

**PROJETO DE PESQUISA– Estudo de corantes metálicos para utilização em microscopia eletrônica de varredura para proteínas pequenas**  
**PESQUISADOR RESPONSÁVEL – Dr. Jefferson Bettini**  
**INSTITUIÇÃO SEDE – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais / Laboratório Nacional de Luz Síncrotron / Laboratório de Microscopia Eletrônica (CNPEM / LNLS / LME).**

Recentemente os equipamentos de microscopia eletrônica de transmissão alcançaram a resolução de 0,5 Å, este fato ocorreu devido à correção da aberração esférica das lentes eletromagnéticas cilíndricas através de corretores multipolares [1]. Apesar deste fato, a resolução máxima alcançada para amostras biológicas, utilizando a metodologia de partícula única é de 3,3 Å [2]. Existem vários fatores físicos limitantes para que isto ocorra, o principal deles é que amostras biológicas sofrem ionização quando expostas ao feixe de elétrons, por esta razão imagens biológicas são obtidas com baixa dose e conseqüentemente o contraste destas imagens é extremamente reduzido quando comparado a imagens obtidas em materiais. O contraste em imagens de microscopia eletrônica de transmissão é obtido através da mudança da amplitude e fase da onda plana incidente [3], macromoléculas biológicas são perfeitos objetos de fase, elas são visualizadas pelo contraste de fase, em criomicroscopia eletrônica convencional o contraste de fase é gerado principalmente pela desfocalização da macromolécula biológica [4]. Apesar deste processo funcionar muito bem para materiais, este processo possui fatores limitantes para amostras biológicas, tais como, baixíssimo contraste e incompleta transferência da informação do objeto para altas resoluções. Estes fatores reduzem drasticamente a possível resolução tridimensional da macromolécula reconstruída. Além disso, o contraste tem uma dependência inversa com a massa da proteína, ou seja, quanto menor a massa da proteína menor ser seu contraste na imagem, tornando praticamente impossível o uso de criomicroscopia para proteínas pequenas (<200KDa). Neste caso, utilizam-se corantes metálicos (ex: acetato de uranila, molibdato de amônia e fosfato de tungstênio), os quais permitem a visualização não da proteína especificamente, mas sim da falta de material metálico no espaço em que a proteína ocupa, isto porque o corante é composto por grãos

nanométricos e estes grãos recobrem a superfície da proteína. Os grãos nanométricos dos corantes são da ordem de 2 nm e por este motivo a resolução do modelo tridimensional da proteína fica limitada para valores maiores que 2 nm.

Outro modo de aumentar o contraste de imagens de proteína é utilizar a microscopia eletrônica de varredura em transmissão em baixa voltagem em campo escuro, isto porque a interação dos elétrons com a matéria aumenta com a redução da voltagem de aceleração e imagens obtidas em campo escuro reduzem significativamente o espalhamento difuso causado pelo feixe transmitido. A resolução de microscopia eletrônica de varredura em transmissão em baixa voltagem para nosso laboratório é de 0,8 nm.

Neste contexto, o objetivo deste projeto é propor e estudar o uso de corantes metálicos na tentativa de encontrar grãos menores que dois nanômetros para aumentar a resolução do modelo tridimensional da proteína obtida através de contraste negativo. Outro ponto é comparar dentro dos mesmos parâmetros a resolução do modelo tridimensional obtida por microscopia eletrônica de transmissão e por microscopia eletrônica de varredura em transmissão. Sendo assim, o aluno aprenderá a utilizar um microscópio eletrônico de varredura, manipulação de corantes metálicos, preparação de amostras de proteínas com corante metálico e processamento de imagens para reconstrução do modelo tridimensional da proteína. Cabe ressaltar, que a microscopia eletrônica de varredura é de fato mais fácil e simples do que a microscopia eletrônica de transmissão, portanto podemos estabelecer uma nova metodologia para reconstrução estrutural de proteínas de baixa massa utilizando a microscopia eletrônica.

#### Referências:

- [1] N. Tanaka, Sci. Technol. Adv. Materials 9, 014111 (2008).
- [2] Zhang X, et al, CELL 141 : 472 DOI 10.1016/j.cell.2010.03.041 2010
- [3] Reimer L (1997) Transmission electron microscopy, 4th edn. Springer, Berlin
- [4] R. Danev and K. Nagayama, J. Phys. Soc. Japan, 70 (2001) 696.