apenas estaremos medindo suas amplitudes, enquanto que as fases não são obtidas experimentalmente. Esse problema é conhecido na

## **2.8 Determinação de estruturas monocristalinas Fundamentos cristalográficos**

cristalografia como “O Problema das Fases”. Uma vez obtidas as fases iniciais, então é possível, com os fatores de estrutura, calcular a densidade inicial de cargas do material, que podem ser refinados para conseguir modelos mais apropriados.

## Capítulo 3

# Cristalografia de Macromoléculas

A Cristalografia de Macromoléculas utiliza a Cristalografia (ou seja, da difração de raios X por cristais) para determinação das estruturas tridimensionais de importantes classes de moléculas biológicas, como proteínas. A cristalografia foi utilizada pela primeira vez para determinação de estruturas biológicas nos anos 50 quando Perutz e Kendrew [91] publicaram as estruturas da Hemoglobulina e Mioglobina respectivamente. Desde então esta técnica vem sendo utilizada em sistemas biológicos com grande sucesso e reprodutibilidade.

A estrutura tridimensional das macromoléculas com resolução atômica, traz informações essenciais para o entendimento detalhado de vários processos biológicos como catálise enzimática, infecções virais, ciclos metabólicos essenciais para parasitas, entre outros. A partir desses dados, é possível o planejamento racional de fármacos, vacinas, modelagem de inibidores, e otimização da atividade catalítica enzimática entre outros. Tudo isso é possível porque a função em cada um desses sistemas biológicos complexos está intimamente ligada a sua estrutura. Os mecanismos de reconhecimento e resposta de macromoléculas biológicas dependem de suas estruturas químicas e, com mesmo grau de importância, de suas estruturas tridimensionais.

A estrutura cristalográfica de uma molécula biológica pode ser obtida através da análise do padrão de difração produzido por seus cristais. Esta análise pode ser sumarizada nos seguintes passos:

- Obtenção da macromolécula;
- Purificação;

- Cristalização (busca de condições de cristalização para a macromolécula em questão);
- Coleta e processamento de dados;
- Determinação da estrutura.

Em muitos casos, a busca de uma condição de cristalização para macromoléculas pode ser considerado o passo mais difícil durante o processo de obtenção de sua estrutura tridimensional. Fatores como pH, temperatura, agente precipitante, solubilidade, dentre outros, são determinantes na obtenção de um monocristal de tamanho e qualidade adequados para os experimentos. Para se encontrar a melhor condição de cristalização, uma grande quantidade da amostra purificada é utilizada afim de encontrar os valores exatos de cada um dos fatores mencionados anteriormente. Em se tratando de proteínas, muitas vezes essa grande quantidade não pode ser obtida de sua fonte natural, e para resolver este problema, contamos com os métodos de biologia molecular, e suas técnicas de clonagem e expressão de proteínas recombinantes mencionadas no Capítulo 1.

### 3.1 Cristalização de Proteínas

A cristalização de proteínas teve início no começo do século XX com a obtenção dos primeiros cristais de hemoglobina [92] e de urease [93]. Nesta época, a cristalização tinha como objetivo principal o processo de purificação de proteínas. Em 1934 foram obtidas as primeiras fotografias de difração de raios X da enzima pepsina [94], dando origem a aplicação da cristalografia de raios X ao estudo de macromoléculas biológicas.

A cristalização de proteínas é basicamente um procedimento de tentativa e erro, no qual a proteína é precipitada da sua solução inicial. Cada macromolécula possui condições próprias e específicas para se cristalizar, mas um requerimento essencial para qualquer experimento é a pureza do material a ser cristalizado.

A cristalização de macromoléculas em solução é um fenômeno de equilíbrio reversível. Possui parâmetros termodinâmicos e cinéticos específicos, que dependem das propriedades físicas e químicas do solvente (solução tampão) e do soluto (proteína, sais, aditivos) envolvidos. Sob condições de supersaturação, nas quais a concentração do soluto em solução excede sua concentração de saturação, o sistema é dirigido a um estado de

equilíbrio no qual a proteína é separada entre uma fase sólida e uma fase solúvel [95] (Figura 3.1). Embora as moléculas individuais percam graus de liberdade rotacionais e translacionais, reduzindo a entropia do sistema, elas formam ligações químicas novas e estáveis. Isto reduz a energia potencial (energia livre) do sistema e garante a força motriz para o processo de ordenamento das moléculas em uma rede cristalina.



Figura 3.1: Diagrama de fases bidimensional de uma proteína [96].

Para obter cristais adequados para os estudos de difração, é preciso de atentar a dois pontos:

- Alcance do ponto de supersaturação nos quais os primeiros microcristais são formados (etapa de nucleação);
- Crescimento dos cristais em tamanho suficiente para os estudos de difração (etapa de crescimento).

A etapa de nucleação, assim como a etapa de crescimento, dependem invariavelmente de um extenso conjunto de parâmetros. Seja para atingir, de forma adequada, ponto de saturação da proteína e a obtenção dos primeiros microcristais, ou para manter a faixa de crescimento ideal e formar cristais de bom tamanho, temos que considerar a atuação simultânea de fatores como a temperatura, o pH, a força iônica, o grau de pureza da proteína e dos reagentes utilizados, além de uma série de outros fatores, bem como fatores bioquímicos e parâmetros biológicos.

Outra etapa a ser citada é a etapa de cessação de crescimento. Esta é a etapa que determina o tamanho final do cristal e tem como principais inimigos os defeitos de crescimento do cristal (na formação das faces), “envelhecimento” das macromoléculas e quantidade insuficiente de proteínas.

Existem quatro principais métodos utilizados para reduzir gradualmente a solubilidade de proteínas [95]:

1) **Diálise**: Utiliza-se de uma membrana semipermeável, através da qual pode haver a difusão de macromoléculas de acordo com um gradiente de concentração. Assim, vagarosamente leva-se a solução de proteína a sua condição de supersaturação;

2) **Difusão de vapor**: Baseia-se no equilíbrio da pressão de vapor de uma solução precipitante contida num reservatório (maior volume) e uma gota que contém uma solução de proteína. O processo é lento e depende da diferença de concentração da solução do reservatório e da gota;

3) **“Batch”**: Utilizado para a Produção de cristais em larga escala, uma vez que as condições de cristalização já sejam conhecidas. Consiste na variação de fatores como a temperatura de uma solução em estado supersaturado;

4) **Interface livre de difusão**: Baseia-se na difusão líquido/líquido no qual o agente de cristalização difunde para a solução de proteína.

## 3.2 Coleta e processamento de dados

Cristais de proteínas contém canais de solvente que normalmente correspondem de 40 a 60% do volume do cristal. Esta alta porcentagem de solvente dos cristais faz com que seja difícil o seu manuseio, já que a remoção do solvente os desestabiliza [97].

Cristais de proteínas são bastante sensíveis aos raios X. Muitas vezes é necessário utilizar vários cristais para se obter um conjunto de dados que seja suficiente para prosseguir com os próximos passos. Para minimizar os efeitos da radiação sobre os cristais, pode-se utilizar um sistema de refrigeração para a coleta de dados. Esta técnica também torna possível o estudo de cristais que não são estáveis na presença da solução na qual cresceram, pois os mesmos são congelados na presença de uma solução crio-protetora [95].

A fonte de radiação utilizada também é um fator importante na coleta de dados.

Fontes de alta intensidade, como fontes de radiação síncrotron são hoje amplamente utilizadas em Cristalografia de raios X, o que tem permitido experimentos bastante avançados. Devido a sua alta intensidade, a radiação síncrotron tem sido utilizada para otimizar a coleta de dados e permitir estudos de amostras (cristais pequenos e/ou cela unitárias grandes) que não poderiam ser realizados em fontes convencionais [97].

Usualmente o cristal submetido a coleta é transferido para um fino capilar de borossilicato (0,5 a 1,0 mm de diâmetro, 0,01 mm de espessura de parede), alimentados com o líquido mãe (solução em que o cristal cresceu) e montados sobre uma cabeça goniométrica de forma a permitir graus de liberdade, angulares e rotacionais para o alinhamento do cristal frente aos raios X. Esta é colocada entre o colimador do gerador de raios X e o detetor. Inicia-se então a coleta de dados.

O procedimento adotado para cada coleta de dados pode variar para cada experimento. A escolha de parâmetros como o tempo de exposição para cada imagem, distância do cristal ao detetor e o ângulo de oscilação, dentre outros, dependem tanto da fonte de radiação utilizada, como da qualidade dos cristais. Neste ponto é importante fazermos uma pequena análise sobre a diferença desses parâmetros para uma coleta de um monocristal de pequenas moléculas ou para um monocristal de macromoléculas.

Para um cristal de macromoléculas, pela quantidade de átomos presentes em sua molécula, espera-se que sua cela unitária (no espaço direto) seja maior do que as celas unitárias de um monocristal de pequenas moléculas, conseqüentemente sua cela unitária no espaço recíproco, será menor, logo no espaço recíproco teremos mais informação dentro de um espaço menor. Se tratarmos cada átomo como um centro espalhador, teremos que estes átomos estarão muito mais próximos uns dos outros em uma macromolécula do que em uma pequena molécula, logo a distância do detetor deverá ser maior para que haja uma boa separação entre os picos de difração. Por esta razão, nem todos os equipamentos que não sejam síncrotrons, poderão realizar uma coleta de um monocristal de macromolécula, pois dependerá da distância máxima entre a amostra e o detetor do equipamento além de depender diretamente do tamanho do LCD do detetor. Logo, percebe-se que a “configuração” inicial destes parâmetros deve ser realizada em uma máquina que é usualmente utilizada para coleta de pequenas moléculas.

Os dados coletados, um conjunto de imagens contendo os pontos de difração,

são então levados ao processamento dos dados, onde será realizada a determinação da orientação do cristal e parâmetros de cela, e a indexação das imagens e geração das listas de reflexões com  $hkl$ ,  $I$ , e  $\sigma(I)$ , onde  $hkl$  são os índices de Miller,  $I$  a intensidade e  $\sigma(I)$  uma estimativa da qualidade da medida da intensidade, estimado pelo valor da radiação de fundo ao redor do pico que está sendo integrado.

Inicialmente é estimado o valor para a radiação de fundo, que é usado subsequentemente para a localização das reflexões. Os pontos de difração são identificados como uma série de pixels acima de um valor limiar (definido como um número de sigmas acima da radiação de fundo) adjacentes um ao outro, ou dentro de uma distância predefinida. Pontos de difração, que diferem significativamente do valor médio, são rejeitados.

A orientação do cristal, parâmetros de rede e rede de Bravais são determinados a partir da indexação de um conjunto inicial de reflexões obtidos em uma coleta inicial (pré-medição), onde são coletados um frame a cada posição dos ângulos variados, até que atinjam uma “volta completa”, o número de reflexões irá então depender do valor escolhido para  $\sigma(I)$ .

A partir da orientação é então possível a indexação dos pontos de difração ao longo de todas as imagens. A estimativa dos parâmetros de cela a partir de poucas reflexões pode levar a muitos erros devido a correlação intrínseca entre parâmetros de rede e parâmetros do detetor. Para isto é feito o pós-refinamento ao longo de todas as imagens, onde um valor mais correto para os vários parâmetros são obtidos.

O escalonamento e pré-medição dos dados tem como objetivo reduzir os dados coletados provenientes de um cristal, pois as reflexões equivalentes por simetria são conhecidas e não precisam ser medidas, gerando um único conjunto de dados contendo somente reflexões independentes com um erro associado a cada medida. Este será o conjunto de dados a ser utilizado para a determinação da estrutura.

### 3.3 Determinação da estrutura

Vários são os esforços para minimizar os erros durante a coleta de dados que podem levar a problemas posteriores na interpretação dos resultados. No processamento os cristais são caracterizados, isto é, seus parâmetros de rede e simetria são determina-

dos, a quantidade de moléculas na cela unitária pode ser estimada através do cálculo da porcentagem de solvente e da simetria, e as intensidades medidas no padrão de difração são associadas aos diferentes planos do cristal. Para a determinação da estrutura, tendo como informação um conjunto de dados do tipo  $\mathbf{h}, \mathbf{k}, \mathbf{l}, \mathbf{I}, \sigma(\mathbf{I})$ , devemos escolher um método de resolução.

### 3.3.1 Métodos de Resolução

Os métodos utilizados para resolução de estruturas de pequenas moléculas, tais como métodos diretos<sup>1</sup> e o método de Patterson<sup>2</sup> não são usualmente utilizados para determinar a estrutura de uma proteína, convém destacar que estes métodos são empregados para estruturas de até 100 átomos, enquanto que uma proteína considerada “pequena” possui da ordem de 1.000 átomos.

Existem basicamente três métodos utilizados para a resolução de estrutura de proteínas, ou seja, três métodos que solucionem o “problema das fases” citado na seção 2.8. São eles:

- Método da substituição molecular;
- Método da substituição isomórfica;
- Método da dispersão anômala.

O método da substituição molecular é baseado no princípio de que as proteínas que apresentam uma sequência de aminoácidos altamente semelhantes tendem a se enovelar de forma bastante similar. Logo, uma estrutura que já tenha sido determinada serve de modelo inicial para a obtenção de um conjunto preliminar de fases que pode ser subsequentemente refinado. O sucesso deste método é reforçado pelo crescente número de estruturas que tem sido depositadas no banco de dados de proteínas (PDB), fazendo com que a probabilidade de se encontrar uma estrutura homóloga àquela em estudo aumente.

O método consiste em ajustar a estrutura molecular da proteína conhecida dentro do arranjo cristalino da molécula desconhecida. Este, envolve basicamente dois passos, a

---

<sup>1</sup>Envolvem relações estatísticas entre os fatores de estrutura

<sup>2</sup>As posições dos átomos podem ser determinadas a partir da posição de átomos pesados

rotação  $R(\alpha, \beta, \gamma)$ , e a translação. Esta primeira é utilizada para obtenção da melhor orientação relativa entre a proteína modelo e a proteína em estudo, isto é realizado através do cálculo da função de rotação. A translação ( $t$ ), necessária para superpor a molécula modelo, já previamente orientada, com a molécula em estudo utilizando a função de translação.

O segundo método mais utilizado para a determinação de uma estrutura cristalográfica de macromoléculas é o método da substituição isomórfica. Este método depende fundamentalmente da obtenção de cristais de derivados isomorfos, isto é, cristais de proteína com átomos pesados (átomos que tem maior contribuição para o espalhamento que os átomos que compõem a proteína). Um derivado isomorfo perfeito é aquele em que a única variação no mapa de densidade eletrônica, em relação a proteína nativa, se deve a posição dos átomos pesados. A introdução destes átomos deve ser feita de modo a não alterar a estrutura proteica original. A determinação da posição destes átomos pesados podem levar a obtenção de um conjunto preliminar de fases.

O terceiro e último método é chamado de método da dispersão anômala a múltiplos comprimentos de onda. Quando os elétrons se encontram em camadas mais internas do átomo, isto é, mais próximos do núcleo, o tratamento dado ao espalhamento devido a estes elétrons deve ser mais cuidadoso, uma vez que a força de interação entre esses e o núcleo atômico não pode mais ser desprezada, e o elétron não pode mais ser tratado como livre (violando assim a Lei de Friedel)<sup>3</sup>. Devido a esta interação com o núcleo, existe a introdução de um termo imaginário ao fator de espalhamento atômico, dependente do comprimento de onda da radiação.

Um modelo inicial construído a partir de uma conjunto preliminar de fases, normalmente contem muitos erros. No sentido de se produzir um modelo mais próximo do real, é necessário a realização do refinamento cristalográfico, que são passos introduzidos em um processo cíclico de melhora gradual do modelo.

---

<sup>3</sup>A lei de Friedel relaciona uma reflexão de índices  $h,k,l$  com a reflexão  $-h,-k,-l$ , porém a relação é deduzida considerando o fator de estrutura obtido quando os elétrons são descritos por funções de onda de elétrons livres

## 3.4 Refinamento

Quando falamos em refinamento de pequenas moléculas, normalmente, estamos olhando para as posições atômicas na primeira solução, as quais não são o resultado direto do experimento de difração, mas uma interpretação da densidade de elétrons calculada a partir das intensidades medidas e os ângulos de fase inicial determinados.

No refinamento, novos ângulos de fase, geralmente mais precisos, podem ser calculadas a partir das posições atômicas, o que permite re-determinar a função densidade de elétrons com maior precisão, e, a partir do mapa atualizado de densidade de elétrons, posições atômicas mais precisas podem ser derivadas, que levam a ângulos de fase ainda melhores, e assim por diante. Novos átomos podem ser introduzidas no modelo, quando a função de densidade de elétrons obtida mostra um valor alto em algum lugar da célula unitária, onde o modelo não contém um átomo ainda.

Em se tratando de macromoléculas, devido a limitada resolução tipicamente obtida, há uma relativa escassez de dados experimentais tais como comprimentos de ligação e ângulos, esta no entanto é compensada por informações químicas. Logo, o refinamento cristalográfico das macromoléculas pode ser visto como um problema de otimização não linear que consiste na minimização de uma função de energia híbrida (e não da minimização da diferença entre os fatores de estruturas observados e calculados como em cristalografia de pequenas moléculas) dada por:

$$E_{total} = E_{emp} + w \cdot E_{raio-x} \quad (3.1)$$

onde  $E_{emp}$  compreende o termo de energia que leva em consideração informações empíricas, e o termo  $E_{raio-x}$  consiste de um resíduo cristalográfico mostrado abaixo:

$$M = \sum_{\vec{K}} w (|F_o(\vec{K})| - |F_c(\vec{K})|)^2 \quad (3.2)$$

onde  $F$  é o fator de estrutura e os subscritos “o” e “c” representam grandezas observadas e calculadas. Cada adendo nesta soma é multiplicada por um fator de ponderação individual  $w$ , o que reflete nossa confiança neste termo em particular e é derivada do padrão incerteza,  $\sigma(I)$ , dessa medida.

Durante os ciclos de refinamento, a concordância entre a estrutura proposta e a estrutura observada pode ser controlada por meio de dois critérios principais a serem considerados:

- o índice residual,  $R_1$ , dado por:

$$R_1 = \frac{\sum_{\vec{k}} ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum_{\vec{k}} |F_{obs}|} \quad (3.3)$$

onde  $F_{obs}$  é o fator de estrutura observado e  $F_{calc}$  é o fator de estrutura calculado [98].

- o índice residual livre  $R_{free}$  [97]:

$$R_{free} = \frac{\sum_{\vec{k}} ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum_{\vec{k}} |F_{obs}|} \quad (3.4)$$

Quando a estrutura cristalográfica é submetida a análise, resíduos importantes para a catálise, contatos intermoleculares responsáveis pela estabilização da proteína, contatos com o substrato e muitas outras características podem ser identificadas. É importante ressaltar aqui, que a estrutura cristalográfica é uma “foto” da molécula em sua conformação média e de menor energia livre, e portanto cautela deve ser tomada para que não haja uma interpretação errônea dos resultados.

# Capítulo 4

## Objetivos

### 4.1 Objetivos gerais

O presente trabalho de pesquisa tem por objetivos gerais a obtenção das estruturas tridimensionais das enzimas celobiohidrolase e endoxilanase do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* e a caracterização bioquímicas das mesmas.

### 4.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- A compreensão da teoria e técnicas de cristalografia aplicadas a macromoléculas;
- A compreensão da teoria e técnicas necessárias para a obtenção e manipulação das enzimas, bem como seus mecanismos de ação;
- Obtenção de transformantes de *P. pastoris* produtores da enzima CBH1.2r ativa;
- Produção das enzimas CBH1.2r e HXYN2r em quantidades suficientes para os ensaios de cristalização;
- Estabelecimento de protocolos de purificação que garantam amostra com alto grau de pureza e preservação das estruturas nativas das enzimas, bem como sua atividade;
- Realização de ensaios enzimáticos com as enzimas recombinantes CBH1.2 e HXYN2.

- Encontrar condições de cristalização para as enzimas alvo;
- Obtenção de cristais com tamanho e qualidade suficientes para a realização dos ensaios de cristalização;
- Coleta de dados de difração dos cristais das macromoléculas utilizando difratômetro de raios X disponível;
- Resolução da estrutura tridimensional das enzimas alvo do projeto.

# Capítulo 5

## Materiais e Métodos

### 5.1 Materiais

#### 5.1.1 Microrganismos

##### 5.1.1.1 Bactérias

A linhagem da bactéria *Escherichia coli* utilizada para manipulação de DNA foi a DH5- $\alpha$  [99]. As células de *E. coli* foram cultivadas em meio LB (ver seção 5.1.6.1) e estocadas a -80 °C em glicerol 25% estéril.

##### 5.1.1.2 Levedura

As linhagens da levedura *P. pastoris* utilizadas neste trabalho foram a SMD1168, e a linhagem GS115 (Invitrogen).

As células de *P. pastoris* foram mantidas em meio MD e estocadas a -80 °C em glicerol.

#### 5.1.2 Vetores

##### 5.1.2.1 pHIL-D2

Este vetor possui 8209 pares de base (pb ou em inglês bp). Apresenta o gene de resistência a ampicilina, uma origem de replicação de *E. coli*, a região promotora e terminadora do gene AOX1, e o gene HIS4 inativo (His-) e sequência para anelamento

dos oligonucleotídeos 5' AOX1 e 3' AOX1 (Figura 5.1).

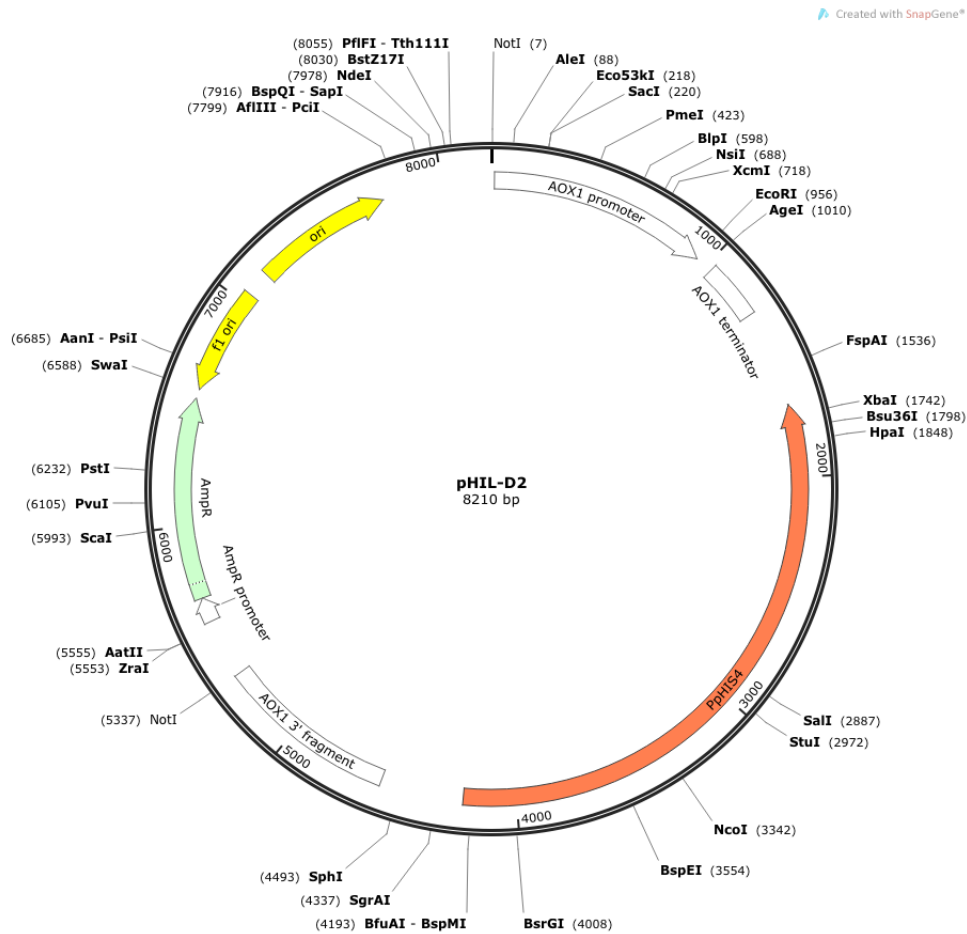


Figura 5.1: Representação esquemática do mapa físico do vetor pHIL-D2 para expressão em *P. pastoris*. Esse vetor possui 8,2 kb, possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção em bactéria, origem de replicação em bactéria (ori-pBR322), marca de seleção auxotrófica HIS4, promotor e terminador AOX1 (Fonte: [100]).

### 5.1.3 Enzimas - Endonucleases de restrição

Enzima	Sítio de Clivagem	Tampão	T incubação	Procedência
Not I - FastDigest	G C <sup>^</sup> G G C G C	Orange	37 °C	Thermo scientific
EcoR I - FastDigest	G <sup>^</sup> A A T T C	Orange	37 °C	Thermo scientific

### 5.1.4 Soluções Estoque

- **YNB 1,34% (Yest Nitrogen Base) (10x)**

YNB* (Yeast Nitrogen Base Without Amino acids)(Difco)	13,4% (p/v)
Sulfato de Amônio	10% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

A solução foi filtrada em membrana Durapore GV de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore®), e estocada a 4 °C. O prazo de validade desta solução nestas condições é de aproximadamente um ano.

- **5.1.4.1 Biotina 0,02% (500x)**

Biotina	0,02% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

A solução foi filtrada em membrana Durapore GV de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore®), e estocada a 4 °C. O prazo de validade desta solução nestas condições é de aproximadamente um ano.

- **5.1.4.2 Dextrose 20% (10x)**

Dextrose	20% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

A solução foi filtrada em membrana Durapore GV de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore®) ou autoclavada por 15 minutos, a 120 °C e 0,5 atm. A mesma foi estocada a 4 °C. O prazo de validade desta solução nestas condições é de aproximadamente um ano.

- **5.1.4.3 Metanol 5% (10x)**

Metanol	5% (v/v)
Água destilada	q.s.p.

A solução foi filtrada em membrana Durapore GV de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore®), e estocada a 4 °C. O prazo de validade desta solução nestas condições é de aproximadamente dois meses.

- **5.1.4.4 Glicerol 10% (10x)**

Glicerol                    10% (v/v)

Água destilada    q.s.p.

A solução pode ser filtrada em membrana Durapore GV de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore®) ou autoclavada por 20 minutos, a 1 atm. A mesma deve ser estocada a temperatura ambiente.

- **5.1.4.5  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1M**

$\text{K}_2\text{HPO}_4$                     34,84 g

Água destilada (q.s.p.) 200 mL

- **5.1.4.6  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$                     122,48 g

Água destilada (q.s.p.) 900 mL

- **5.1.4.7 Tampão Fosfato de Potássio 1M pH6,0**

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  1M (seção 5.1.4.5) 132 mL

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M (seção 5.1.4.6) 868 mL

Ajustar o pH para  $6,0 \pm 0,1$  (caso o pH precise ser ajustado, utilizar ácido fosfórico ou hidróxido de potássio). A solução foi filtrada em membrana Durapore GV de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore®) ou autoclavada por 20 minutos, a 1 atm). A solução foi estocada a temperatura ambiente. O prazo de validade desta solução nestas condições é maior que um ano.

- **Ampicilina 100mg/mL (500x)**

A solução foi filtrada em membrana Durapore GV de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore®) e estocada a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

- **5.1.4.8 Solução de Soroalbumina Bovina 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$**

Soroalbumina Bovina 2 mg

Água destilada 1 mL

A solução foi estocada a 4 °C.

- **5.1.4.9 Solução HCl 0,1 M**

Ácido Clorídrico (HCl) 0,84 mL

Água destilada (q.s.p.) 100 mL

A solução foi estocada a temperatura ambiente.

- **5.1.4.10 Solução NaOH 1 M**

NaOH 4 g

Água destilada (q.s.p.) 100 mL

A solução foi estocada a temperatura ambiente.

- **5.1.4.11 Solução de Acrilamida Bis-Acrilamida (39:1)**

Acrilamida 39% (p/v)

Bis-Acrilamida 1% (p/V)

Água destilada q.s.p.

A solução foi estocada a 4 °C.

- **5.1.4.12 Tampão Tris-HCl 1,0 M pH 6,8**

Trizma base 12,1 g

Água destilada 100 mL

O pH da solução foi acertado utilizando a solução de HCl (seção 5.1.4.9) e NaOH (seção 5.1.4.10). A solução foi estocada a 4 °C.

- **5.1.4.13 Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8**

Trizma base      18,2 g

Água destilada   100 mL

O pH da solução foi acertado utilizando a solução de HCl e NaOH quando necessário. A solução foi estocada a 4 °C.

- **5.1.4.14 Solução Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%**

SDS                              10 g

Água destilada (q.s.p.)   100 mL

A solução foi estocada a temperatura ambiente.

- **5.1.4.15 Persulfato de Amônia (PSA) 10%**

Persulfato de Amônia      10 g

Água destilada (q.s.p.)   100 mL

A solução foi estocada a -20 °C.

- **5.1.4.16 Acido tricloroacético (TCA) 100%**

Ácido tricloroacético      500 g

Água destilada (q.s.p.)   500 mL

Um volume de 10 mL de água destilada foi adicionado ao pote (antes lacrado) contendo 500 g de TCA. Devido ao fato de que este ácido é altamente higroscópico, esperou-se até que todo o conteúdo estivesse dissolvido. Após a dissolução total do ácido, o volume final foi completado para 500 mL. A solução foi estocada a -20 °C.

Atenção: Ácido extremamente forte e deve ser manuseado com extrema cautela e uso de luvas.

- **5.1.4.17 Solução carbonato de sódio 6%**

Carbonato de Sódio      6 g

Água destilada (q.s.p.)   100 mL

A solução foi estocada a temperatura ambiente.

- **5.1.4.18 Sorbitol 1M**

Sorbitol 18,21 g

Água destilada (q.s.p.) 100 mL

A solução foi estocada a 4 °C.

- **5.1.4.19 EDTA 100 mM, pH 8,0 (100x)**

EDTA (dissódico) 18,61 g

Água destilada (q.s.p.) 50 mL

OBS.: O EDTA só se dissolve em pH acima de 8,0. A solução foi estocada a 4 °C.

### 5.1.5 Soluções para extração de plasmídeos (mini-prep)

- **5.1.5.1 Tampão TE**

Tris-HCl 10 mM

EDTA 1 mM

O pH foi ajustado para 8,0. A solução foi estocada a 4 °C.

- **5.1.5.2 Solução II**

NaOH 0,2 M

SDS 1% (p/v)

Preparar soluções estoque de NaOH 0,4M e SDS 2%, misturando-as em volumes iguais no momento do uso.

- **5.1.5.3 Solução III**

Acetato de sódio ou potássio 5 M

O pH foi ajustado para 4,8. A solução foi estocada a 4 °C.

- **5.1.5.4 Acetato de Amônio 7,5M**

Acetato de Amônio 8,67 g

Água destilada 15 mL

A solução foi estocada a 4 °C.

### 5.1.6 Meios de Cultura

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos, a 120 °C e 1 atm.

- **5.1.6.1 Meio LB (Luria-Bertani)**

Extrato de Levedura 0,5% (p/v)

Peptona de caseína 1,0% (p/v)

NaCl 1,0% (p/v)

Água destilada q.s.p.

O pH foi ajustado para 7,2.

- **5.1.6.2 Meio SB**

Extrato de Levedura 2,0% (p/v)

Peptona de caseína 3,0% (p/v)

MOPS 1,0% (p/v)

Água destilada q.s.p.

O pH foi ajustado para 7,0.

- **5.1.6.3 Meio LA (LB ágar)**

Foi adicionado ágar bacteriológico 1,2% (p/v) ao meio LB.

- **5.1.6.4 Meio SOB (CALDO DE HANAHAN)**

Bacto-Triptona	20 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
NaCl	0,6 g/L
KCl	0,5 g/L
Água destilada	q.s.p.

O pH foi ajustado para 7,2.

- **5.1.6.5 Meio SOC (SOC Broth Base)**

Meio SOB (seção 5.1.6.4)	100 mL
Glicose	20,0 mM
MgCl <sub>2</sub>	5,0 mM
MgSO <sub>4</sub>	5,0 mM

As soluções de glicose, MgCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub> foram esterilizadas por filtração em membrana milipore 0,22  $\mu$ m.

- **5.1.6.6 Meio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose)**

Extrato de Levedura	1,0% (p/v)
Peptona de caseína	2,0% (p/v)
Glicose(Dextrose)	2,0% (v/v)
Água destilada	q.s.p.

Este meio foi estocado a temperatura ambiente.

- **5.1.6.7 Meio MD-Ágar (Minimal Dextrose)**

YNB	1,34% (v/v)
Dextrose	1% (v/v)
Biotina	4 x 10 <sup>-5</sup> % (v/v)
Ágar	1,5% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

Este meio foi estocado a 4 °C.

- **5.1.6.8 Meio BMG/BMM (Buffered Minimal Glycerol/Buffered Minimal Methanol)**

YNB (seção 5.1.4)	1,34% (p/v)
Fosfato de potássio 1M pH 6,0 (seção 5.1.4.7)	100 mM
Biotina	$4 \times 10^{-5}\%$ (v/v)
Ampicilina	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Glicerol/metanol	(1%)/(1%)(v/v)

Estes meios podem ser estocados a 4 °C por aproximadamente dois meses.

- **5.1.6.9 Meio BMGY-U / BMMY-U (Buffered Glycerol Complex Medium/Buffered Methanol Complex Medium)**

Ureia	1,34% (p/v)
Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Fosfato de potássio 1M pH 6,0 (seção 5.1.4.7)	100 mM
Biotina	$4 \times 10^{-5}\%$ (v/v)
Ampicilina	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Glicerol/metanol	(1%)/(0,5%)(v/v)
Água destilada	q.s.p.

Estes meios podem ser estocados a 4 °C por aproximadamente dois meses.

### 5.1.7 Soluções utilizadas nos ensaios enzimáticos

- **Solução de ácido dinitrosalicílico (DNS)**

Ácido 3,5-Dinitrosalicílico	7,5 g
NaOH	14 g
Tartarato de Sódio e Potássio	216,1 g
Fenol	5,4 mL
Metabissulfito de Sódio	5,8 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Inicialmente, o DNS e o NaOH foram dissolvidos em água destilada. Posteriormente adicionou-se o tartarato de sódio e potássio, o fenol pré-aquecido a 50 °C e o

metabissulfito de sódio. A solução final foi titulada um dia após o preparo com HCl 0,1 M (seção 5.1.4.9), utilizando fenolftaleína como indicador. Deverá ser gasto um volume de 5 a 6 mL de ácido. Para cada 1 mL de ácido gasto a menos, foi adicionado 2g de NaOH para corrigir o pH da solução.

- **5.1.7.1 Tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8**

Ácido Cítrico 0,1M	230 mL
Citrato Trisódico 0,1M	270 mL
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

- **5.1.7.2 Solução de celulose CMC 4%**

Carboxi Metil Celulose	4% (p/v)
Tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8	q.s.p.

Aquecer a mistura em microondas por 3 min e posteriormente submetida a centrifugação a 3000 x g por 15 min. O sobrenadante foi estocado a -20 °C.

- **5.1.7.3 Solução de xilana 1%**

xilana "beech wood" (Sigma)	1% (p/v)
Tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8	q.s.p.

A xilana foi dissolvida em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 5.1.7.1 após aquecimento da solução em micro-ondas durante 1 min, agitação manual e repouso durante 1 min. Este procedimento foi repetido três vezes, e logo após a solução foi submetida a centrifugação a 5.000 x g durante 10 minutos e o sobrenadante foi estocado a -20 °C e utilizado para a dosagem da atividade enzimática.

### 5.1.8 Solução utilizada nos ensaios de dosagem proteica.

- **Reagente de Bradford**

Azul de coomassie G-250	100 mg
Etanol	50 mL
Ácido Fosfórico	100 mL
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Dissolveu-se o azul de coomassie em etanol sob agitação magnética durante 1 h, após esse período acertou-se o volume de etanol para 50 mL. Adicionou-se então a água e o ácido fosfórico. A solução obtida foi filtrada duas vezes em papel de filtro.

### 5.1.9 Soluções utilizadas nos ensaios de eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida.

- **Gel concentrador (4%)**

Acrilamida/Bis 39:1 (seção 5.1.4.11)	240 $\mu$ L
Tris HCl 1M pH 6,8 (seção 5.1.4.12)	300 $\mu$ L
Água destilada	1,57 mL
SDS 10% (seção 5.1.4.14)	240 $\mu$ L
Persulfato de amônio 10% (PSA) (seção 5.1.4.15)	48 $\mu$ L
Temed	3,6 $\mu$ L

- **5.1.9.1 Gel separador (13%)**

Acrilamida/Bis (39:1) (seção 5.1.4.11)	2,73 mL
Tris HCl 1,5M pH 8,8 (seção 5.1.4.13)	2,1 mL
Água destilada	2,48 mL
SDS 10% (seção 5.1.4.14)	840 $\mu$ L
Persulfato de amônio 10% (PSA) (seção 5.1.4.15)	168 $\mu$ L
Temed	8,4 $\mu$ L

- **5.1.9.2 Tampão de amostra**

Tris-HCL 1M pH 6,8 (seção 5.1.4.12)	2 mL
SDS 10% (seção 5.1.4.14)	4 mL
$\beta$ -Mercaptoetanol	2 mL
Glicerol	2 mL
Azul de bromofenol	0,01 g

Este tampão foi alíquotado e armazenado a -20 °C.

- **5.1.9.3 Tampão de corrida - Tris-Glicina 5X**

Trizma base	15,1 g
Glicina	72 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Este tampão foi armazenado a temperatura ambiente.

- **5.1.9.4 Tampão de corrida - Tris-Glicina 1X**

Tampão de corrida Tris-Glicina 5X (seção 5.1.9.3)	160 mL
SDS 10% (seção 5.1.4.14)	8 mL
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Este tampão foi armazenado a temperatura ambiente.

- **5.1.9.5 Marcador de Massa Molecular para Proteínas 1**

Marcador Broad Range Marker da Saint Cruz Biotechnology (part number sant-sc-2361).

Miosina	200 kDa
Fosforilase B	97 kDa
Soroalbumina bovina	66 kDa
Ovalbumina	44 kDa
Anidrase carbônica	29 kDa
Mioglobina	17 kDa
Lisozima	14 kDa
Aprotinina	6 kDa

Este marcador deve armazenado a -20 °C.

- **5.1.9.6 Marcador de Massa Molecular para Proteínas 2**

Marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific part number 26610). Contendo uma concentração de 0,1 a 0,2 mg/mL das proteínas listadas abaixo.

$\beta$ -Galactosidase	116 kDa
Soroalbumina bovina	66,2 kDa
Ovalbumina	45,0 kDa
Dehidrogenase lactante	35,0 kDa
REase Bsp981	25,0 kDa
$\beta$ -Lactoglobulina	18,4 kDa
Lisozima	14,4 kDa

Este marcador foi armazenado a -20 °C.

### 5.1.10 Soluções utilizadas nos ensaios de eletroforese em gel de agarose.

- **Solução de Brometo de Etídio**

Brometo de Etídio 1% (p/v)

Água destilada q.s.p.

A solução foi estocada aliqotada e estocada em eppendorfs a temperatura ambiente.

- **5.1.10.1 Tampão de corrida - TEB (10x)**

Tris-base 0,89 M

Ácido bórico 0,89 M

EDTA 0,08 M

Água destilada q.s.p.

Este tampão foi armazenado a temperatura ambiente.

- **5.1.10.2 Tampão de amostra para DNA (10x)**

TEB (20x) 50% (v/v)

Glicerol 30% (v/v)

Azul de bromofenol 0,25% (p/v)

Xilenocianol 0,25% (p/v)

Água destilada q.s.p.

Este tampão foi armazenado a temperatura ambiente.

- **5.1.10.3 Marcador de DNA**

Marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (concentração de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Thermo Scientific part number SM1333).

Fragmentos de DNA (pb)	ng/0,5 $\mu\text{L}$	%
20.000	20	4
10.000	20	4
7.000	20	4
5.000	75	15
4.000	20	4
3.000	20	4
2.000	20	4
1.500	80	16
1.000	25	5
700	25	5
500	75	15
400	25	5
300	25	5
200	25	5
75	25	5

Este marcador foi armazenado a -20 °C.

### 5.1.11 Soluções utilizadas para revelação de géis desnaturantes de poliacrilamida - Azul de coomassie.

- **Solução Corante**

Azul de coomassie R250	0,5 g
Metanol	225 mL
Ácido acético glacial	50 mL
Água destilada (q.s.p.)	500 mL

Esta solução foi armazenada a temperatura ambiente.

- **5.1.11.1 Solução descorante**

Metanol (99,8%)	150 mL
Ácido acético glacial (99,7%)	35 mL
Água destilada (q.s.p.)	500 mL

Esta solução foi armazenada a temperatura ambiente.

### 5.1.12 Soluções utilizadas para revelação de géis desnaturantes de poliacrilamida - Nitrato de prata.

- **Solução de fixação**

Metanol (99,8%)	250 mL
Ácido acético Glacial (99,7%)	60 mL
Formaldeído (36,5 a 38,0%)	500 $\mu$ L
Água destilada (q.s.p.)	500 mL

Esta solução foi armazenada a temperatura ambiente.

- **5.1.12.1 Solução de lavagem**

Etanol (99,8%)	250 mL
Água destilada (q.s.p.)	500 mL

Esta solução foi armazenada a temperatura ambiente.

- **5.1.12.2 Solução de tratamento**

Tiosulfato de Sódio	20 mg
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

Esta solução foi armazenada a temperatura ambiente.

- **5.1.12.3 Solução de equilíbrio**

Nitrato de prata	0,2 g
Formaldeído (36,5 a 38,0%)	75 $\mu$ L
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

Esta solução foi armazenada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

- **5.1.12.4 Solução de revelação**

Solução carbonato de sódio 6% (seção 5.1.4.17)	98 mL
Solução de tratamento (seção 5.1.12.2)	2 mL
Formaldeído (36,5 a 38,0%)	50 $\mu$ L

Esta solução foi preparada no momento do uso (não deve ser armazenada).

- **5.1.12.5 Solução de parada**

Metanol (99,9%)	250 mL
Ácido Acético Glacial (99,7%)	60 mL
Água destilada (q.s.p.)	500 mL

Esta solução foi armazenada a temperatura ambiente.

### **5.1.13 Kits de uso específico em Biologia Molecular**

Eluição do DNA do gel de agarose: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation®, número de catálogo: A9381).

## **5.2 Métodos**

### **5.2.1 Cultivo e manutenção de microrganismos**

As bactérias foram cultivadas a temperatura de 37 °C em meio LB por 16 horas. As linhagens da levedura *P. pastoris* foram cultivadas em meio YPD ágar a 30 °C por 3 dias e estocadas a 4 °C. A cada 90 dias foi realizado um novo repique.

### 5.2.2 Digestão de DNA com endonucleases

As digestões de DNA com enzimas de restrição foram realizadas em sistemas de 10 a 300  $\mu\text{L}$ , durante 1 a 8 h (estipulados de acordo com a quantidade de DNA a ser digerido). Os tampões e as temperaturas de reação foram utilizadas de acordo com as indicações dos fabricantes, utilizando-se 10 a 20 U de enzima para cada micrograma de DNA a ser digerido.

### 5.2.3 Preparação de células bacterianas competentes para eletroporação

O preparo de células de *E. coli* competentes pelo método de eletroporação foi realizado como descrito por Sambrook e Russel [99] (com modificações realizadas por Maranhão [101]). As células foram eletroporadas utilizando o aparelho GenePulser da (Bio-Rad).

A linhagem bacteriana de interesse foi inoculada em 10 mL de meio SB (seção 5.1.6.2) e incubada a 37 °C por aproximadamente 18 h sob agitação de 250 rpm. Um volume de 0,5 mL dessa cultura foi diluído em 500 mL de meio SB em um frasco de 1 L, acrescido de 2,5 mL de  $\text{MgCl}_2$  2 M e 2,5 mL de glicose 2 M, seguindo-se de incubação nas mesmas condições descritas anteriormente até que atingisse uma densidade óptica (DO) a 600 nm de 0,7 a 0,9. Após atingir essa  $\text{DO}_{600}$  o frasco foi resfriado em gelo e a cultura foi submetida a centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4 °C. A seguir, as células foram lavadas em 25 mL de glicerol 10% (v/v) gelado, usando pipetas pré-resfriadas, e posteriormente foi adicionado 75 mL de glicerol 10%, seguido de centrifugação por 20 min a 4 °C e aceleração de 3.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem com glicerol, repetido. Em seguida, as células foram ressuspensas em 25 mL de glicerol, transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugadas a 3.000 x g por 20 min a 4 °C. Ao final, as células foram ressuspensas em 1 a 2 mL de glicerol 10% e distribuídas em alíquotas de 50  $\mu\text{L}$ , as quais foram congeladas em nitrogênio líquido, com posterior estocagem a -80 °C. Estas células assim preparadas foram então consideradas competentes para os procedimentos de transformação por eletroporação.

### 5.2.4 Transformação de células de *E. coli* por eletroporação

Para a transformação 50  $\mu\text{L}$  do volume estocado de células competentes foram homogeneizadas com 1  $\mu\text{L}$  do DNA plasmidial (utilizando o vetor de expressão pHIL-D2 intacto com o inserto do cDNA de interesse), ou 3 a 5  $\mu\text{L}$  do sistema de ligação e transferidas rapidamente para uma cubeta previamente resfriada para a realização do choque elétrico, que foi realizado seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 24  $\mu\text{F}$  e 200  $\Omega$ . Imediatamente após a eletroporação as células foram ressuspensas em meio SOC (seção 5.1.6.5), adicionando 1 mL de meio 3 vezes à cubeta. Em seguida, as células foram incubadas em um tubo estéril de 50 mL por 1 hora a 37 °C, sob agitação de 250 rpm. Um volume de 50 a 200  $\mu\text{L}$  desta solução foi inoculado em placas de Petri contendo 20 mL de meio LA (seção 5.1.6.3) e o antibiótico adequado.

### 5.2.5 Mini-Preparação de Plasmídeos por Lise Alcalina

O DNA plasmidial foi isolado a partir de uma colônia da linhagem bacteriana de interesse. A linhagem foi inoculada em 5 mL de meio LB (seção 5.1.6.1) contendo ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Esse inóculo foi incubado a 37 °C por aproximadamente 16 h. Um volume de 3 mL de cultura foi submetido a centrifugação a 3.000 x g por 2 min a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de Tampão TE (seção 5.1.5.1) e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Após total ressuspensão das células, foi adicionado 360  $\mu\text{L}$  de Solução II (seção 5.1.5.2) agitando-se o tubo gentilmente por inversão e incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  de Solução III (seção 5.1.5.3), a suspensão foi homogeneizada com agitação forte e incubada a temperatura ambiente novamente por 5 minutos, posteriormente esta foi submetida a centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 750  $\mu\text{L}$  de isopropanol, homogeneizado por inversão e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Após homogeneização, a mistura foi submetida a centrifugação a 10.000 x g por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi novamente submetido a centrifugação a 10.000 x g por 5 segundos, o álcool restante foi removido com micropipeta. O precipitado foi ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de Tampão TE (seção 5.1.5.1) e logo após foi adicionado 110  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 7,5 M (seção 5.1.5.4), esta mistura foi

submetida a agitação forte (vortex) e submetida a centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo onde foram adicionados 750  $\mu\text{L}$  de etanol 100% e submetida a centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi então descartado, o excesso de álcool removido, e o precipitado foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos para secar. O precipitado, correspondendo ao DNA plasmidial, foi então ressuscitado em 50  $\mu\text{L}$  de Tampão TE (seção 5.1.5.1) + RNase (1  $\mu\text{L}$  da solução estoque de RNase para cada 100  $\mu\text{L}$  de TE).

### 5.2.6 Maxi-Preparação de Plasmídeos por Lise Alcalina

Foi utilizado o kit de purificação de DNA ThePureLink®Plasmid Filter Maxiprep Kit da Life technologies (número de catálogo K2100-16).

### 5.2.7 Preparo de Células Competentes de *P. pastoris*

As células das linhagens de *P. pastoris* foram inoculadas em 10 mL de meio YPD (seção 5.1.6.6) em erlenmeyer de 125 mL de capacidade e incubada a 30 °C por 24 h sob agitação de 200 rpm. Após este período, 50  $\mu\text{L}$  do pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio YPD em erlenmeyer de 0,5 L e incubado sob as mesmas condições do pré-inóculo até atingir a  $\text{DO}_{600}$  entre 1,3 a 1,5. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação a 1.500 g por 5 min a 4 °C e ressuspensas em 250 mL de água destilada estéril gelada. Seguidamente foram submetidas a centrifugação nas mesmas condições anteriores e ressuspensas em 125 mL de água destilada estéril gelada. As células foram submetidas a centrifugação e ressuspensas em 10 mL de sorbitol 1 M gelado (seção 5.1.4.18), posteriormente foram submetidas a centrifugação e ressuspensas novamente em 1 mL de sorbitol 1 M gelado para um volume final de aproximadamente 1,5 mL. As células competentes foram utilizadas imediatamente na transformação, pois apesar das células poderem ser congeladas, sua eficiência diminuiu significativamente.

### 5.2.8 Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose

Após digestão dos plasmídeos dos produtos da maxi-preparação com as enzimas de restrição apropriadas, os fragmentos de DNA contendo as sequências de interesse foram aplicados em gel de agarose e submetidos a eletroforese. Os fragmentos de DNA foram recortados do gel de agarose e purificados utilizando-se o kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), conforme as especificações do fabricante.

### 5.2.9 Precipitação de DNA

Aos fragmentos de DNA, obtidos na purificação, foi adicionado 0,3 M acetato de sódio, 2,5 volumes de etanol 100% gelado, procedendo-se a incubação a -20 °C durante 18 horas. Posteriormente, as amostras foram submetidas a centrifugação a 12.000 x g, por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, adicionou-se 1 mL de etanol 70% gelado. Foi realizada nova centrifugação a 4.000 x g por 5 minutos, sendo o sobrenadante novamente descartado. O precipitado foi seco, ressuspenso em 10 µL de água MilliQ contendo RNase e estocado no freezer a -20 °C.

### 5.2.10 Transformação de Células de *P. pastoris* por Eletroporação

A transformação da levedura *P. pastoris* foi realizada utilizando o fragmento de DNA precipitado de acordo com a seção 5.2.9. Foram utilizados 80 µL da solução contendo as células das linhagens de *P. pastoris* competentes foram homogeneizadas com 10 µg de DNA em 10 µL de Tampão TE (seção 5.1.5.1). A mistura foi transferida para uma cubeta e incubada em gelo por 5 min. As células foram submetidas a eletroporação de acordo com os seguintes parâmetros: 1,5 kV, 25 µF e 400 Ω. Imediatamente foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M gelado (seção 5.1.4.18), e o conteúdo da cubeta foi transferido para um tubo do tipo eppendorf. Um volume de 50-300 µL foi semeado em placas de Petri contendo meio MD e o cultivo ocorreu a 30 °C por 3 a 4 dias.

### 5.2.11 Seleção dos Transformantes Produtores de CBH1.2r

Os transformantes de *P. pastoris* de ambas as linhagens obtidas na transformação foram selecionadas inoculando as leveduras em meio líquido BMG (seção 5.1.6.8) em

placas do tipo Deep well (placa de 96 poços com fundo redondo) e incubadas por quatro dias a 30 °C. Após este período as células foram submetidas a centrifugação por 15 min a 3000 x g e ressuspensas em meio BMM (seção 5.1.6.8), sendo posteriormente incubadas por três dias a 30 °C para a indução da produção da enzima recombinante na presença de metanol, sendo que a cada 24 h foi acrescentado metanol para uma concentração final de 0,5%. Após três dias o sobrenadante foi coletado e realizado o ensaio de atividade enzimática pelo método DNS. Os transformantes que produziram uma quantidade maior de enzimas ativas foram selecionados e testados quanto a capacidade de produção da enzima em frascos erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 100 mL de meio BMGY-U (seção 5.1.6.9) como pré-inóculo. As culturas foram incubadas a 30 °C com agitação constante de 200 rpm até atingirem a DO<sub>600</sub> de 20. As células foram submetidas a centrifugação a 3000 x g durante 15 min, lavadas com água destilada estéril e ressuspensas no meio BMMY-U (seção 5.1.6.9). As colônias foram incubadas a 30 °C durante seis dias, sendo que a cada 24 h foi acrescentado metanol para uma concentração final de 0,5%, e retiradas alíquotas de 1 mL. As alíquotas foram submetidas a centrifugação a 10.000 x g durante 10 min e o sobrenadante coletado para análise de atividade enzimática (DNS). Dessa forma foi selecionado o transformante que produziu maiores níveis da atividade enzimática (seção 5.1).

### 5.2.12 Produção das enzimas CBH1.2r e HXYN2r em frasco

Os transformantes de *Pichia pastoris* produtores das enzimas CBH1.2r e HXYN2r foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio YPD (seção 5.1.6.6) a 30 °C por 3 dias e logo após estocadas a 4 °C. Do estoque em meio YPD os clones foram inoculados em placas de petri contendo o meio MD (seção 5.1.6.7) e incubadas a 30 °C por 3 dias (Figura 5.2).

Foram selecionadas colônias isoladas e inoculadas em 100mL de meio BMGY-U (seção 5.1.6.9) em erlenmeyer de 0,5 L (em triplicata) e incubadas a 30 °C sob constante agitação de 200 rpm até atingir OD<sub>600</sub> entre 1 e 1,5 (OD<sub>600</sub>=1 equivale a 5.10<sup>8</sup> células/mL). Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 20 min a 4 °C, ressuspensas em água destilada estéril para lavagem e submetidas a centrifugação nas mesmas condições supra citadas. O sobrenadante foi descartado e as

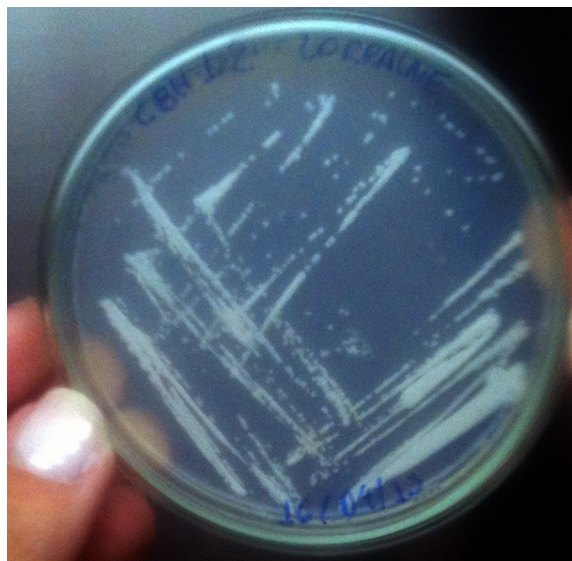


Figura 5.2: Placa contendo os clones transformantes de *P. pastoris* produtores da enzima CBH1.2r após 3 dias de incubação a 30 °C em meio MD.

células ressuspensas em 100 mL de meio BMMY-U (seção 5.1.6.9). As culturas foram incubadas a 30 °C sob constante agitação de 200 rpm por 6 dias. A cada 24 h foi adicionado metanol (seção 5.1.4.3) para a concentração final de 1% ao meio de cultura. Os cultivos foram realizados em triplicata.

Após 6 dias a cultura foi submetida a centrifugação (4000 rpm por 20 min a 4 °C) e o sobrenadante de cultura foi armazenado em tubos falcons a -20 °C. O sobrenadante foi analisado quanto a atividade enzimática, dosagem de proteínas por reagente Bradford, e o perfil de proteínas por SDS-PAGE.

Na cinética de produção das enzimas recombinantes, os transformantes de *P. pastoris* foram cultivados sob indução com metanol como indicado anteriormente, entretanto foram retiradas alíquotas de 10mL a cada 24 h durante o crescimento no meio BMMY-U (seção 5.1.6.9). A cultura foi submetida a centrifugação a 4000 rpm por 20 min a 4 °C e o sobrenadante analisado quanto a atividade enzimática, dosagem de proteínas por reagente Bradford e o perfil de proteínas por SDS-PAGE.

### 5.2.13 Determinação da atividade celulolítica pelo método dos Açúcares Redutores

A atividade de endoglicanase foi realizada utilizando o substrato Carboxi metil celulose (CMC) e para a dosagem da atividade de endoxilanase utilizou a xilana. A

quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método de DNS proposto por Miller [102]. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como aquela que libera um  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor correspondente por minuto nas condições do experimento. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata.

Os ensaios utilizando CMC como substrato (CMCase) foram feitos preparando tubos de ensaio de acordo com a Tabela 5.1. Os ensaios utilizando Xilana como substrato foram feitos preparando tubos de ensaio de acordo com a Tabela 5.2.

Tabela 5.1: Dosagem de atividade celulolítica em CMC pela enzima CBH1.2r.

	Teste (Triplicata)	Branco do Teste (Triplicata)	Branco do aparelho (Triplicata)
Tampão citrato de sódio (50 mM pH 4,8) (seção 5.1.7.1)	—	—	500 $\mu\text{L}$
CMC 4% (seção 5.1.7.2)	250 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	—
Enzima	250 $\mu\text{L}$	—	—

Tabela 5.2: Dosagem de atividade xilanolítica em xilana pela enzima HXYN2r.

	Teste (Triplicata)	Branco do Teste (Triplicata)	Branco do aparelho (Triplicata)
Tampão citrato de sódio (50 mM pH 4,8) (seção 5.1.7.1)	—	—	500 $\mu\text{L}$
Xilana 1% (seção 5.1.7.3)	450 $\mu\text{L}$	450 $\mu\text{L}$	—
Enzima	50 $\mu\text{L}$	—	—

De forma simplificada, o método consiste das seguintes etapas:

Foram adicionados em tubos de ensaio os reagentes descritos nas Tabelas 5.1, sendo que o sobrenadante do meio contendo a enzima foi adicionado por último, pois logo após esse passo a reação inicia-se e os tubos são incubados imediatamente a 50 °C, por 1 hora no caso da atividade contra CMC e por 5 minutos no caso da atividade contra xilana.

Nesta fase, a enzima ativa quebra as ligações dos substratos liberando açúcares. Após uma hora de incubação, a reação foi parada com um choque térmico em banho de água e gelo durante 5 minutos.

Logo após a “parada” da reação, foram adicionados nos tubos nomeados “branco do teste” a quantidade de 250 $\mu$ L de enzima (sobrenadante do meio contendo a enzima) para atividade contra CMC, ou 50 $\mu$ L de enzima no caso de atividade contra xilana. Ainda neste mesmo momento, é adicionado a todos os tubos 500 $\mu$ L de solução DNS (seção 5.1.7) no caso de atividade contra CMC ou 750 $\mu$ L de DNS no caso de atividade contra xilana.

Todos os tubos foram fervidos por 5 minutos e novamente a reação deve ser parada com banho de água e gelo durante 5 minutos. Durante o período de fervura, o DNS irá agir “oxidando” e corando os açúcares liberados na reação <sup>1</sup>. Após este último banho em água e gelo, foi realizada a leitura do conteúdo dos tubos de ensaio em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 540 nm.

As curvas padrão para os testes de CMCase ou de atividade xilanólítica foram feitas todas as vezes que um novo reagente DNS era preparado, utilizando valores conhecido de glicose ou xilose. As curvas utilizadas para este trabalho foram estabelecidas da seguinte forma:

Curva para atividade contra CMC foi realizada utilizando-se glicose com concentrações variando de de 1 a 20  $\mu$ mol/mL. De modo que, uma das curvas padrão encontradas para glicose, com  $r=0,999$ , foi:

$$y = 1,054x + 0,162 \quad (5.1)$$

Curva padrão para atividade de endoxilanasase foi realizada utilizando-se xilose com concentrações variando de de 0,3 a 4,2 mg/mL. De modo que, uma das curvas padrão encontradas para xilose, com  $r = 0,999$ , foi:

$$y = 0,264x + 0,075 \quad (5.2)$$

onde, para ambas as curvas, a absorvância se encontra em  $x$  e a concentração já em U/mL se encontra em  $y$ .

---

<sup>1</sup>Segundo Miller, o tartarato duplo de sódio e potássio é introduzido para prevenir a dissolução do oxigênio no reagente, o fenol, para aumentar a quantidade de cores produzidas, e o metabissulfito de sódio e potássio, para estabilizar a cor obtida na presença do fenol. A base é necessária para reduzir a ação da glicose no ácido dinitrosalicílico [102].

### 5.2.14 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas das amostras (sobrenadantes dos meios de cultura) foi determinada por método colorimétrico conforme descrito por Bradford [103]. A curva de calibração padrão foi determinada utilizando-se a solução soroalbumina bovina (seção 5.1.4.8), nas concentrações 1:2, 1:2.5, 1:3.3, 1:5, 1:10, 1:20. Homogeneizou-se em mini-placas de elisa a quantidade de 190  $\mu\text{L}$  de Reagente Bradford (seção 5.1.8) e 10  $\mu\text{L}$  de amostra, que foi incubado a temperatura ambiente durante 15 min. A quantidade de proteínas foi determinada por leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Para o branco do aparelho foi utilizado água destilada no lugar da amostra.

A curva de Bradford obtida foi:

$$y = 0,9560x - 0,0008 \quad (5.3)$$

Sendo que a concentração é dada em unidade de  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Após esta quantificação, as mesmas amostras foram submetidas a análise de perfil de proteínas por eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida.

### 5.2.15 Eletroforese de ácidos nucléicos em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para avaliação da qualidade e quantificação do DNA e fragmentos [101]. A agarose foi preparada em concentrações de 1,0% (p/v) em tampão de corrida TEB 1X e contendo 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de brometo de etídio. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a eletroforese, como descrito por Sambrook e Russel [99]. Para visualização e foto-documentação do DNA utilizou-se a incidência de luz ultravioleta no sistema Gel Doc<sup>TM</sup> EZ System da Bio-Rad.

### 5.2.16 Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida, foi utilizado o método descrito por Laemmli [104]. As amostras foram preparadas de três formas diferentes, uma utilizando TCA (seção 5.1.4.16) como precipitante, outra utilizando a

amostra diretamente do sobrenadante do meio de cultura sem nenhum método de precipitação, e a última apenas ressuspendendo os sedimentos formados após etapas de purificação.

#### 5.2.16.1 Preparo de amostra por precipitação com TCA

Um volume de 900  $\mu\text{L}$  do sobrenadante do meio de cultura contendo as enzimas foi precipitado na presença de 100  $\mu\text{L}$  de TCA (seção 5.1.4.16) permanecendo em banho de gelo e água por 1 hora. Em seguida a solução foi submetida a centrifugação a 10.000 x g a 4 °C durante 10 minutos. O precipitado foi lavado com 500 $\mu\text{L}$  de acetona gelada e submetido a centrifugação nas mesmas condições descritas acima. Este processo de lavagem foi repetido 1 vez. O sedimento restante foi então ressuspensado em 30  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (seção 5.1.9.2) e fervido durante 5 min. As amostras preparadas foram então estocadas a -20 °C para posteriormente serem aplicadas no gel de poliacrilamida desnaturante.

#### 5.2.16.2 Preparo de amostra sem precipitação

Um volume de 15  $\mu\text{L}$  do sobrenadante do meio de cultura foi homogeneizado com 15 $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (seção 5.1.9.2) e fervido por 5 minutos. As amostras preparadas foram então estocadas a -20 °C para posteriormente serem aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante.

#### 5.2.16.3 Preparo de amostra precipitada em solução de sulfato de amônio.

O sedimento restante da centrifugação após adição de sulfato de amônio foi ressuspensado em 30  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra. As amostras preparadas foram então estocadas a -20 °C para posteriormente serem aplicadas no gel de poliacrilamida desnaturante.

#### 5.2.16.4 Corrida eletroforética

Todas as corridas foram conduzidas em tampão de corrida 1X (seção 5.1.9.4) com uma voltagem inicial de 80 V e final de 180 V utilizando o sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad®).

Após a corrida dos géis os mesmo foram revelados ou por método de coloração com azul de Coomassie ou por método de coloração com nitrato de prata, de acordo com a necessidade.

#### **5.2.16.5 Revelação das Proteínas por Coloração com Azul de Coomassie**

A revelação do gel desnaturante de poliacrilamida foi realizada segundo o método descrito por Groth [105]. Após a corrida eletroforética as bandas proteica presentes no gel foram reveladas após incubação do gel por 12 h em solução corante de azul de coomassie (seção 5.1.11) e em seguida pela descoloração incubando o gel por 4 h em solução descorante de azul de coomassie (seção 5.1.11.1), trocando a solução assim que mesma tornava-se escura.

#### **5.2.16.6 Revelação das Proteínas por Coloração com Nitrato de Prata**

Ao término da corrida, as bandas proteicas presentes no gel foram reveladas utilizando-se o método descrito por Blum [106]. O gel foi incubado sob agitação por 1 h na solução fixadora, em seguida lavado 3 vezes com solução de lavagem por 10 min cada vez. Após as lavagens o gel foi incubado na solução de tratamento por 30 segundos, lavado 3 vezes com água destilada durante 10 segundos cada uma e, em seguida, incubado por 10 min na solução de equilíbrio. Novamente o gel foi lavado com água destilada por duas vezes de 10 segundos cada e revelado com a solução de revelação. A reação foi interrompida após o aparecimento das bandas, transferindo-se o gel para a solução de parada.

#### **5.2.17 Purificação através da precipitação de proteínas em sais neutros.**

O processo de purificação através da precipitação em sais neutros ocorre basicamente em duas etapas que são comumente descritas como “salting-in” e “salting-out”. Com a adição de pequenas quantidades de sais em uma solução, há o aumento da força iônica do sistema. Se esta solução contiver proteínas, as cargas provenientes da dissociação dos sais irão interagir com as proteínas diminuindo a interação entre as moléculas de proteína, aumentando assim sua solubilidade em meio aquoso. Esta etapa

é a chamada “salting-in”. Porém, este processo não ocorre indefinidamente. Com o aumento considerável da força iônica, a água apresenta maior tendência de solvatação de partículas menores, devido a este fato, as moléculas de água passam a interagir com os íons provenientes da dissociação dos sais que acabam abandonando as moléculas proteicas, diminuindo assim a solubilidade das proteínas em meio aquoso e conseqüentemente causando sua precipitação. Este fenômeno é o conhecido como “salting-out”. Este processo pode ser realizado com outros tipos de sais neutros, no entanto uma das características do sulfato de amônio é a alta taxa de aumento da força iônica, facilitando assim o processo de “salting-out”.

Isto posto, o experimento foi realizado adicionando-se inicialmente ao extrato enzimático (sobrenadante do meio de cultura) uma quantidade de 10% de seu volume de tampão Tris-HCl 1,0M pH 6,8. Logo após foi adicionado sulfato de amônio em frações de 10% do volume de extrato sob agitação lenta e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Esta etapa foi realizada até que se obtivesse amostras com as frações de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, e 80% de sulfato de amônio.

As amostras contendo as diversas frações de sulfato de amônio foram submetidas a centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante e o precipitado foram analisados em gel desnaturante de poliacrilamida.

Após esta primeira etapa, as amostras foram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida para definir o intervalo de sulfato de amônio onde ocorria a precipitação das proteínas. Para este intervalo encontrado, o processo de precipitação foi repetido no intuito de se refinar este intervalo para que um intervalo de fração de sulfato de amônio menor que 10% fosse encontrado.

### 5.2.18 Ensaios de cristalização

Os ensaios de cristalização foram realizados em duas etapas. Ensaio robótico para obtenção de condições iniciais de cristalização, e ensaio manual utilizando-se das condições onde foram encontrados os melhores cristais nos ensaios robóticos. Os ensaios robóticos foram realizados utilizando o método “sitting drop”, e os ensaios manuais, utilizando o método “hanging drop”.

Os primeiros ensaios robóticos foram realizados no laboratório de cristalografia do

Instituto de Física da Universidade de São Carlos em 14/07/2012 onde foram utilizados os kits Classic Suit I e II da Quiagen, SaltRx HT e PEGs Suit da Quiagen. Além destes, a amostra também foi enviada ao ROBOLAB - Laboratório Automatizado de Cristalização de Macromoléculas no Laboratório Nacional de Biociências - CNPEM/ABTLuS em Campinas-SP onde foram realizados os ensaios de cristalização utilizando-se dos kits Crystal Screen HT, JCSG+ Suite, PACT Suite, Precipitant Synergy, SaltRx HT e Wizard I&II em 22-03-13 onde permaneceram durante 55 dias.

Os ensaios manuais foram realizados utilizando-se da melhor condição de cristalização obtida nos ensaios robóticos. Foi também realizado ensaios de cristalização para a proteína Lisozima.

### 5.2.19 Coleta de dados por difração de raios X

A coleta de dados foi realizada utilizando-se o difratômetro Bruker KAPPA APEX DUO Diffractometer equipado com sistema de coleta em baixa temperatura. Tal infraestrutura encontra-se no laboratório de cristalografia do IF-UFG.

### 5.2.20 Resolução de estrutura

A estrutura da proteína foi resolvida com o pacote de softwares "Collaborative Computational Project No. 4 (CCP4) - Software for Macromolecular X-Ray Crystallography" [107, 108] e com o software Coot [109].

# Capítulo 6

## Resultados e Discussões

### 6.1 Expressão das proteínas

Em trabalhos anteriores, as enzimas Endoxilanase 2 (HXYN2) e Celobiohidrolase 1.2 (CBH1.2), ambas do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*, foram clonadas heterologamente na levedura *Pichia pastoris* (linhagem GS115) [110]. Para a expressão das enzimas, a levedura foi cultivada em frascos de 0,5 L, em meio contendo glicerol, até atingir OD<sub>600</sub> de 1,684 e 1,285, para HXYN2 e CBH1.2, respectivamente. Nesse momento, foi realizada a transferência das células para o meio de expressão (com adição de metanol a cada 24 horas), durante 6 dias.

Os sobrenadantes dos meios de cultura, contendo as enzimas recombinantes, foram analisados, em gel desnaturante de poliacrilamida, quanto ao perfil de proteínas. As Figuras 6.1 e 6.2 apresentam o perfil proteico, em função do tempo de expressão, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2. A Figura 6.3 apresenta o perfil proteico para a enzima HXYN2r. Em ambos os casos, nota-se que a maior parte do conteúdo proteico destas amostras consiste das proteínas de interesse.

O teor proteico das amostras dos sobrenadantes dos meios de cultura referentes a 24, 48, 96 e 144 horas de expressão foi aferido utilizando o método de Bradford, descrito na seção 5.2.14. As concentrações obtidas encontram-se nas tabelas 6.1 e 6.2.

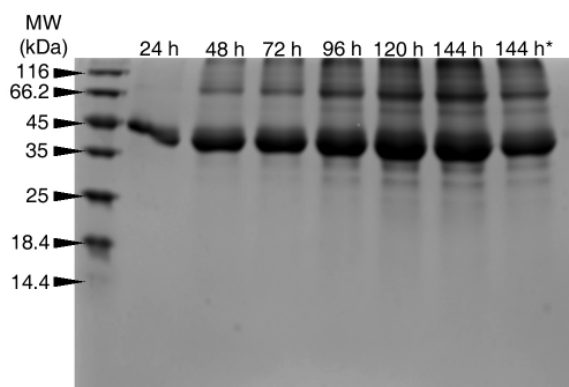


Figura 6.1: Perfil proteico, em função do tempo de expressão, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Amostras preparadas diretamente do sobrenadante. Gel corado com azul de coomassie.

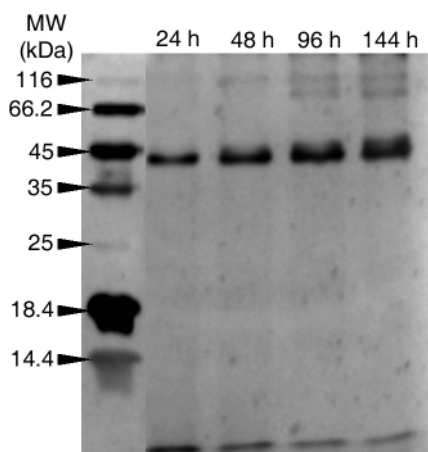


Figura 6.2: Perfil proteico, em função do tempo de expressão, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Amostras preparadas diretamente do sobrenadante. Gel corado com nitrato de prata.

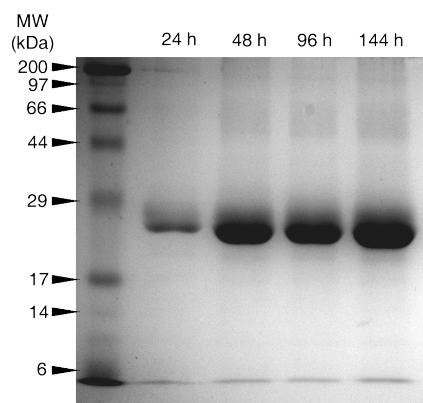


Figura 6.3: Perfil proteico, em função do tempo de expressão, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima HXYN2 do fungo *H. grisea*. Amostras preparadas com precipitante TCA. Gel corado com azul de coomassie.

Tabela 6.1: Concentrações totais de proteínas no sobrenadante de cultura após 24, 48, 96 e 144 horas de expressão para a enzima CBH1.2 (linhagem GS115). Quantificação via método de Bradford.

Tempo de Expressão	Concentração em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
24h	$0,06 \pm 0,01$
48h	$0,070 \pm 0,003$
96h	$0,094 \pm 0,007$
144h	$0,106 \pm 0,005$

Tabela 6.2: Concentrações totais de proteínas no sobrenadante de cultura após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de expressão para a enzima HXYN2 (linhagem GS115). Quantificação via método de Bradford.

Tempo de Expressão	Concentração em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
24h	$0,414 \pm 0,006$
48h	$0,482 \pm 0,005$
72h	$0,44 \pm 0,01$
96h	$0,443 \pm 0,007$
120h	$0,46 \pm 0,01$
144h	$0,46 \pm 0,03$

## 6.2 Dosagem da Atividade Enzimática

Os sobrenadantes dos meios de cultura para HXYN2r foram analisados quanto a atividade sobre xilana (atividade xilanolítica). Já os sobrenadantes para CBH1.2 foram analisados quanto a atividade sobre carboxi-metil-celulose (CMC) (atividade CMCCase). Em ambos os casos, foi utilizado o métodos dos açúcares redutores para realizar a quantificação dos açúcares liberados [102].

A Figura 6.4 mostra o perfil de atividade CMCCase, em função do tempo de expressão, para o sobrenadante do meio de cultura da levedura *P. pastoris* produtora da enzima CBH1.2 de *H. grisea*. Observa-se um máximo de atividade após 72 horas de expressão, sendo a atividade de  $0,39 \pm 0,05$  U/mL. Esse resultado é semelhante ao encontrado anteriormente para a expressão heteróloga em *P. pastoris* da mesma proteína [110].

A Figura 6.5 mostra o perfil de atividade xilanolítica, em função do tempo de expressão, para o sobrenadante do meio de cultura da levedura *P. pastoris* produtora da enzima XHYN2 de *H. grisea*. Nesse caso, foi obtido um pico de atividade após 48 horas de expressão, sendo a atividade de  $23,1 \pm 1,1$  U/mL.

Com base nos resultados apresentados acima, podemos concluir que as enzimas CBH1.2r e HXYN2r foram expressas biologicamente ativas e em quantidades satisfatórias

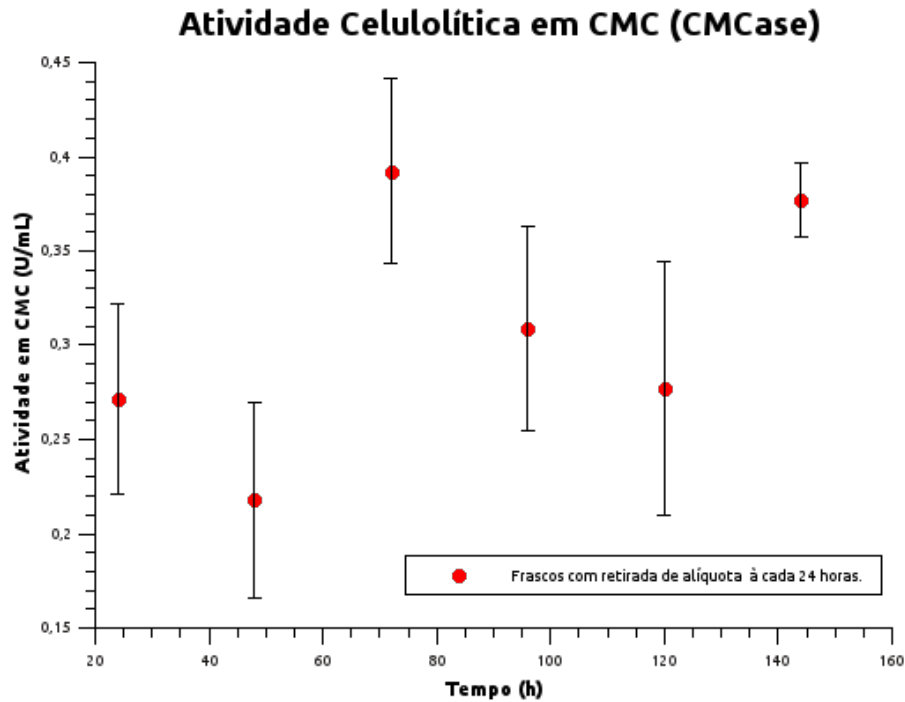


Figura 6.4: Perfil de atividade CMCase, em função do tempo de expressão, para o sobrenadante do meio de cultura da levedura *P. pastoris* (linhagem GS115) produtora da enzima CBH1.2 de *H. grisea*. Cultivo em meio BMMY-U a 30 °C e 200 rpm.

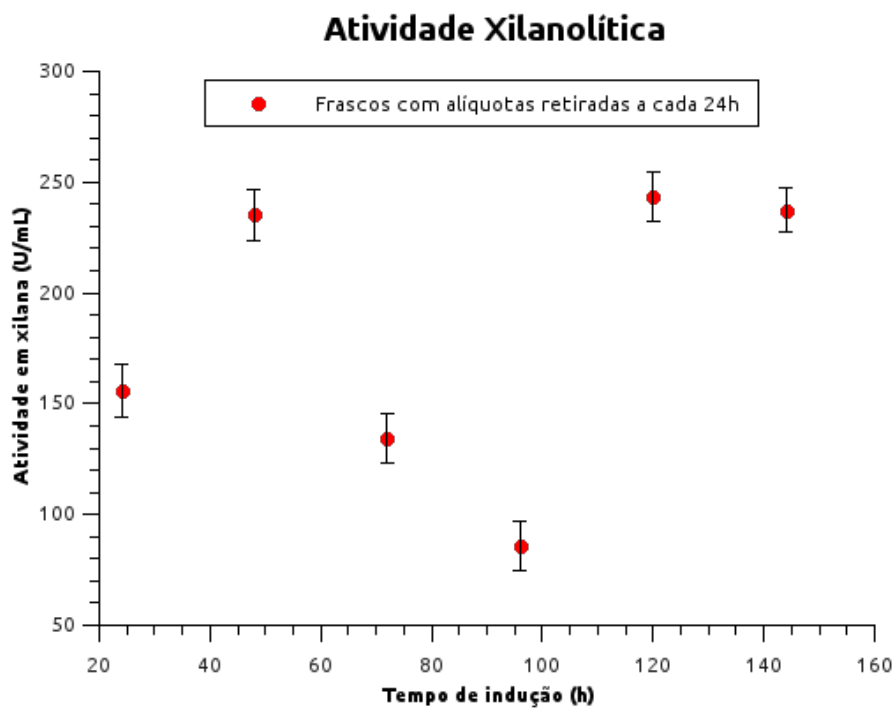


Figura 6.5: Perfil de atividade xilanolítica, em função do tempo de expressão, para o sobrenadante do meio de cultura da levedura *P. pastoris* (linhagem GS115) produtora da enzima HXYN2 de *H. grisea*. Cultivo em meio BMMY-U a 30 °C e 200 rpm.

para a realização dos ensaios seguintes.

### 6.3 Purificação das proteínas

Os ensaios de purificação foram realizados com intuito de estabelecer um protocolo de purificação para as proteínas em questão. A purificação por precipitação com sulfato de amônio tem as vantagens de remover resíduos de materiais insolúveis do extrato, concentrar soluções diluídas de proteínas, baixo custo e baixa toxicidade. Além disso, esse processo não altera a atividade proteica, ou seja, não desnatura as proteínas, mantendo a integridade estrutural das mesmas. A busca por um protocolo para purificação das proteínas foi realizada de acordo com o procedimento descrito na seção 5.2.17 para separar a proteína de interesse de possíveis contaminantes.

A Figura 6.6 mostra o perfil proteico, em função da concentração de sulfato de amônio, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2. A partir desta figura, nota-se que com 40% de sal já ocorre a precipitação das enzimas. A Figura 6.7 apresenta o perfil proteico do precipitado e do sobrenadante, para o intervalo de 30 a 40% de adição de sulfato de amônio, após centrifugação. Desta forma, as duas figuras deixam claro que com 30% de sal, a enzima CBH1.2 ainda está solúvel, mas, com 40% ocorre a precipitação. Para refinar esse intervalo, foi realizada a análise do perfil proteico, do precipitado e sobrenadante, para adições de 30, 33 e 36% de sulfato de amônio, (Figura 6.8).

Desta forma, fica então definido que o melhor intervalo de precipitação para a enzima CBH1.2r foi de 32 a 37% de sulfato de amônio em relação ao volume inicial de sobrenadante do meio de expressão para estas amostras.

De forma similar, ensaios de precipitação por sulfato de amônio para a enzima HXYN2r foram realizados. A Figura 6.9 mostra o perfil proteico, em função da concentração de sulfato de amônio, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima HXYN2. Com 30% de sal, ocorre precipitação de grande parte da enzima do sobrenadante. Novamente, para refinar esse intervalo, a análise do perfil proteico, do precipitado e sobrenadante, para adições de 12, 14 e 24% de sulfato de amônio, foram realizadas (Figura 6.10). Assim, o melhor intervalo de pre-

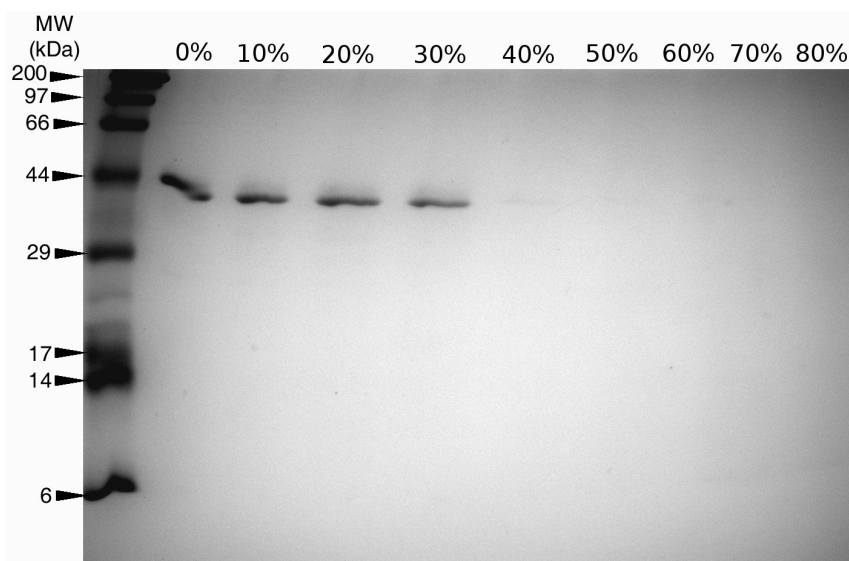


Figura 6.6: Perfil proteico, em função da concentração de sulfato de amônio, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Gel corado com azul de coomassie.

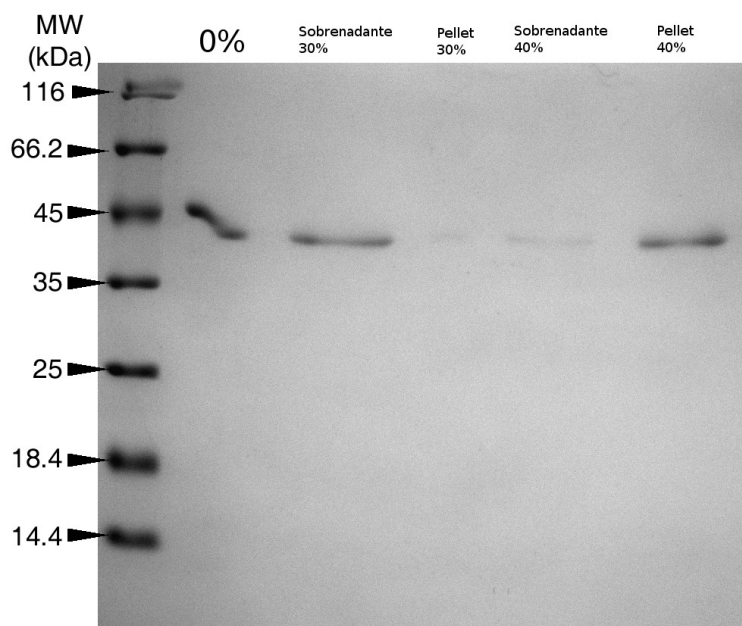


Figura 6.7: Perfil proteico do precipitado e sobrenadante, para adições de 30 e 40% de sulfato de amônio, após centrifugação do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Gel corado com azul de coomassie.

cipitação para a enzima HXYN2r nestas amostras foi de 14 a 24% de sulfato de amônio em relação ao volume inicial de sobrenadante do meio de expressão.

Além das tentativas de purificação por precipitação com sulfato de amônio, foram realizados ensaios de purificação da enzima HXYN2r utilizando membranas de ultrafiltração. Para isso, o sobrenadante de cultura foi primeiramente submetido a centrifugação

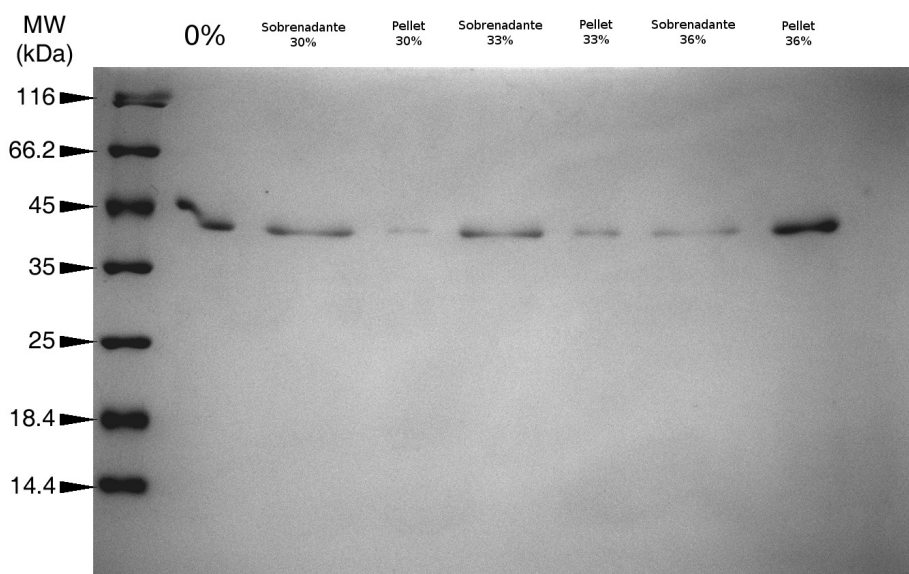


Figura 6.8: Perfil proteico do precipitado e sobrenadante, para adições de 30, 33 e 36% de sulfato de amônio, após centrifugação do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima CBH1.2 do fungo *H. grisea*. Gel corado com azul de coomassie.

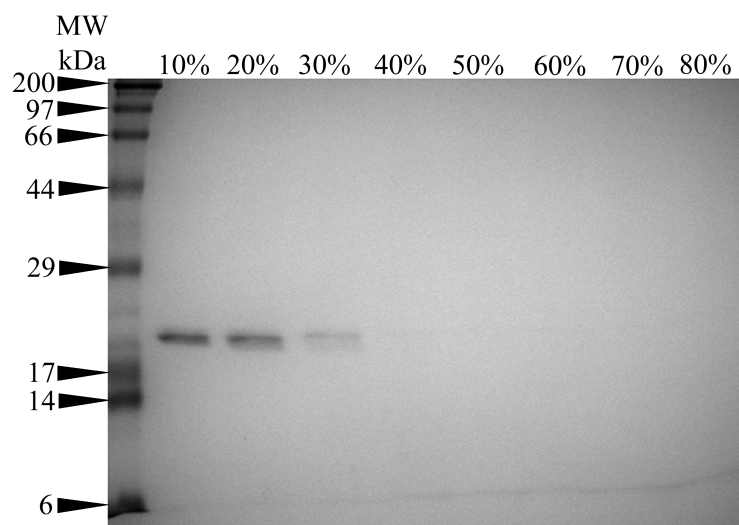


Figura 6.9: Perfil proteico, em função da concentração de sulfato de amônio, do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima HXYN2r do fungo *H. grisea*. Gel corado com azul de coomassie.

a 2.500 x g por intervalos de 10 em 10 minutos a 4 °C (até que todo o volume da amostra fosse filtrado) em membrana de ultrafiltração com corte de peso molecular de 30 kDa. Posteriormente, o mesmo processo foi repetido utilizando membrana com corte de peso molecular de 10 kDa. Nessa última etapa, além de purificar a amostra a mesma também era concentrada. A figura Figura 6.11 apresenta uma amostra da enzima HXYN2r no concentrador de corte de peso molecular de 10 kDa, a solução concentrada apresenta

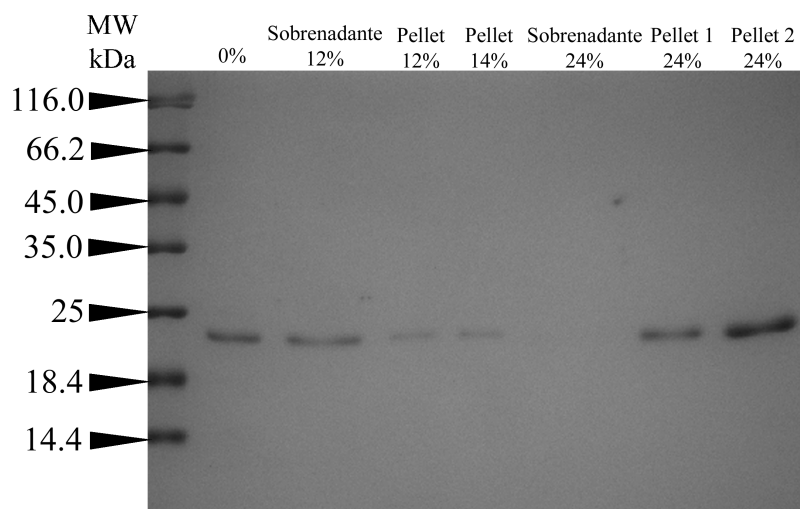


Figura 6.10: Perfil proteico do precipitado e sobrenadante, para adições de 12, 14 e 24% de sulfato de amônio, após centrifugação do sobrenadante de cultura da linhagem GS115 da levedura *P. pastoris* contendo o cDNA da enzima HXYN2 do fungo *H. grisea*. Gel corado com azul de coomassie.

coloração mais escura. O perfil proteico, em gel desnaturante, desse procedimento para HXYN2r pode ser visto na Figura 6.12.

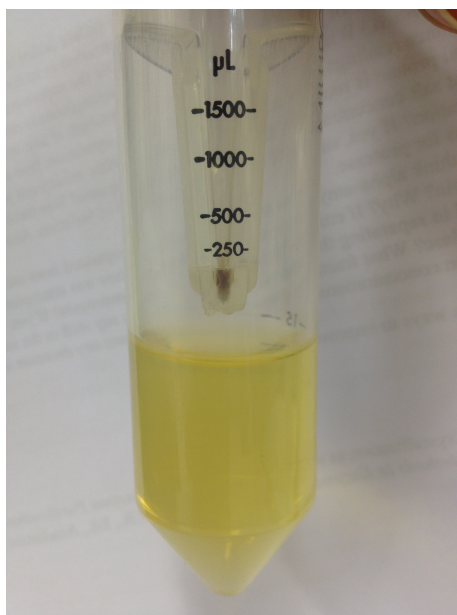


Figura 6.11: Amostra da enzima HXYN2r no concentrador com corte de peso molecular de 10 kDa de corte. Vemos que a solução proteica concentrada apresenta coloração mais escura.

Este último resultado mostra que a utilização de membranas de ultrafiltração fornecem uma quantidade satisfatória de enzima com pureza suficiente para a realização de ensaios de cristalização.