

Cristalografia “sem cristal”: síntese de complexos porosos para o uso no método da esponja cristalina

Pesquisador responsável: Andrey Fabricio Ziem Nascimento

Co-orientadora: Ana Carolina de Mattos Zeri

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS

1 INTRODUÇÃO

Todos os materiais, sejam ligas metálicas, moléculas orgânicas ou moléculas biológicas, possuem propriedades características que estão intimamente ligadas à sua estrutura. Assim, conhecendo a estrutura molecular a nível atômico, podemos inferir, ou mesmo determinar, quais propriedades/funções uma determinada molécula possui. Diversas técnicas podem revelar a estrutura atômica de uma grande variedade de materiais, como a microscopia eletrônica, ressonância magnética nuclear (RMN) e outras técnicas espectroscópicas, porém a cristalografia de raios X tem se mostrado uma das técnicas mais versáteis e de alta resolução para esse fim (Fanwick, 2016; Giacobozzo et al., 2011).

A cristalografia permite a obtenção de detalhes precisos a nível atômico de uma vasta diversidade de materiais, desde minerais até organelas inteiras, como o ribossomo, sendo então considerada uma das técnicas mais poderosas para a análise estrutural. Na biologia, a cristalografia de macromoléculas esteve e está presente em estudos fundamentais da bioquímica e biologia celular como da estrutura do DNA, mecanismos de transcrição e síntese proteica, e processos de transdução de sinal (Ban *et al.*, 2000; Cherezov *et al.*, 2007; Cramer *et al.*, 2001; Howard, 2003; Rasmussen *et al.*, 2011; Watson e Crick, 1953). A obtenção da estrutura tridimensional por cristalografia de raios X depende obrigatoriamente da obtenção de um monocristal adequado ao experimento de difração, o que constitui uma das principais limitações da técnica, principalmente no caso de macromoléculas (Chayen e Saridakis, 2008). Outras técnicas podem ser utilizadas para determinar a estrutura tridimensional de macromoléculas, porém também possuem limitações.

Técnicas como RMN e espectrometria de massas, por exemplo, são mais favoráveis no caso de moléculas pequenas e podem ser utilizadas para analisar rapidamente compostos em solução. Entretanto, algumas vezes, estas técnicas fornecem

apenas estruturas moleculares especulativas e podem levar ao assinalamento incorreto da estrutura. Por outro lado, a cristalografia de raios X fornece informações estruturais diretas a nível atômico e é reconhecido como o método de determinação de estrutura mais confiável e efetivo¹ (Giacovazzo et al., 2011). No entanto, a cristalografia de raios X possui duas limitações críticas: cristalização da amostra, que geralmente requer um procedimento demorado de tentativa e erro; não pode ser aplicado a amostras não-cristalinas (e.g. líquidos).

Considerando que um cristal nada mais é que um arranjo tridimensional organizado e periódico das moléculas que o compõe, uma forma de se contornar o processo de cristalização seria construir estruturas periódicas que funcionem como moldes tridimensionais e permitam que a molécula-alvo (composto orgânico) permeie e interaja com os poros, preenchendo os espaços. Uma vez que esse molde poroso (esponja cristalina) possui uma organização periódica espera-se que a molécula absorvida também se posicione periodicamente, formando, assim, uma rede periódica (cristal) que pode ser analisada por cristalografia de raios X (Hoshino et al., 2016; Inokuma et al., 2013; Ramadhar et al., 2014).

Este método já vem sendo utilizado há algum tempo, porém com baixa eficiência para moléculas orgânicas (Inokuma et al., 2013; Ramadhar et al., 2014). Recentemente, Inokuma e colaboradores (2013) desenvolveram um método simples de síntese de esponjas cristalinas capazes de absorver diferentes classes de compostos de forma eficiente, incluindo óleos essenciais. A síntese é realizada com reagentes disponíveis comercialmente e envolve apenas duas etapas de mistura de soluções. É importante destacar que esse método não só contorna as dificuldades encontradas na cristalização, mas também torna possível a análise por cristalografia de compostos não cristalizáveis (e.g. líquidos) (Figura 1).

¹ ~90% (124757) das estruturas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) foram determinadas por cristalografia de raios X. Já o *Cambridge Structural Database* (CSD) contém quase 1 milhão de estruturas de pequenas moléculas determinadas por cristalografia. Fonte: PDB e CSD abril/2018.

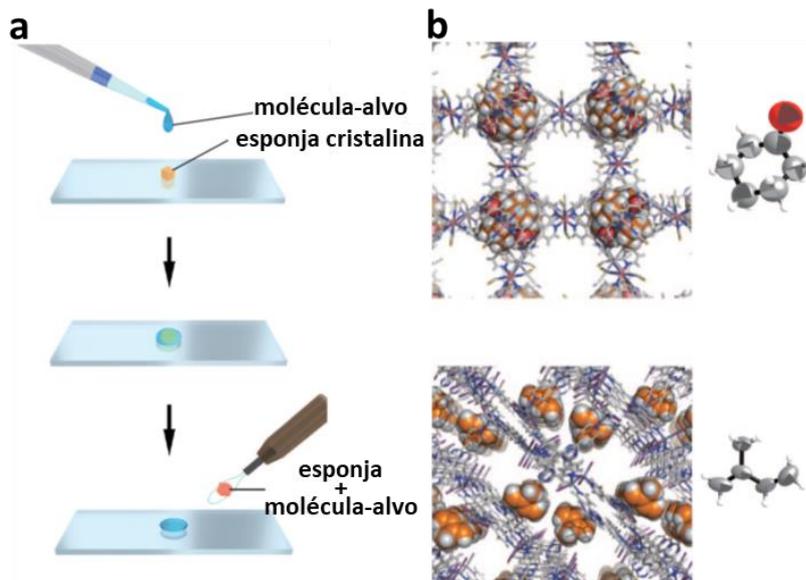


Figura 1. Análise cristalográfica por raios X de moléculas líquidas incorporadas em esponjas cristalinas. **a**, esquema da preparação de um complexo poroso e inclusão da molécula alvo: um monocristal do complexo foi incubado durante 2 dias com uma gota da molécula-alvo líquida e submetida a difração de raios-X. **b**, estrutura cristalográfica da ciclohexanona (superior) e isopreno (inferior) observada nos poros do complexo.

Ainda, este método, teria grande aplicação na análise de frações de produtos naturais obtidas por HPLC. Cada fração eluída pode ser incubada com a esponja cristalina e em seguida analisada por difração de raios X, revelando a sua estrutura atômica. Dessa forma, mesmo em baixa concentração, é possível determinar a estrutura, e conseqüentemente, identificar o composto presente em cada fração (Inokuma et al., 2013).

Neste projeto, pretendemos estabelecer a síntese de complexos porosos no LNLS visando a otimização desse método para as características da linha de luz (MX2 e MANACA (Sirius)) e que possibilitem sua utilização com moléculas hidrofílicas e maiores (peptídeos e pequenas proteínas). Além disso, pretende-se testar e implementar este método como ferramenta de caracterização de compostos obtidos a partir de extratos de produtos naturais.

O LNLS possui toda a infraestrutura para realização do projeto e um ambiente multidisciplinar, dando a oportunidade para o aluno ter contato não apenas com áreas/técnicas diretamente ligadas ao projeto, mas também outras atividades desenvolvidas no grupo da MX2/MANACA, como cristalografia de proteínas e instrumentação de linhas de luz.

2 OBJETIVO GERAL

Padronizar o método de síntese de complexos porosos (esponjas cristalinas) no LNLS e desenvolver protocolos de incorporação de moléculas alvo, de modo a produzir e disponibilizar esses complexos aos usuários da MX2/MANACA. Além disso, pretende-se também desenvolver novos complexos com tamanhos de poros maiores e mais hidrofílicos, a fim de ampliar a possibilidade de uso para moléculas orgânicas e acomodar peptídeos e pequenas proteínas.

2.1 Objetivos específicos

- Reproduzir os métodos de síntese e incorporação descritos por Inokuma et al. (2014);
- Otimizar os métodos de síntese e incorporação para as condições experimentais da linha MX2/MANACA, visando a produção de cristais menores e o menor consumo de moléculas-alvo;
- Desenvolver um protocolo de coleta de dados de difração otimizado para os complexos porosos na linha MX2/MANACA;
- Iniciar o desenvolvimento e caracterização de novos complexos porosos com poros maiores e mais hidrofílicos, visando acomodar peptídeos e pequenas proteínas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese das esponjas cristalinas e incorporação das moléculas alvo

A síntese dos complexos metálicos (esponjas cristalinas) basicamente consiste na dissolução de em uma mistura de 25% (v/v) de metanol em nitrobenzeno (solução A); e a dissolução de ZnI_2 em metanol (solução B). Em seguida, em um tubo de ensaio, a solução B é colocada lentamente sobre a solução A, formando duas fases que irão se misturar lentamente. Essa mistura é então incubada a 25 °C por 7 dias em um local sem vibração, levando a formação dos cristais.

Após algumas etapas de remoção dos cristais da solução anterior e troca de solvente, as esponjas cristalinas podem ser incubadas com a solução do molécula-alvo. A solução da molécula-alvo é lentamente evaporada, aumentando a sua concentração e levando a incorporação nos poros da esponja.

Detalhes do método de síntese podem ser encontrados em Inokuma et al. (2010) e Inokuma et al. (2014).

3.2 Coleta de dados e determinação das estruturas

Os conjuntos de dados das esponjas cristalinas serão coletados na linha de luz MX2 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Esta linha de luz dispõe de um feixe de raios X com energia ajustável na faixa de 5,5 a 15 keV. A estação experimental está equipada com um goniômetro mini-kappa e um detector de contagem de fótons (PILATUS 2M, Dectris, Switzerland) que permite operação em modo *shutterless*.

Os dados serão processados utilizando o *pipeline* automático de processamentos de dados da MX2 para moléculas pequenas (MX2AUTOPROC_SM) e/ou “manualmente” com XDS (Kabsch, 2010). As estruturas da esponja vazia ou com a molécula-alvo absorvida serão determinadas por métodos diretos com SHELXT ou utilizando sinal anômalo com o SHELXD (Sheldrick, 2015b; Sheldrick, 2010). Os modelos cristalográficos serão refinados pelo método dos mínimos quadrados com o SHELXL (Sheldrick, 2015a).

4 REFERÊNCIAS

- Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. **Science**, v. 289, n. 5481, p. 905-20, 2000.
- Chayen, N. E.; Saridakis, E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. **Nat Methods**, v. 5, n. 2, p. 147-53, 2008.
- Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H. J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Stevens, R. C. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. **Science**, v. 318, n. 5854, p. 1258-65, 2007.
- Cramer, P.; Bushnell, D. A.; Kornberg, R. D. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. **Science**, v. 292, n. 5523, p. 1863-76, 2001.
- Fanwick, P. E. Small molecule crystallography past, present, and future: a career long review of chemical crystallography. **Crystallography Reviews**, v. 22, n. 4, p. 250-279, 2016.
- Giacovazzo, C.; Monaco, H. L.; Artioli, G.; Viterbo, D.; Milanesio, M.; Gilli, G.; Gilli, P.; Zanotti, G.; Ferraris, G.; Catti, M. **Fundamentals of Crystallography**. OUP Oxford, 2011. ISBN 9780199573653. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=33asihnzBxoC> >.
- Hoshino, M.; Khutia, A.; Xing, H.; Inokuma, Y.; Fujita, M. The crystalline sponge method updated. **IUCrJ**, v. 3, n. Pt 2, p. 139-51, 2016.
- Howard, J. A. Dorothy Hodgkin and her contributions to biochemistry. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 11, p. 891-6, 2003.

- Inokuma, Y.; Arai, T.; Fujita, M. Networked molecular cages as crystalline sponges for fullerenes and other guests. **Nat Chem**, v. 2, n. 9, p. 780-3, 2010.
- Inokuma, Y.; Yoshioka, S.; Ariyoshi, J.; Arai, T.; Fujita, M. Preparation and guest-uptake protocol for a porous complex useful for 'crystal-free' crystallography. **Nat Protoc**, v. 9, n. 2, p. 246-52, 2014.
- Inokuma, Y.; Yoshioka, S.; Ariyoshi, J.; Arai, T.; Hitora, Y.; Takada, K.; Matsunaga, S.; Rissanen, K.; Fujita, M. X-ray analysis on the nanogram to microgram scale using porous complexes. **Nature**, v. 495, n. 7442, p. 461-6, 2013.
- Kabsch, W. Xds. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 2, p. 125-32, 2010.
- Rasmussen, S. G.; Devree, B. T.; Zou, Y.; Kruse, A. C.; Chung, K. Y.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Chae, P. S.; Pardon, E.; Calinski, D.; Mathiesen, J. M.; Shah, S. T.; Lyons, J. A.; Caffrey, M.; Gellman, S. H.; Steyaert, J.; Skiniotis, G.; Weis, W. I.; Sunahara, R. K.; Kobilka, B. K. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 549-55, 2011.
- Sheldrick, G. Crystal structure refinement with SHELXL. **Acta Crystallographica Section C**, v. 71, n. 1, p. 3-8, 2015a.
- Sheldrick, G. SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination. **Acta Crystallographica Section A**, v. 71, n. 1, p. 3-8, 2015b.
- Sheldrick, G. M. Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 4, p. 479-85, 2010.
- Watson, J. D.; Crick, F. H. The structure of DNA. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 18, p. 123-31, 1953.