

Giovanni César dos Santos

Estudo Comparativo entre Soro Albuminas
Bovinas na Presença de Ligantes em
Vários Valores de pH por Espalhamento
de Raios X a Baixos Ângulos



1910000948





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP.

Giovanni César dos Santos

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE SORO ALBUMINAS
BOVINAS NA PRESENÇA DE LIGANTES EM VÁRIOS
VALORES DE pH POR ESPALHAMENTO DE RAIOS X A
BAIXOS ÂNGULOS.**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de
Mestre em Física, Área de Concentração em Biofísica
Molecular. Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho" - UNESP.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOHNNY RIZZIERI OLIVIERI

São José do Rio Preto - SP

1998



Este trabalho recebeu o apoio financeiro da

CAPES / CNPq

Aos meus pais



AGRADECIMENTOS

Ao professor doutor Johnny Rizzieri Olivieri pelas ensinamentos, orientação e principalmente pela amizade, apoio e estímulo.

Aos professores Romão Beltrão Abregó e Walter Azevedo pela colaboração nas discussões e ajuda.

Aos professores Marcelo Fossey e José Ruggiero pelas discussões e sugestões que tanto contribuíram para este trabalho.

Aos professores Eliot, Márcio Colombo, Elso e Augusto pelas discussões.

A todo o corpo docente do Departamento de Física pela ajuda e ensinamentos.

Aos colegas de pós-graduação pelas boas momentos: Adriana, Alexandre "Margarite", Alexander Gnerzoni, Alexandre Tava, André, Renato, Bernadete, Cecília, Dulcinéia, Edluis, Eduma, Fernanda, Gláucia, Jennifer, João Riegato, Leandra, Milton, Murilo, Norma, Osmar, Osmar, Raimel, Renato, Sandra, Selma e Uderlei.

Este trabalho recebeu o apoio financeiro da:

CAPES / CNPq
FAPESP

A Jaciifer pela amizade e colaboração.

A Eduma pela ajuda e amizade.



AGRADECIMENTOS

Ao professor doutor Johnny Rizzieri Olivieri pelos ensinamentos, orientação e principalmente pela amizade, apoio e estímulo.

Aos professores Ramon Beltran Abrego e Walter Azevedo pela colaboração nas discussões e ajuda.

Aos professores Marcelo Fossey e José Ruggiero pelas discussões e sugestões que tanto contribuíram para este trabalho.

Aos professores Elói, Márcio Colombo, Elso e Augusto pelas discussões.

À todo o corpo docente do Departamento de Física pela ajuda e ensinamentos

Aos colegas de pós-graduação pelos bons momentos: Adriana, Alexandre "Magaiver", Alexandre Guerzoni, Alexandre Teso, André, Benatti, Bernadete, Cecília, Dulcinéia, Fábio, Fátima, Fernanda, Gláucia, Jenifer, João Ricardo, Leandra, Milton, Murilo, Norma, Ocimar, Osmar, Raquel, Renato, Sandra, Selma e Uderlei.

À Jenifer pela amizade e colaboração.

À Fátima pela ajuda e amizade.



Aos funcionários Barbosa, Paulinho, Ilva e D. Zezé pela assessoria e amizade.

À minha amiga Vera Lúcia pelo apoio e pelos anos de amizade sincera.

Aos meus amigos Ademir e Dyego pelas lições de vida e pela amizade sincera.

À Sílvia pela amizade e que, com certeza, está em um lugar melhor.

Aos meus amigos de Guaíra.

Ao Guy pelos bons tempos de faculdade.

À minha família pelo incentivo, apoio, compreensão e amor.

À Ana Lúcia por estar presente, pela paciência e dedicação de todos esses anos e principalmente pelo amor e cumplicidade e, por tornar minha vida melhor.

À CAPES pela bolsa de estudo.

À FAPESP pelo apoio financeiro na aquisição de materiais.



SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ix

LISTA DE TABELASxii

LISTA DE ABREVIATURASxiii

RESUMOxiv

ABSTRACTxv

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVO1

CAPÍTULO 2 - SORO ALBUMINA4

2.1 - Aspectos gerais4

2.2 - Estrutura primária5

2.3 - Propriedades físicas e forma8

2.4 - Ligação de ligantes à albumina11

CAPÍTULO 3 - RAIOS X14

3.1 - Introdução14

3.2 - Propriedades dos raios X15

3.3 - Produção de raios X15

3.4 - Radiação característica17

3.5 - Intensidade de um feixe de raios X	18
3.6 - Absorção de raios X pela matéria	19
CAPÍTULO 4 - TEORIA DE SAXS	20
4.1 - Espalhamento por um elétron livre	20
4.2 - Espalhamento por uma partícula	23
4.3 - Aproximações de Porod e Guinier	29
4.4 - Função distribuição de distâncias $p(r)$ e o raio de giração (R_g).....	32
CAPÍTULO 5 - MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 - A técnica de SAXS	33
5.1.1 - Introdução	33
5.2 - Procedimento experimental	34
5.2.1 - Calibração do aparelho de raios X	34
5.2.2 - Perfil do feixe	37
5.2.3 - O detetor	38
5.3.4 - As amostras	41
5.3 - Tratamento dos dados	42
5.3.1 - Normalização das curvas de espalhamento experimentais.....	42
5.3.2 - Extrapolação à concentração zero e cálculo da intensidade média.....	44
5.3.3 - Background	45
5.3.4 - Correções finais	47
5.3.5 - Máxima dimensão da partícula - D_{max}	50
5.4 - Modelos	51



CAPÍTULO 6 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS	53
6.1 - Comentários.....	53
6.2 - Resultados preliminares da SAB	54
6.3 - Correções pelo programa ITP	61
6.4 - Modelos obtidos pelo programa MULTIBODY	67
CAPÍTULO 7 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	72
CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	81
APÊNDICE A	83
Cálculo da média do $\cos (\bar{h} \cdot \bar{r})$	83
APÊNDICE B	85
Dependência do efeito Compton com o ângulo de espalhamento.....	85
APÊNDICE C	88
CAPÍTULO 9 - BIBLIOGRAFIA	89



LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1 - Diagrama da estrutura primária com os domínios I, II e III	6
Figura 2.2 - Visão estereoscópica da molécula de albumina humana ...	10
Figura 2.3 - Modelo teórico da SAH pH 7.0 livre de ligantes ...	10
Figura 2.4 - Algumas regiões de ligação de alguns ligantes...	12
Figura 2.5 - Comparação em tamanho entre um dos subdomínio da albumina ...	13

Capítulo 3

Figura 3.1 - Esquema mostrando a produção de raios X ...	16
Figura 3.2 - Espectro de radiação de raios X emitidos por um tubo de cobre.	18

Capítulo 4

Figura 4.1 - Espalhamento de uma onda por um elétron livre.	20
Figura 4.2 - Difração por uma partícula.	24
Figura 4.3 - Representação da função $V(r)$.	27
Figura 4.4 - Curva de espalhamento representando as regiões de Porod e Guinier.	29

Capítulo 5

Figura 5.1 - Sistema de colimação por blocos ou sistema de colimação de Kratky.	35
Figura 5.2 - Gráficos do perfil do feixe ...	36
Figura 5.3 - Gráfico de linearidade do detetor para conversão de ...	40
Figura 5.4 - ... relação entre distâncias entre canais e o ângulo de espalhamento.	40
Figura 5.5 - Curva de intensidade de amostra padrão - lupolen ...	43
Figura 5.6 - Esquema de cálculo da intensidade média extrapolada ...	45
Figura 5.7 - ... afastamento da lei de Porod devido às flutuações ...	46



Figura 5.8 - ... aproximação dos dados de espalhamento no método da transformação indireta.	49
Figura 5.9 - ... $p(r)$ de um modelos teórico de uma esfera para vários valores de D_{max} .	50

Capítulo 6

Figura 6.1 - ... conjunto de medidas da SAB-fV -pH 6.0 ...	55
Figura 6.2 (a-b-c) - Gráficos de Porod para eliminação do “background” ...	58
Figura 6.3 - ... “background” eliminado, da SAB-fV - pH 6.0.	59
Figura 6.4 - ... intensidade de espalhamento extrapolada à concentração zero ...	60
Figura 6.5 - Gráficos de intensidade de espalhamento ($I(h) \times h$), calculadas pelo ITP.	62
Figura 6.6 - Gráficos de Guinier ($\log I(h) \times h^2$) ...	63
Figura 6.7 - Função de distribuição de distâncias - $p(r)$ - ...	64
Figura 6.8 - Gráficos de $\log I(h) \times \log h$ - informações sobre a forma das partículas.	65
Figura 6.9 - Blocos utilizados na construção dos modelos.	68
Figura 6.10 - Exemplo de modelo indicando os domínios I e II ...	68
Figura 6.11 - Modelos teóricos... pH 3,0 e 4,0 ...	69
Figura 6.12 - Modelos teóricos... SAB-fV pH 6,0 e SAB-lg pH 4,0...	70

Capítulo 7

Figura 7.1 - Comparação da funções $p(r)$ das SAB-fV e SAB-lg ...	73
Figura 7.2 - Modelos... SAH pH 3,5 e 4,0...	76
Figura 7.3 - Modelos... SAH pH 5,0 e 7,0...	77
Figura 7.4 - Comparação entre os modelos... SAH pH 3,5 ... SAB-fV pH 3,0.	78
Figura 7.5 - Comparação entre os modelos... SAH ... SAB-fV pH 4,0.	79
Figura 7.6 - Comparação... $p(r)$ das SAH ... SAB-fV...	80

Apêndice A

Figura A.1 - Vetores $\vec{h}$ e $\vec{r}$ para cálculo da média do $\cos(\vec{h} \cdot \vec{r})$.	83
--	----



Apêndice B

Figura B.1 - Esquema mostrando interação fóton-elétron por efeito Compton. 85

Apêndice C

Figura C.1 - Espalhamento de raios X por uma partícula indicando os vetores de incidência $\vec{S}_0$ e de espalhamento $\vec{S}$. 88



LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1 - Relação de alguns autores e suas propostas de modelos...	2
---	---

Capítulo 2

Tabela 2.1 - Quantidade de amino-ácidos nas albuminas humana e bovina.	7
Tabela 2.2 - Resultados obtidos por Olivieri e Craievich do raio de giração da ...	9

Capítulo 6

Tabela 6.1 - Comparação dos resultados obtidos dos raios de giração da SAB-fV ...	66
Tabela 6.2 - Comparação entre os raios de giração experimentais com os obtidos dos modelos.	71



LISTA DE ABREVIATURAS RESUMO

CuK_{α} : radiação k_{α} do cobre.

D_{max} : máxima dimensão da partícula.

ITP: *indirect transformation for calculation of p(r)* (transformação indireta para cálculo da função $p(r)$).

$p(r)$: função de distribuição de distâncias.

R_g : raio de giração.

SAB : soro albumina bovina.

SAB-fV: soro albumina bovina fração V.

SAB-lg: soro albumina bovina livre de globulina.

SAH : soro albumina humana.

SAXS: *small angle X-ray scattering* (espalhamento de raios X a baixos ângulos).



RESUMO

A soro albumina é uma proteína de grande interesse biológico devido às suas propriedades de armazenar e transportar substâncias como ácidos graxos e outras pequenas moléculas, além de auxiliar no controle da pressão osmótica do sangue. É uma proteína muito flexível e maleável, podendo sofrer mudanças em sua conformação pela variação do pH, temperatura e presença de ligantes.

Neste trabalho, estudamos a soro albumina bovina ligada com ácidos graxos e/ou globulina em vários valores de pH (3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0) utilizando a técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos para avaliar a ocorrência de variações conformacionais. A partir das curva de intensidade de espalhamento corrigidas determinamos parâmetros como: raio de giração, função de distribuição de distâncias $p(r)$ e máxima dimensão da partícula.

Para as correções das curvas de intensidade foram utilizados o programa computacional ITP do qual calculamos raios de giração entre 2,62 nm e 3,18 nm e as funções $p(r)$ que serviram como base para a determinação de modelos teóricos tridimensionais. Esses resultados foram posteriormente comparados com outros da literatura para as albuminas humana e bovina livres de ligantes. Com esses dados, ficou evidente a forte dependência da forma da macromolécula com a variação do pH e presença de ligantes e, ainda servindo como indício da grande flexibilidade da proteína.



ABSTRACT

Albumin is a protein which raises a great biological interest due to its properties of fatty-acid and small molecule storage and transportation, besides to help in the control of blood osmotic pressure. It is a very flexible protein which may undergo changes in its conformation due to variation in pH, temperature, and presence of ligands.

In the present work it is studied complexes of bovine albumin with fatty-acid and/or globulin at several pH's (3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0) using the Small Angle X-ray Scattering (SAXS) technique in order to evaluate the presence of conformational changes. From the corrected scattering intensity curves it was determined parameters such as: radius of gyration, function of distance distribution ($p(r)$), and maximum dimension of the particle.

For corrections in the intensity curves it was used the computer program ITP which calculated values for radius of gyration for bovine albumin ranging from 2.62 to 3.18 nm. The functions $p(r)$ were used to determine the three-dimensional theoretical models. These results were compared with published results for human and bovine albumin free of ligands. These comparisons made clear that there is a strong dependence of the macromolecule shape with pH variation and presence of ligands, furthermore, it indicated a great protein flexibility.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A soro albumina é uma das principais proteínas do plasma sanguíneo e representa cerca de 60% das proteínas aí existentes, além de ser um importante componente do plasma no estabelecimento da pressão osmótica do sangue. Devido as suas propriedades de armazenar e transportar outras substâncias, tais como, ácidos graxos, bilirrubina, metais, drogas e outras pequenas moléculas, desperta um grande interesse biológico. Seu peso molecular está em torno de 66500 e o ponto isoeletrico está por volta do pH 4,8. Estudos mostram que esta proteína é composta por uma única cadeia polipeptídica com 17 pontes de dissulfeto, o que lhe confere forte estabilidade, mas, devido às suas localizações permite-lhe alta maleabilidade e flexibilidade. Esta cadeia pode ser dividida em 3 domínios e cada um subdividido em 2 subdomínios (Hunter e McDuffie, 1959).

A albumina é uma proteína muito sensível às condições do meio em que está envolvida, podendo sofrer mudanças na conformação pela variação do pH e temperatura ou ainda, pela presença de ligantes. A capacidade de ligação da albumina está provavelmente relacionada à existência de diferentes regiões de ligação dentro da molécula nas quais os ligantes podem ser ligados com alta afinidade.

Em trabalho recente (Olivieri e Craievich, 1995) as albuminas humana e bovina, livres de ligantes, foram estudadas pela técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS), mostrando uma alta sensibilidade na conformação com a variação do pH, comprovando a grande flexibilidade da proteína. Modelos foram propostos baseados na sua estrutura de subdomínios. Até então, outros



trabalhos na literatura tinham como proposta para a forma estrutural da albumina, modelos com formas simples como elipsóides prolatos, oblatos e prismas, não deixando clara a sequência de como a proteína passava de uma forma à outra pela variação do pH. O trabalho de Olivieri e Craievich também serviu para mostrar esta sequência. A tabela 1.1 relaciona os trabalhos de alguns autores com suas respectivas propostas de modelos.

Autor	pH	Técnica	Forma
Anderegg <i>et al</i> , 1955	4.6	SAXS	prisma reto
Luzzati, 1960	5.3	SAXS	elipsóide prolato ou oblato
Squire <i>et al</i> , 1968	5.2	Sedimentação	elipsóide prolato
Laggner <i>et al</i> , 1971	7.5 e 5.1	SAXS	elipsóide prolato ou prisma chato
Carter <i>et al</i> , 1990	7.2	Difração de Raios X	coração

Tabela 1.1 - Relação de alguns autores e suas propostas de modelos para a albumina em diferentes valores de pH e as técnicas utilizadas.

O espalhamento de raios X a baixos ângulos tem-se revelado uma técnica muito importante no estudo de macromoléculas em solução com tamanho entre 10 e 200 Å, para cálculo de vários parâmetros geométricos como: raio de giração, função de distribuição de distâncias, máxima dimensão, volume e superfície. Ela permite estudos em condições próximas do ambiente biológico, possibilitando ainda, a obtenção de informações sobre a forma das macromoléculas. Devido a essa dependência com a geometria, os dados de espalhamento podem ser extremamente sensíveis às mudanças conformacionais e/ou flexibilidade, proporcionando assim, um importante auxílio na compreensão dos mecanismos biomoleculares (Trehwella, 1997).

O objetivo deste trabalho é avaliar, pela técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos, a existência de mudanças conformacionais da soro albumina bovina ligada com ácidos graxos e/ou globulinas de pequenas dimensões se comparada com a proteína, em vários valores de pH e ainda calcular parâmetros como raio de giração e função de distribuição de distâncias. Posteriormente, compararemos esses resultados com os obtidos na literatura (Olivieri e Craievich, 1995; Olivieri, 1992), para as soro albuminas humana e bovina livres de lingantes. Também serão propostos modelos gerados a partir de simulações em computador, para as várias conformações observadas nas albuminas em estudo. Este trabalho ainda visa a aprendizagem da técnica que inclui: a teoria de espalhamento de raios X, utilização dos programas computacionais para cálculo dos parâmetros desejados e construção de modelos, manuseio dos equipamentos envolvidos e interpretação dos resultados.



CAPÍTULO 2 - SORO ALBUMINA

2.1 - Aspectos Gerais

A palavra albumina deriva do latim *albus*, branco, que vem do albumen do ovo que se torna branco após a coagulação. Suas principais características são de uma proteína ácida, muito solúvel e estável. Seu ponto isoelétrico está aproximadamente em torno do pH 4,8. Entre os valores de pH 6,0 e 7,0, a albumina é solúvel em altas concentrações de sulfato de amônia (2.1 M).

A estabilidade ou sua resistência à desnaturação foram determinadas. Pode ser aquecida a 60°C por um período de 10 horas, na presença de estabilizadores como ácido caprílico. Entre os valores de pH 1,0 e 2,0 a molécula se expande e alonga, podendo voltar à configuração nativa reversivelmente. Entre os valores de pH 9,0 e 11,0 a albumina é relativamente estável, podendo sofrer apenas trocas de dissulfeto (Peters, 1985; Ulrich, 1981).

As albuminas ligam-se facilmente a centenas de outras substâncias, pequenas moléculas, ácidos graxos, metais, modificando algumas vezes seu comportamento ou forma, como por exemplo, dando maior estabilidade conformacional ou protegendo contra a desnaturação por calor ou pela uréia.

A primeira albumina a ser cristalizada foi a de cavalo, por volta de 1894, e a cristalização é empregada em escala industrial, como um passo no processo de purificação. Entretanto, só recentemente foi determinada a estrutura tridimensional (Carter *et al* , 1989; 1990).



2.2 - Estrutura Primária

A albumina é uma proteína composta de uma única cadeia polipeptídica, com 585 e 582 aminoácidos, para a soro albumina humana (SAH) e a bovina (SAB), respectivamente. As albuminas caracterizam-se por um baixo conteúdo de triptofano e metionina e um alto conteúdo de cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e arginina. A composição de aminoácidos pode ser vista na tabela 2.1.

Estudos da sequência de aminoácidos da albumina humana e bovina, verificaram uma homologia muito grande entre as duas. Uma característica comum entre essas albuminas é a presença de pares de cisteínas vizinhas em toda a sequência, como mostra a figura 2.1.

Após estudos por Hunter e McDuffie (Hunter e McDuffie, 1959), ficou estabelecido que a albumina é uma única cadeia polipeptídica composta de 17 pontes de dissulfeto. A quantidade de pontes de dissulfeto formada confere às albuminas uma forte estabilidade, mas suas localizações permitem, por outro lado, uma maleabilidade e flexibilidade muito grande, sendo responsável pela existência de várias conformações em diferentes valores de pH. Ela apresenta uma cisteína livre, que possivelmente deve estar protegida da oxidação pela forma da cadeia.

Baseado na distribuição das pontes de dissulfeto ao longo da cadeia de aminoácidos, é possível dividir as albuminas em três domínios (I, II, III) e cada um deles em outros dois subdomínios (A e B), como mostra a figura 2.1.

Tabela 2.1 - Quantidade de aminoácidos nas albuminas humana e bovina.



AMINOÁCIDO	BOVINA	HUMANA
ácido aspártico	41	36
asparagina	13	17
treonina	34	28
serina	28	24
ácido glutâmico	59	62
glutamina	20	20
prolina	28	24
glicina	16	12
alanina	46	62
valina	36	41
1/2-cisteína	35	35
metionina	4	6
isoleucina	14	8
leucina	61	61
tirosina	19	18
fenilalanina	27	31
lisina	59	59
listidina	17	16
triptofano	2	1
arginina	23	24
TOTAL	582	585

Tabela 2.1 - Quantidade de aminoácidos nas albuminas humana e bovina.

2.3 - Propriedades Físicas e Forma

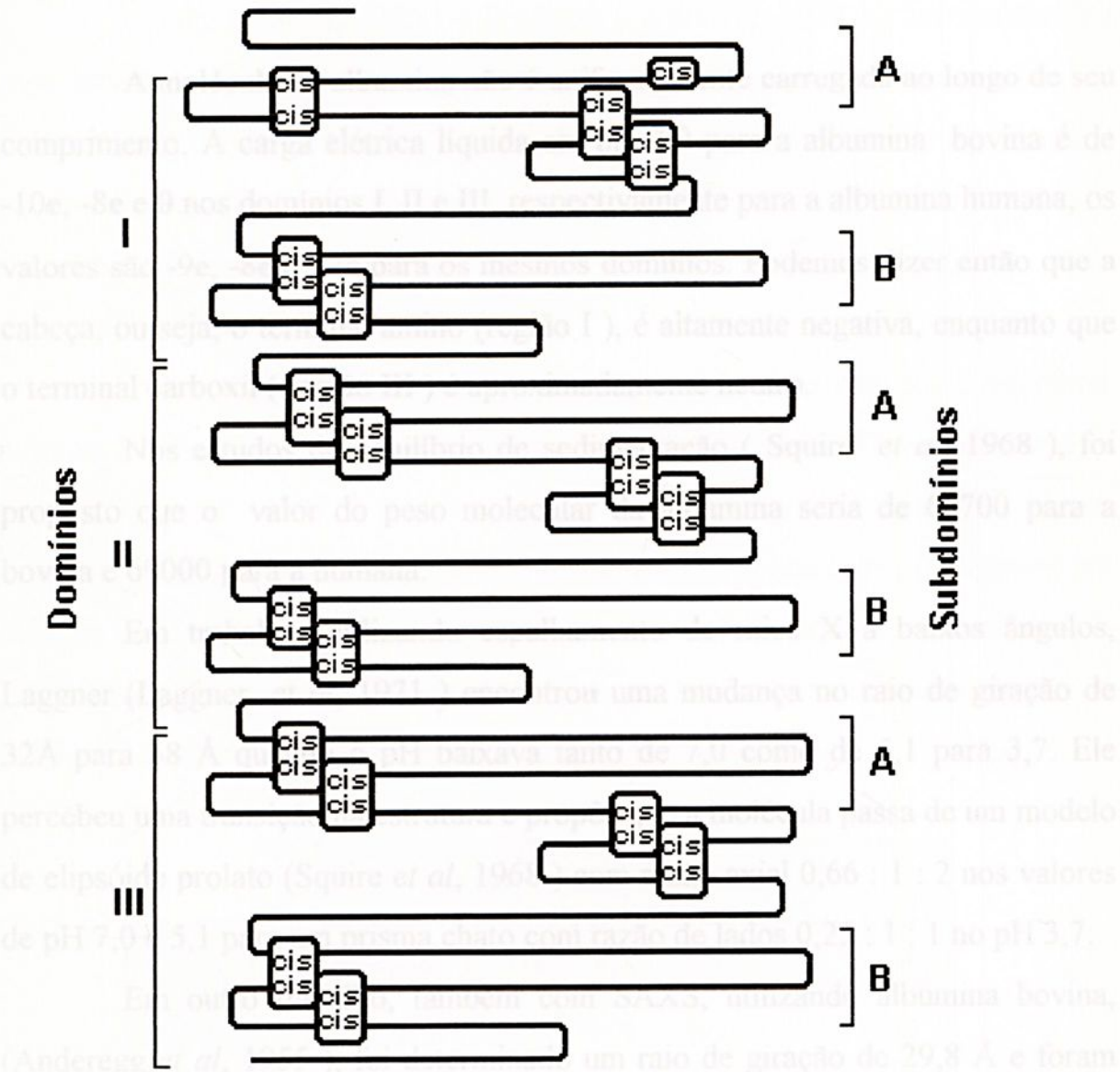


Figura 2.1- Diagrama da estrutura primária com os domínios I, II e III .

Em trabalho desenvolvido por Carter (Carter *et al.*, 1989,1990) a albumina humana foi cristalizada em diversos valores de pH (variando entre 5,5 e 7,2) e encontraram cristais tetragonais com cela unitária de 186,5 x 186,5 x 81,0Å. A forma proposta para a proteína foi a de um coração com as máximas

2.3 - Propriedades Físicas e Forma

A molécula de albumina não é uniformemente carregada ao longo de seu comprimento. A carga elétrica líquida em pH 7,0 para a albumina bovina é de -10e, -8e e 0 nos domínios I, II e III, respectivamente para a albumina humana, os valores são -9e, -8e e +2e para os mesmos domínios. Podemos dizer então que a cabeça, ou seja, o terminal amino (região I), é altamente negativa, enquanto que o terminal carboxil (região III) é aproximadamente neutro.

Nos estudos de equilíbrio de sedimentação (Squire *et al*, 1968), foi proposto que o valor do peso molecular da albumina seria de 66700 para a bovina e 69000 para a humana.

Em trabalho, utilizando espalhamento de raios X a baixos ângulos, Laggner (Laggner *et al*, 1971) encontrou uma mudança no raio de giração de 32Å para 38 Å quando o pH baixava tanto de 7,0 como de 5,1 para 3,7. Ele percebeu uma transição na estrutura e propôs que a molécula passa de um modelo de elipsóide prolato (Squire *et al*, 1968) com razão axial 0,66 : 1 : 2 nos valores de pH 7,0 e 5,1 para um prisma chato com razão de lados 0,25 : 1 : 1 no pH 3,7.

Em outro trabalho, também com SAXS, utilizando albumina bovina, (Anderegg *et al*, 1955), foi determinado um raio de giração de 29,8 Å e foram propostas duas sugestões para a forma: a de um prisma reto com 106 x 21,5 x 50Å ou a de um paralelepípedo com dimensões 82,5 x 27,4 x 63 Å. A escolha final entre um modelo e outro não foi possível, segundo os autores.

Em trabalho desenvolvido por Carter (Carter *et al*, 1989;1990), a albumina humana foi cristalizada em diversos valores de pH (variando entre 5,5 e 7,2) e encontraram cristais tetragonais com cela unitária de 186,5 x 186,5 x 81,0Å. A forma proposta para a proteína foi a de um coração com as máximas



dimensões de 83 e 82 Å, com uma profundidade de aproximadamente 30 Å. Um esboço da molécula pode ser visto na figura 2.2.

Peters (Peters, 1985) e Wallevik (Wallevik, 1973) , fizeram estudos com atividade óptico rotatório e mostraram também que a albumina muda de forma com a variação do pH . Estes trabalhos mostram a molécula de albumina numa posição mais desenrolada em torno do pH 2,7, passando depois pelo ponto de maior enrolamento ao redor do pH 4,3 e se tornando novamente mais desenrolada do pH 7,0 para cima.

Como vimos, a albumina foi tratada por diferentes técnicas e diferentes autores. Em estudos recentes, Olivieri e Craievich (Olivieri e Craievich, 1995) e Olivieri (Olivieri, 1992) avaliaram, por espalhamento de raios X a baixos ângulos, o comportamento das albuminas humana e bovina livres de ligantes em solução em função da variação do pH, comprovando a grande maleabilidade e flexibilidade da proteína devido às mudanças conformacionais observadas. A tabela 2.2 mostra os valores dos raios de giração encontrados.

pH	RAIO DE GIRAÇÃO (Å)						
	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	7,0
SAH	35,0	32,8	26,7	31,6	32,6	31,2	33,4
SAB	30,2	32,7	-	33,7	32,7	-	30,3

Tabela 2.2 - Resultados obtidos por Olivieri do raio de giração da SAH e SAB livres de ligantes.

São propostos modelos teóricos para os diferentes valores de pH baseados na estrutura de subdomínios apresentados pela albumina. É constatado que apesar da grande homologia entre essas proteínas, elas apresentam diferenças

nos valores do raio de giração (tabela 2.2) e na forma. Um dos modelos propostos da SAH pH 7,0 (Olivieri e Craievich, 1995) pode ser visto na figura 2.3.

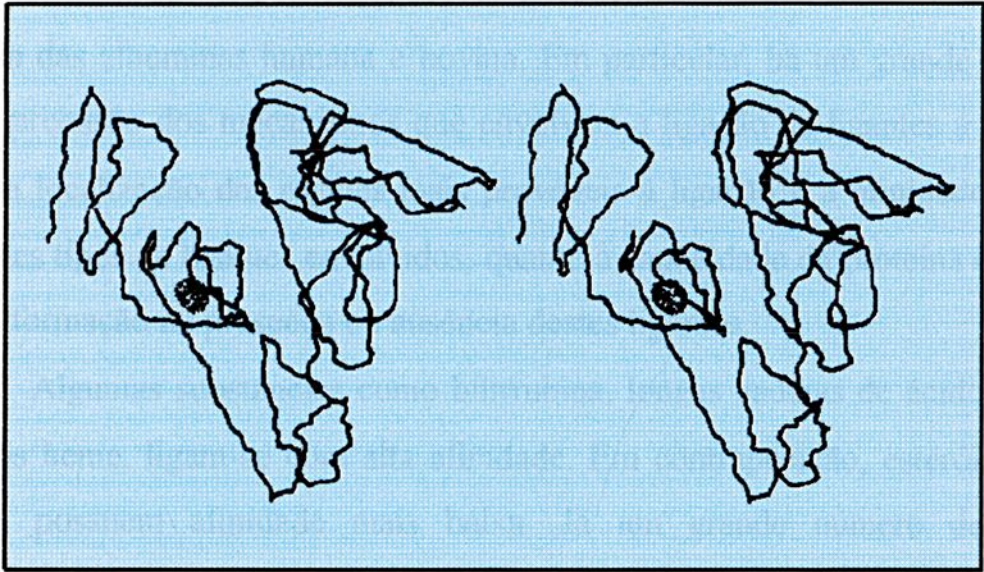


Figura 2.2 - Visão estereoscópica da molécula de albumina humana, que apresenta um formato de coração, conforme proposta de Carter.

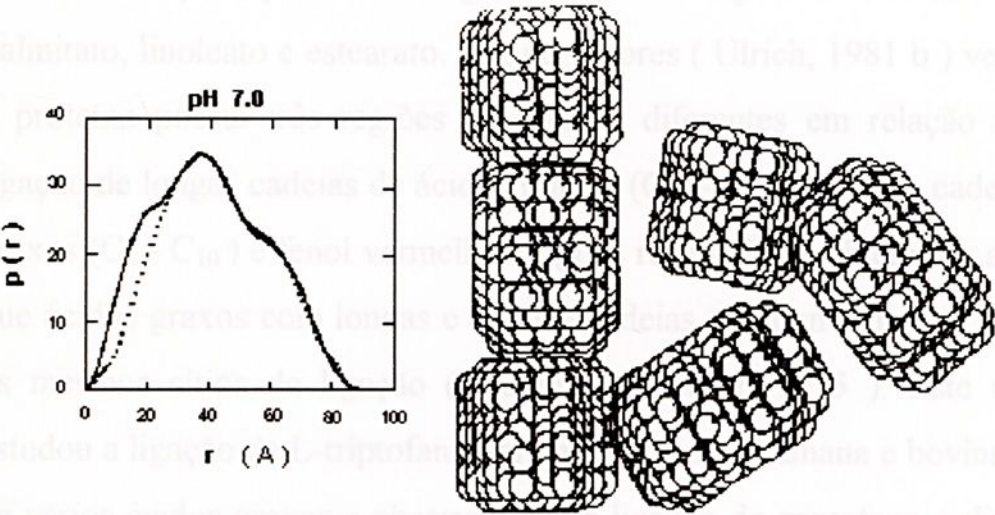


Figura 2.3 - Modelo teórico da SAH pH 7,0 livre de ligantes e sua respectiva função distribuição de distâncias, proposto por Olivieri e Craievich.

2.4 - Interação ligante-albumina

Devido a importância fisiológica da albumina muitos trabalhos vem sendo desenvolvidos, sobretudo após a determinação completa da estrutura primária das albuminas humana e bovina. Em particular, há um grande interesse na compreensão dos mecanismos que envolvem a ligação de ligantes à proteína, tanto na localização das regiões mais prováveis à ligação e a afinidade para os diferentes tipos de ligantes envolvidos, quanto à capacidade da proteína de mudar sua conformação na presença ou ausência destes ligantes.

Algumas substâncias como bilirrubina, longas cadeias de ácidos graxos e grupos heme, ligam-se com alta afinidade. Em contraposição, esteróides e L-tiroxina possuem afinidade mais baixa. Já um grande número de drogas carregadas negativamente ou eletrostaticamente neutras são ligadas com afinidade moderada. A figura 2.4 mostra algumas possíveis regiões de ligação da albumina para alguns diferentes ligantes (Ulrich, 1981).

Os principais ácidos graxos que se ligam à albumina são: oleato, palmitato, linoleato e estearato. Alguns autores (Ulrich, 1981 b) verificaram que a proteína possui três regiões de ligação diferentes em relação aos sítios de ligação de longas cadeias de ácidos graxos ($C_{16} - C_{18}$), médias cadeias de ácidos graxos ($C_8 - C_{10}$) e fenol vermelho. Alguns resultados da literatura ainda indicam que ácidos graxos com longas e médias cadeias não tem a mesma afinidade para os mesmos sítios de ligação (Cunningham *et al*, 1975). Este mesmo autor estudou a ligação de L-triptofano para as albuminas humana e bovina na presença de vários ácidos graxos e observou que a ligação do triptofano é diminuída mais na presença de baixas concentrações de dodecanoato do que na mesma quantidade de palmitato ou oleato.



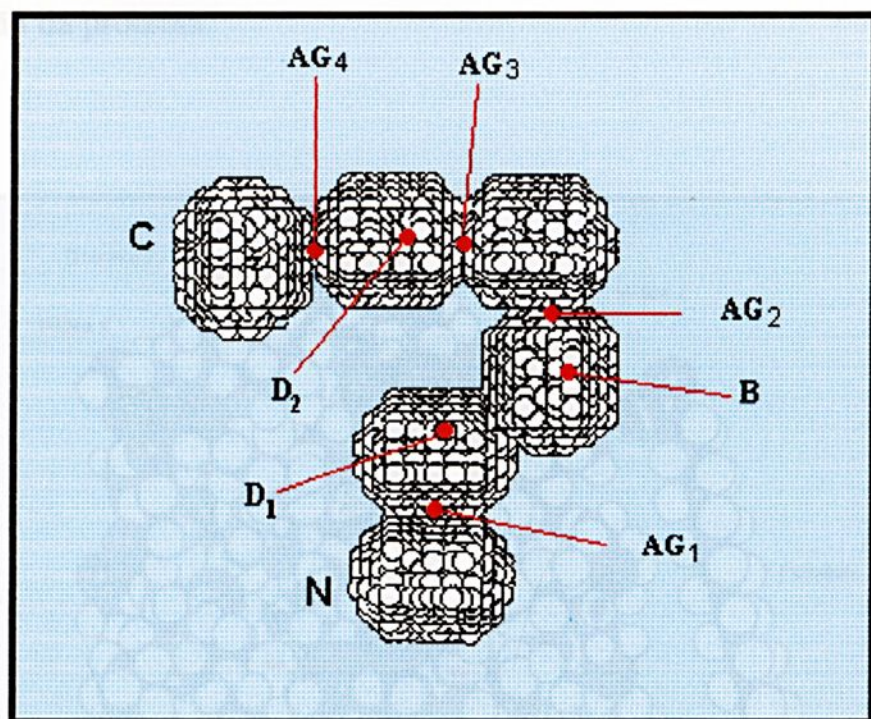


Figura 2.4 - Algumas regiões de ligação de alguns ligantes. AG: ácidos graxos; B: bilirrubina; D: drogas; N: terminal amino e C: terminal carboxil (Olivieri, 1992).

Figura 2.3 - Comparação em tamanho entre um dos domínios da albumina com palmitato (Peters, 1985)

É importante notar que os ácidos graxos ligados à albumina são capazes de influenciar a ligação de outros ligantes. Entretanto, experimentos tem mostrado que a ligação também pode ser influenciada por outros fatores tais como: concentração de albumina, pH, temperatura e, tipo e concentração de sais usados na solução.

Apesar de a albumina ter alta afinidade à ligação de longas cadeias de ácidos graxos, estes são muito pequenos se comparados em tamanho com a proteína. A figura 2.5 (Peters, 1985) dá uma idéia dessa diferença, em que compara um dos domínios da albumina com o palmitato. Isto indica que a

presença desses ácidos graxos não influenciam em muito no volume total ou no raio de giração da proteína.

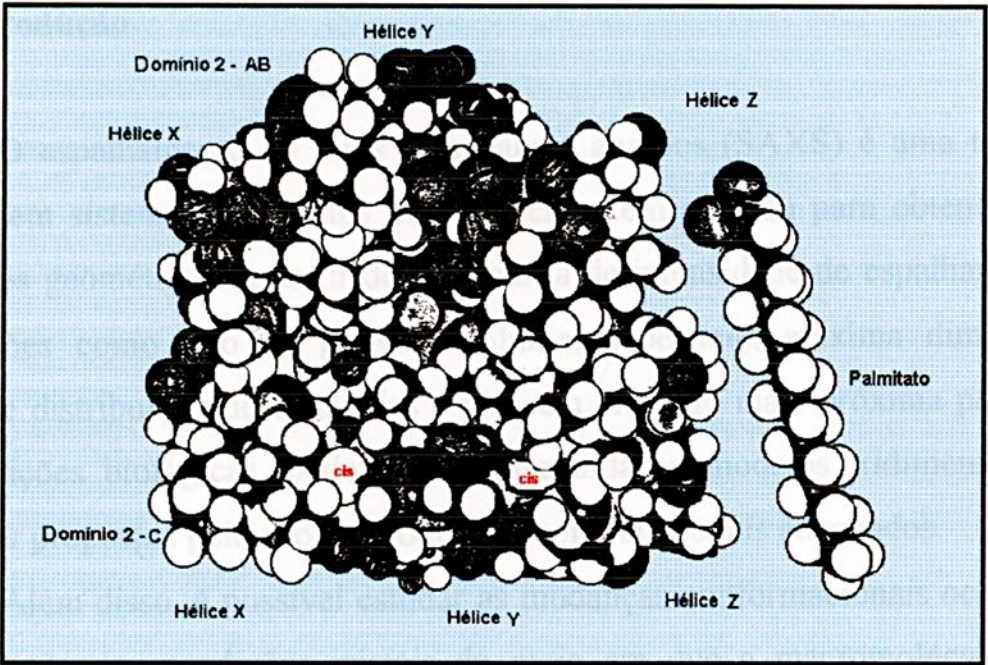


Figura 2.5 - Comparação em tamanho entre um dos domínios da albumina com palmitato (Peters, 1985).

CAPÍTULO 3 - RAIOS X

3.1 - Introdução

O espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) é uma técnica utilizada em sistemas compostos por moléculas em solução para obtenção de parâmetros geométricos a partir de uma curva de intensidade de espalhamento. Informações como raio de giração, volume, superfície, máxima dimensão, função de distribuição de distâncias - $p(r)$, em situação mais próxima possível das condições biológicas, podem ser conseguidas e modelos tridimensionais podem ser propostos pelo uso de programas computacionais adequados.

Além disso, é possível estudar as mudanças conformacionais ocorridas pela variação das condições iniciais do meio em que a macromolécula está envolvida, como pH, temperatura e presença de ligantes.

Vale lembrar que, como é de interesse deste trabalho, apenas sistemas monodispersos de proteínas serão considerados.

É de fundamental importância saber que a diferença na densidade eletrônica entre soluto e solvente são imprescindíveis para a utilização da técnica de SAXS, e para tanto, as proteínas devem estar numa solução salina com concentração abaixo de 1 M, evitando assim, o “mascaramento” nas curvas de intensidade.

As curvas de SAXS e sua técnica serão mostradas com mais detalhes no decorrer deste trabalho. Mas ressaltamos que todas as informações desejadas são conseguidas de uma única curva de intensidade em função do ângulo de espalhamento.



3.2 - Propriedades dos Raios X

Os raios X, assim chamado por seu descobridor Roentgen devido a sua natureza então desconhecida, são radiações eletromagnéticas com comprimento de onda curto, usualmente na faixa de 0,5 a 2,5 Å.

Eles apresentam propriedades típicas de onda como polarização, interferência e difração, da mesma forma que todas as outras radiações eletromagnéticas

Neste trabalho, a radiação, na maioria das vezes, será interpretada como onda, mas em alguns casos será considerada como fótons de energia $h\nu = \frac{hc}{\lambda}$, em que h é a constante de Planck e c , a velocidade da luz (Guinier, 1963).

3.3 - Produção de Raios X

Os raios X são produzidos quando um material é bombardeado por elétrons a alta velocidade. Os tubos de raios X convencionais consistem de um ânodo e de um cátodo contidos no interior de um envoltório de vidro em que todo o ar foi removido. O ânodo ou alvo é usualmente feito de cobre massivo e o cátodo consiste de um filamento de tungstênio.

Neste tubo, os elétrons do filamento aquecido são emitidos e acelerados num feixe por meio de uma diferença de potencial e em seguida desacelerados ao colidirem com o ânodo, como mostrado na figura 3.1 (Eisberg e Resnick, 1979).

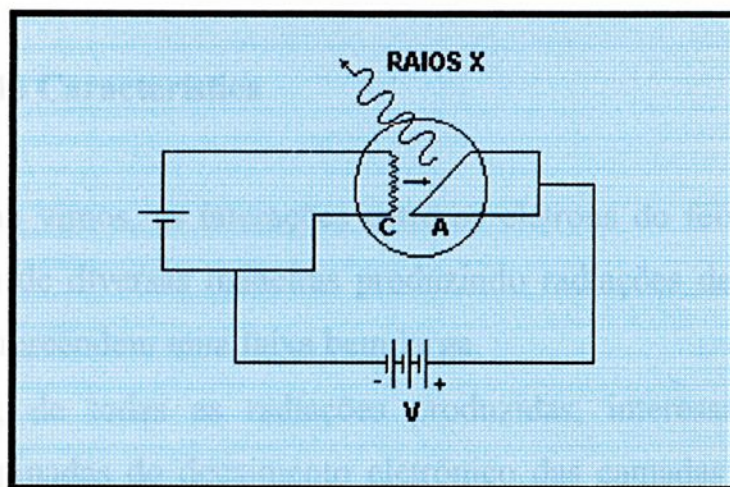


Figura 3.1 - Esquema mostrando a produção de raios X. Elétrons são emitidos termicamente do cátodo C (filamento) aquecido e acelerados em direção ao ânodo A (alvo), pela diferença de potencial V. Os raios X são emitidos do alvo pela desaceleração dos elétrons.

Alguns processos podem ocorrer quando um elétron do feixe penetra pela superfície do alvo e interage com seus átomos. Em geral, os elétrons precisam sofrer muitas colisões antes de perderem toda sua energia e, a cada uma delas, a direção do seu movimento é alterada.

Fundamentalmente, os elétrons podem perder sua energia de duas maneiras diferentes: perda por colisão e/ou por radiação. Na primeira, estão envolvidos os elétrons dos alvos e na segunda, os núcleos.

Na perda por colisão, os elétrons das camadas mais interiores do alvo são arrancados deixando estes átomos num estado altamente excitado ou mesmo ionizados. Durante a volta ao estado fundamental, um conjunto de fótons de alta energia são emitidos contribuindo para o espectro de raios X.

Já o processo de perda por radiação ocorre nos núcleos dos átomos do alvo, em que da interação elétron-núcleo, toda energia cinética do elétron do feixe ou parte dela pode ser convertida em radiação pela desaceleração. Esse processo é conhecido como *bremsstrahlung* e a radiação produzida forma o espectro contínuo.

3.4 - Radiação Característica

Como vimos, as interações entre os elétrons do feixe e os átomos do alvo ocorrem de diversas maneiras produzindo radiações de comprimentos de onda que compreendem uma faixa bem larga.

Mas, de todas as radiações produzidas, interessam-nos apenas as radiações originadas do decaimento eletrônico das camadas mais internas dos átomos, ou seja, das radiações características. Essas radiações são conseguidas quando elétrons do feixe, com energia suficiente, conseguem arrancar os elétrons das camadas internas dos átomos do alvo e elétrons de outras camadas ocupam o seu lugar. Essas energias são também características do material que compõe o alvo. Especificamente, trabalharemos com radiação $\text{Cu } k_{\alpha}$ (radiação k_{α} do cobre) tendo em vista a alta intensidade conseguida, além da obtenção de um feixe aproximadamente monocromático de raios X.

A radiação k é produzida quando um elétron desta camada é ejetado e posteriormente ocupado por um elétron de outras camadas. Se as vacâncias forem preenchidas por elétrons das camadas L_{III} (subcamada III da camada L) então dizemos que a radiação produzida é $k_{\alpha 1}$ e a energia radiada será a diferença entre as energias das duas camadas. Da mesma forma, se o preenchimento ocorrer por elétrons da camada M_{III} a radiação produzida será dita $k_{\beta 1}$, e assim por diante.

As radiações características aparecem como picos no espectro contínuo, conforme figura 3.2 (Cullity, 1978).

Em particular, trabalharemos com as radiações $\text{Cu } K_{\alpha}$, que na prática, são conseguidas utilizando filtro de níquel na saída do tubo de raios X.



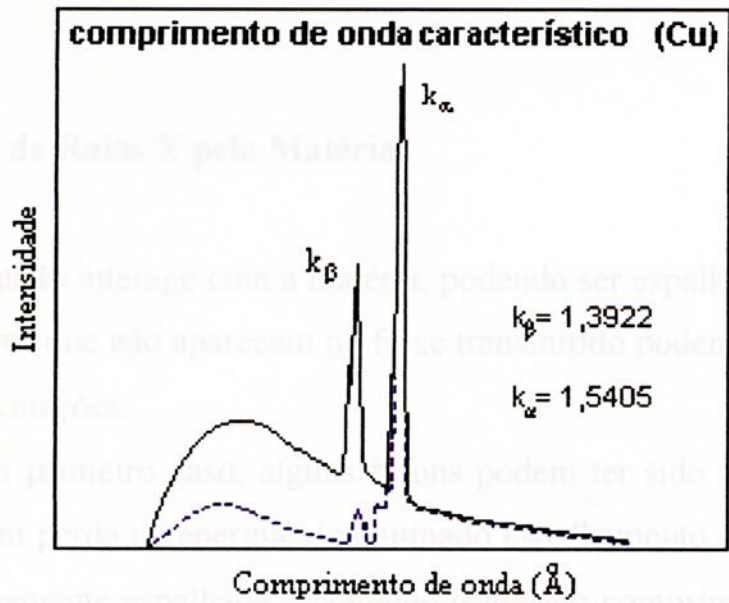


Figura 3.2 - Espectro de radiação de raios X emitidos por um tubo de cobre. (—) espectro contínuo; (- - - -) região de atuação do filtro.

3.5 - Intensidade de um Feixe de Raios X

Em um experimento de SAXS, todas as informações possíveis conseguidas das amostras em análise são obtidas a partir de um gráfico de intensidade em função do ângulo em que o feixe incidente foi espalhado.

Essa intensidade é definida como o fluxo de energia com que um feixe de raios X paralelos atravessa perpendicularmente uma unidade de superfície por segundo. Para uma onda plana monocromática, a intensidade é proporcional ao quadrado da amplitude da vibração.

Em termos de intensidade absoluta uma maneira prática de obter a intensidade é determinar o número de fótons emitidos por segundo (Guinier, 1963).

3.6 - Absorção de Raios X pela Matéria

A radiação interage com a matéria, podendo ser espalhada ou absorvida por ela. Os fótons que não aparecem no feixe transmitido podem ter sido sujeitos a várias transformações.

Em um primeiro caso, alguns fótons podem ter sido apenas desviados de seu curso sem perda de energia, denominado espalhamento coerente, sendo a radiação simplesmente espalhada, mantendo o mesmo comprimento de onda da radiação incidente.

Em um outro processo, por efeito Compton ou incoerente, os fótons mudam sua direção perdendo parte de sua energia e consequentemente, aumentando seu comprimento de onda. Esse processo será estudado com mais detalhes no apêndice A, com o objetivo de mostrar que esse espalhamento é desprezível para ângulos de espalhamento pequenos.

Ainda, fótons de determinadas energias podem interagir com os elétrons dos átomos, por efeito fotoelétrico, deixando-os num estado excitado. Ao retornarem aos seus estados fundamentais, as radiações são emitidas em comprimentos de onda que são característicos dos átomos excitados.

Em particular, para baixos ângulos, somente o espalhamento coerente é considerado, tendo em vista que os outros processos são desprezíveis (Glatter e Kratky, 1982).

Figura 4.1 - Espalhamento de uma onda por um elétron livre

CAPÍTULO 4 - TEORIA DE SAXS

4.1 - Espalhamento por um Elétron Livre

Vamos considerar o espalhamento de um feixe paralelo de raios X de intensidade I_0 , por um elétron livre. Seja uma onda plano-polarizada propagando-se na direção Ox , com um vetor campo elétrico $\vec{E}_0$, incidindo sobre um elétron situado na origem do sistema de referência. Este elétron oscila porque está sujeito a uma aceleração de amplitude :

$$\vec{\gamma} = \vec{E}_0 e / m$$

4.1

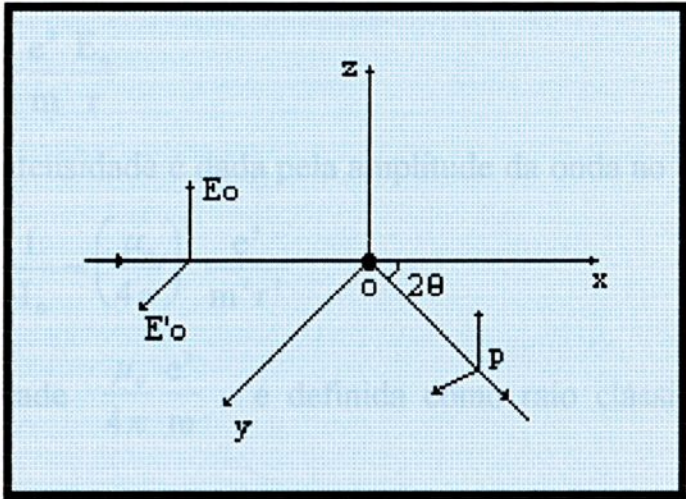


Figura 4.1 - Espalhamento de uma onda por um elétron livre.

De acordo com a teoria eletromagnética clássica, um elétron acelerado emite radiação eletromagnética cujo vetor campo elétrico num dado ponto P é:

$$\vec{E} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e}{r} \sin \varphi \right) \vec{\gamma} \quad 4.2$$

em que: r - distância OP

φ - ângulo entre OP e a direção de aceleração do elétron

μ_0 - permeabilidade magnética ($4\pi \cdot 10^{-7} \text{ T m / A}$)

e - carga do elétron ($1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$)

$$\text{Assim, } E = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e^2}{m} \frac{E_0}{r} \sin \varphi \quad 4.3$$

Porém, a onda espalhada é π radianos fora de fase com a onda incidente.

Se primeiramente E_0 estiver direcionado ao longo de Oz, φ será igual a 90° , e portanto:

$$E_{\perp} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e^2}{m} \frac{E_0}{r} \quad 4.4$$

Como a intensidade é dada pela amplitude da onda ao quadrado, tiramos

$$\text{que } \left(\frac{E_{\perp}}{E_0} \right)^2 = \frac{I_{\perp}}{I_0} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{e^4}{m^2 r^2} \quad 4.5$$

A quantidade $\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e^2}{m}$, é definida como raio clássico do elétron, r_e .

$$\text{Assim, } I_{\perp} = \frac{r_e^2}{r^2} I_0 \quad 4.6$$

Vamos assumir agora que o vetor campo elétrico da onda incidente, E_0' , esteja no plano xOy. Dessa forma, $\varphi = 90^\circ + 2\theta$, e da expressão (4.3), calculamos,

$$E_{//} = \frac{r_e^2}{r^2} E_o' \sin (90^\circ + 2\theta) \quad 4.7$$

$$E_{//} = \frac{r_e^2}{r^2} E_o' \cos 2\theta \quad 4.8$$

$$\left(\frac{E_{//}}{E_o} \right)^2 = \frac{I_{//}}{I_0} = \frac{r_e^2}{r^2} \cos^2 2\theta \quad 4.9$$

A intensidade será:

$$I_{//} = \frac{r_e^2}{r^2} I_0 \cos^2 2\theta \quad 4.10$$

Para um feixe em que a polarização não é especificada, o cálculo é feito decompondo o feixe em dois outros, em que o vetor campo elétrico seja perpendicular e paralelo, respectivamente, ao plano de incidência, e nas proporções, $k_{\perp}$ e $k_{//}$. A intensidade espalhada será então:

$$I_e = \frac{r_e^2}{r^2} I_0 (k_{\perp} + k_{//} \cos^2 2\theta) \quad 4.11$$

Se, em particular, o feixe incidente não é polarizado, $k_{\perp} = k_{//} = \frac{1}{2}$, e a equação (4.11) fica:

$$I_e = \frac{r_e^2}{r^2} I_0 \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \quad 4.12$$

A equação (4.12) é conhecida como fórmula de Thomson (Guinier, 1963).



4.2 - Espalhamento por uma Partícula

A técnica de saxs é utilizada em estudos das características estruturais de partículas de tamanho coloidal. Os raios X são espalhados por elétrons e vamos restringir nossas considerações apenas a espalhamento coerente, já que espalhamento incoerente ou Compton é desprezível para SAXS, conforme mostrado anteriormente.

Coerência significa que as ondas são espalhadas sem mudança de energia em relação à onda incidente, sendo as amplitudes dessas ondas adicionadas, e a intensidade dada pelo quadrado da amplitude resultante. As amplitudes são de igual magnitude e diferem apenas em sua fase φ , que depende da posição do elétron no espaço. Por conveniência, vamos representar as ondas espalhadas na forma complexa: $e^{i\varphi}$, sendo a fase φ igual a $2\pi/\lambda$, vezes a diferença no caminho óptico em relação a um ponto de referência arbitrário.

Vamos considerar um feixe monocromático paralelo de raios X incidindo sobre dois centros espalhadores O e M, vamos calcular a radiação espalhada resultante numa dada direção, conforme esquematizado na figura 4.2.

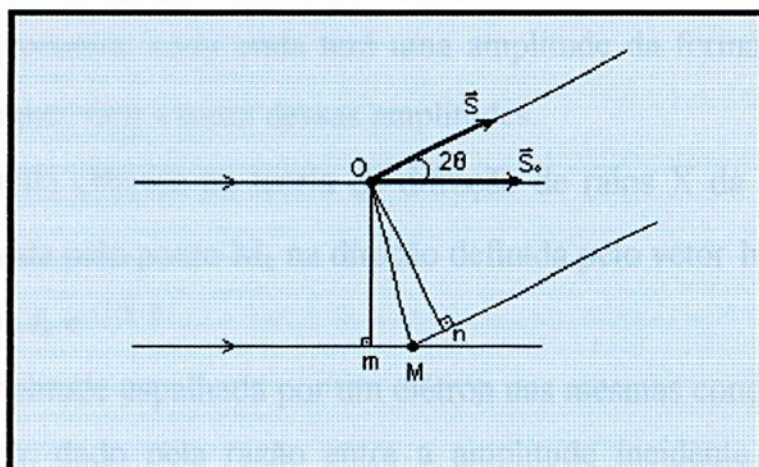


Figura 4.2 - Difração por uma partícula.

Vamos denotar a direção do feixe incidente e espalhado pelos vetores unitários $\vec{S}_0$ e $\vec{S}$, respectivamente.

A diferença de fase entre as ondas emitidas vai depender das respectivas posições entre os dois centros espalhadores. A onda incidente em M percorre um caminho maior dado por $\delta = \overline{mM} + \overline{Mn}$, sendo m e n a projeção de O sobre os raios que atravessam M.

Vetorialmente :

$$\overline{mM} = \vec{S}_0 \cdot \vec{r}$$

$$\overline{Mn} = - \vec{S} \cdot \vec{r}$$

$$\delta = - \vec{r} \cdot (\vec{S} - \vec{S}_0)$$

Portanto, a diferença de fase será:

$$\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \delta \Rightarrow \varphi = - 2\pi \vec{r} \cdot \frac{\vec{S} - \vec{S}_0}{\lambda}$$

Podemos ainda, definir o vetor $\vec{s} = \frac{\vec{S} - \vec{S}_0}{\lambda}$, ou ainda o vetor $\vec{h} = 2\pi \vec{s}$.

Assim, $\varphi = - \vec{h} \cdot \vec{r}$.

Dessa maneira, cada onda terá uma amplitude da forma $e^{-i \vec{h} \cdot \vec{r}}$, e a amplitude resultante será a soma dessas amplitudes.

A fórmula clássica na teoria de difração de raios X dá a amplitude da radiação espalhada pelo ponto M_k na direção definida pelo vetor $\vec{h}$ como:

$$A_k = A_e f_k e^{-i \vec{h} \cdot \vec{r}} \quad 4.13$$

onde, A_e é a amplitude espalhada por um elétron nas mesmas condições; f_k , fator de espalhamento, dado pela razão entre a amplitude incidente e a amplitude espalhada.

A amplitude total de radiação espalhada por uma partícula é então,

$$A(h) = \sum_k A_k = A_e(h) \sum_k f_k e^{-i \vec{h} \cdot \vec{r}} \quad 4.14$$

Vamos considerar uma partícula que possui um centro de simetria, onde está localizada a origem. Então, para cada vetor $\vec{r}$, existe um outro, $-\vec{r}$. Dessa maneira, podemos simplificar a expressão (4.14) para:

$$A(h) = A_e(h) \sum_k f_k \cos \vec{h} \cdot \vec{r} \quad 4.15$$

Podemos definir o fator de estrutura de uma partícula como a razão entre a amplitude total espalhada pela amplitude da radiação espalhada por um elétron sob as mesmas condições:

$$F(\vec{h}) = \frac{A(\vec{h})}{A_e(\vec{h})} = \sum_k f_k \cos \vec{h} \cdot \vec{r} \quad 4.16$$

A intensidade espalhada será então:

$$I(\vec{h}) = |A(\vec{h})|^2 = I_e(\vec{h}) \cdot F^2(\vec{h}) = I_e(\vec{h}) \cdot \left[\sum_k f_k \cos \vec{h} \cdot \vec{r} \right]^2 \quad 4.17$$

$$\text{Em que } I_e(\vec{h}) = |A_e(\vec{h})|^2$$

O fator de espalhamento f_k varia com h , mas para baixos ângulos, pode ser considerado constante. Considerando um grande número de centros

espalhadores e o fato de que um único elétron não pode ser localizado, será conveniente introduzir o conceito de densidade eletrônica, que pode ser definida como sendo o número de elétrons por unidade de volume, e denotado por $\rho(r)$. Assim, um elemento de volume dv na posição r conterá $(\rho(r) \cdot dv)$ elétrons, que também está relacionado com o fator de espalhamento (Guinier, 1963).

Agora nosso centro espalhador poderá ser um elétron ou mesmo uma densidade eletrônica contidos em um meio que permite-lhes movimentar-se, como em solução. Esses movimentos podem ser descritos como uma soma de translações e rotações. As translações não produzem efeitos na intensidade espalhada. Apenas as rotações intervêm nos cálculos de uma intensidade média.

$$\overline{I(\vec{h})} = I_e(h) \overline{F^2(\vec{h})} \quad 4.18$$

Para uma partícula esfericamente simétrica, temos que $\overline{F^2(\vec{h})} = \overline{F(\vec{h})}^2$.

$$\overline{F^2(\vec{h})} = \sum_k \sum_j f_k f_j \overline{\cos \vec{h} \cdot \vec{r}} \quad 4.19$$

O termo $\overline{\cos \vec{h} \cdot \vec{r}} = \frac{\text{sen}(hr)}{hr}$, conforme mostrado no apêndice B.

Então,

$$\overline{F^2(\vec{h})} = \sum_k \sum_j f_k f_j \frac{\text{sen}(hr)}{hr} \quad 4.20$$

Para partículas com distribuição contínua de pontos de espalhamento e densidade $\rho(r)$, podemos generalizar a expressão como segue:

$$\overline{F(h)} = \int_v \rho(r) \frac{\text{sen}(hr)}{hr} \cdot dv \quad 4.21$$

ou
$$\overline{F(h)} = \int_0^\infty \rho(r) \frac{\text{sen}(hr)}{hr} \cdot 4\pi r^2 dr \quad 4.22$$

Assim, para determinarmos a intensidade média, conforme (4.18), devemos encontrar $\overline{F^2(\vec{h})}$, e a expressão fica:

$$\overline{F^2(\vec{h})} = \int_v \int_v \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_2) \frac{\sin h(\vec{r}_2 - \vec{r}_1)}{h(\vec{r}_2 - \vec{r}_1)} dv_1 dv_2 \quad 4.23$$

Sendo $\vec{r}_2 - \vec{r}_1 = \vec{r}$, com $|\vec{r}| = r$ ou $\vec{r}_2 = \vec{r}_1 + \vec{r}$.

Em coordenadas esféricas, $dv_2 = r^2 d\omega dr$, e a equação (4.23) torna-se:

$$\overline{F^2(\vec{h})} = \int_v \left\{ \rho(\vec{r}_1) \int_v \rho(\vec{r}_1 + \vec{r}) \frac{\sin(hr)}{hr} r^2 d\omega dr \right\} dv_1 \quad 4.24$$

Considerando que $\rho(\vec{r}_1 + \vec{r})$ é igual a ρ se o ponto $\vec{r}_1 + \vec{r}$ está dentro da partícula e, zero fora dela, determinamos:

$$\int_v \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_1 + \vec{r}) dv_1 = \rho^2 V(\vec{r}) \quad 4.25$$

Se considerarmos uma partícula com um deslocamento r sobre si mesma, determinamos $V(\vec{r})$, que é o volume comum às duas “imagens”. $V(\vec{r})$ é função da direção do vetor $\vec{r}$, cujo valor médio será $\overline{V(\vec{r})}$.

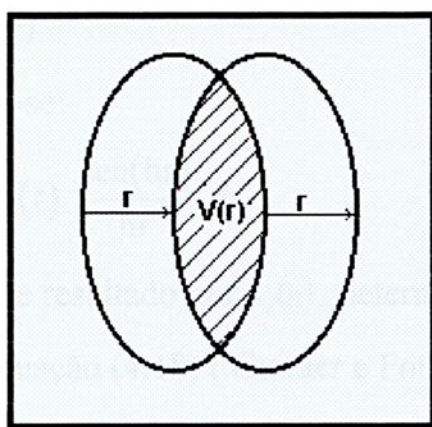


Figura 4.3 - Representação da função $V(r)$.

Podemos agora resolver a equação (4.24):

$$\overline{F^2(\vec{h})} = \rho^2 \int_0^{4\pi} d\omega \int_0^\infty \overline{V(\vec{r})} \frac{\text{sen}(hr)}{hr} r^2 dr \quad 4.26$$

$$\overline{F^2(\vec{h})} = \rho^2 \int_0^\infty \overline{V(\vec{r})} \frac{\text{sen}(hr)}{hr} 4\pi r^2 dr \quad 4.27$$

Vamos introduzir a função característica $\gamma(r)$, que representa a probabilidade de que um ponto situado a uma distância r , em uma direção arbitrária, de um dado ponto da partícula pertença à mesma. Essa função é usualmente normalizada para unidade na distância $r = 0$, isto é,

$$\gamma_0(r) = \frac{\gamma(r)}{\gamma(0)}$$

E ainda, definimos:

$$\gamma_0(r) = \frac{\overline{V(r)}}{\overline{V(0)}} = \frac{\overline{V(r)}}{V} \quad 4.28$$

Substituindo (4.28) em (4.27) :

$$\overline{F^2(\vec{h})} = V \rho^2 \int_0^\infty \gamma_0(r) \frac{\text{sen}(hr)}{hr} 4\pi r^2 dr \quad 4.29$$

Então, podemos definir a função distribuição de distâncias $p(r)$, como:

$$p(r) = 4\pi r^2 V \gamma_0(r) \quad 4.30$$

e a expressão (4.29), torna-se:

$$\overline{F^2(\vec{h})} = \rho^2 \int_0^\infty p(r) \frac{\text{sen}(hr)}{hr} dr \quad 4.31$$

Multiplicando esse resultado por $I_e(h)$, determinamos a intensidade $\overline{I(h)}$, conforme proposto pela equação (4.18) (Guinier e Fournet, 1955).



4.3 - Aproximações de Porod e Guinier

O esboço de uma curva de SAXS pode apresentar-se como no esquema mostrado na figura 4.4. Dessa curva podemos destacar duas regiões (assinaladas I e II), sendo uma na região de grandes ângulos e a outra na de ângulos pequenos.

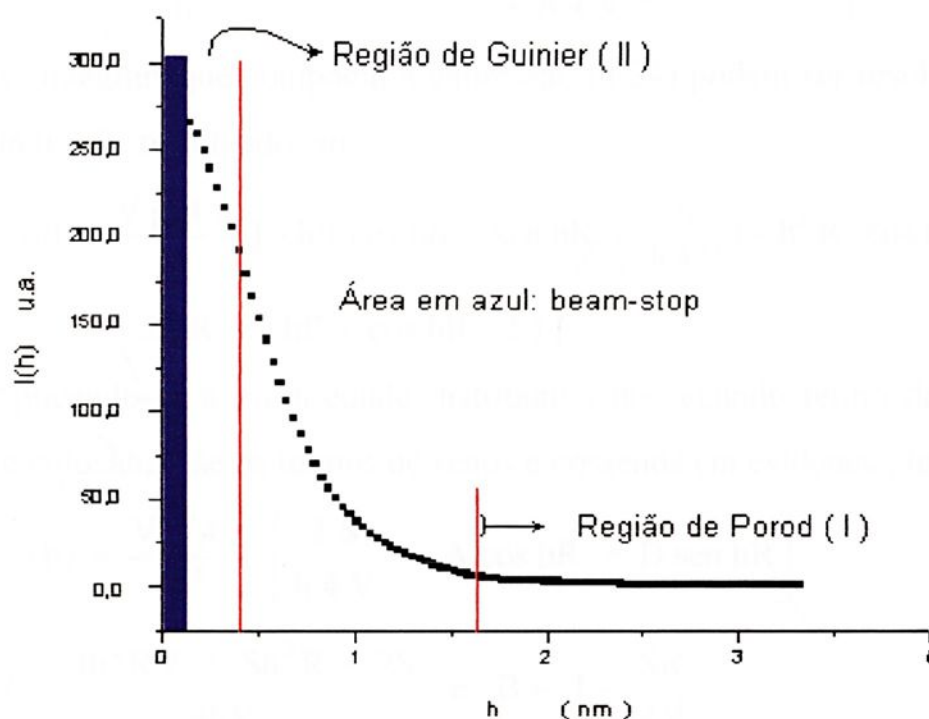


Figura 4.4 - Curva de espalhamento representando as regiões de Porod e Guinier.

A região I ou região de Porod pode ser obtida pela aproximação de $\gamma_0(r)$ a uma série (Guinier e Fournet, 1955) considerando-se apenas os dois primeiros termos, dada por:

$$\gamma_0(r) = 1 - \frac{S r}{4 V} + \dots \quad 4.32$$

Substituindo (4.32) em (4.29), temos:

$$\begin{aligned}\overline{F^2(h)} &= V \rho^2 \int_0^\infty \left(1 - \frac{Sr}{4V}\right) \frac{\sin(hr)}{hr} \cdot 4\pi r^2 dr = \\ &= \frac{V \rho^2 4 \pi}{h^3} \left[\int_0^\infty \sin(hr) \cdot hr \cdot h dr - \frac{S}{h 4 V} \int_0^\infty h^2 r^2 \sin(hr) \cdot h dr \right] \quad 4.33\end{aligned}$$

Fazendo $y = hr$, $dy = h dr$, com $0 \leq y \leq u$, temos:

$$\overline{F^2(h)} = \frac{V \rho^2 4 \pi}{h^3} \left[\int_0^u y \sin y dy - \frac{S}{h 4 V} \int_0^u y^2 \sin y dy \right] \quad 4.34$$

As integrais que compõem a expressão (4.34) podem ser resolvidas por partes, com $u = R$, resultando em:

$$\begin{aligned}\overline{F^2(h)} &= \frac{V \rho^2 4 \pi}{h^3} \left[-hR \cos hR + \sin hR - \frac{S}{h 4 V} (-h^2 R^2 \cos hR + \right. \\ &\quad \left. + 2 hR \sin hR + \cos hR - 2) \right]\end{aligned}$$

Aplicando-se a propriedade distributiva no segundo termo dentro dos colchetes e colocando-se os termos de senos e cossenos em evidência, temos:

$$\overline{F^2(h)} = \frac{V \rho^2 4 \pi}{h^3} \left[\frac{2 S}{h 4 V} + A \cos hR + B \sin hR \right] \quad 4.35$$

$$\text{onde, } A = \frac{-4h^2 R V + S h^2 R - 2S}{4hV} \text{ e } B = 1 - \frac{SR}{2V}$$

Para valores grandes de h os termos em senos e cossenos podem ser desprezados, resultando na expressão (4.36), conhecida como Lei de Porod.

$$\overline{F^2(h)} = \frac{2 \pi S \rho^2}{h^4} \quad 4.36$$

A região II ou região de Guinier também pode ser obtida por aproximação, desta vez, para valores de h pequenos.

Podemos expandir o termo $\frac{\sin hr}{hr}$ em uma série ficando então,

$$\frac{\sin(hr)}{hr} = 1 - \frac{h^2 r^2}{6} + \frac{h^4 r^4}{120} - \dots \quad 4.37$$

Para valores pequenos de h , podemos substituir os dois primeiros termos da (4.37) em (4.29), obtendo:

$$\overline{F^2(h)} = V \rho^2 \int_0^\infty \gamma_0(r) \left(1 - \frac{h^2 r^2}{6} \right) \cdot 4\pi r^2 dr \quad 4.38$$

$$\overline{F^2(h)} = V \rho^2 \left[\int_0^\infty \gamma_0(r) 4\pi r^2 dr - \int_0^\infty \gamma_0(r) \frac{h^2 r^4}{6} 4\pi dr \right]$$

A primeira integral é o próprio volume V e assim,

$$\overline{F^2(h)} = V^2 \rho^2 \left[1 - \frac{h^2}{6V} \int_0^\infty 4\pi r^4 \gamma_0(r) dr \right] \quad 4.39$$

Em analogia com a mecânica, escrevemos o raio de giração como

$$R_g^2 = \frac{1}{2V} \left[\int_0^\infty \gamma_0(r) 4\pi r^4 dr \right] \quad 4.40$$

e a (4.39) torna-se

$$\overline{F^2(h)} = V^2 \rho^2 \left(1 - \frac{h^2 R_g^2}{3} \right) \quad 4.41$$

Da série $e^x = 1 + x + \frac{x^2}{2!} + \dots$, podemos escrever

$$\overline{F^2(h)} = V^2 \rho^2 e^{-\frac{h^2 R_g^2}{3}} \quad 4.42$$

A expressão (4.42) é conhecida como Lei de Guinier.

Assim, para as regiões de pequenos ângulos a função é do tipo exponencial e permite obter uma primeira informação a respeito do raio de giração da partícula.

4.4 - Função Distribuição de Distância $p(r)$ e o Raio de Giração (R_g)

A função distribuição de distância $p(r)$ contém informações sobre o meio espalhador. Ela representa o número de pares de elétrons separados pela distância r , os quais são encontrados pela combinação de qualquer elemento de volume I , com outro, k , da mesma partícula. A função distribuição de distância pode ser obtida a partir de $I(h)$:

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} \gamma(r) r^2 \frac{\sin(hr)}{hr} dr \quad 4.43$$

com $p(r) = \gamma(r) r^2$, ou

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\sin(hr)}{hr} dr \quad 4.44$$

E a transformada de Fourier inversa será:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} I(h) hr \sin(hr) dh \quad 4.45$$

e o raio de giração R_g pode ser escrito como:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{\infty} p(r) r^2 dr}{2 \int_0^{\infty} p(r) dr} \quad 4.46$$

O raio de giração dado pela expressão acima oferece a vantagem de ser calculado usando toda a curva de intensidade de espalhamento, ao contrário do método de Guinier, o qual só é válido para a região onde $h \rightarrow 0$.

CAPÍTULO 5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.2 - Procedimento Experimental

5.1 - A Técnica de SAXS

5.2.1 - Calibração do Aparelho de Raios X

5.1.1 - Introdução

Para a análise das macromoléculas em solução foram utilizados feixes incidentes. O equipamento utilizado nas coletas dos dados de SAXS foi um gerador de raios X com ânodo rotatório, RIGAKU “rotaflex” RU 300, com capacidade máxima de 18 kW (60 kV - 300 mA). A fonte de raios X permite operação com alta potência e estabilidade na saída, possibilitando redução do tempo de exposição à radiação durante a coleta dos dados.

O gerador possui um sistema de janelas (direita e esquerda) de saída de feixes de raios X de dois perfis, linha e ponto, permitindo seu uso simultâneo em diferentes técnicas.

Em particular, para as nossas medidas utilizamos alvo de cobre e selecionamos radiação K_{α} com $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$, através de filtro de Ni de 20 μm , para eliminação da radiação K_{β} . A potência do aparelho escolhida foi de 5 kW (50 kV - 100 mA).

Os feixes de raios X possuem perfis em forma de um fino retângulo, conseguido através de um sistema de colimação por blocos (colimação Kratky) (Glatter e Kratky, 1982). O feixe assim colimado é incidido diretamente sobre as amostras em solução que estão colocadas dentro de capilares de vidro, durante um determinado tempo.

O espalhamento foi registrado por um detetor acoplado a um sistema eletrônico e um multicanal-analisador. Os dados coletados são registrados em computador, possibilitando a obtenção de um gráfico de intensidade (número de fótons) por ângulo de espalhamento (canal do detetor).



5.2 - Procedimento Experimental

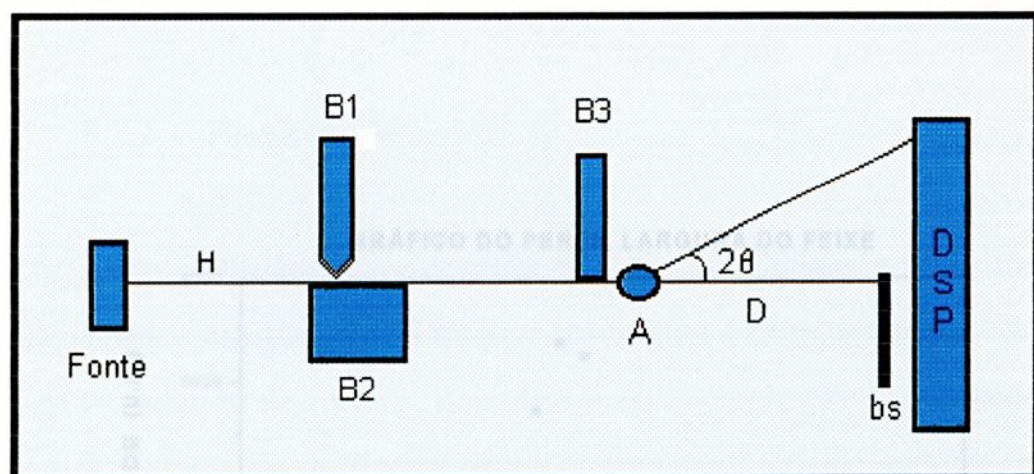
5.2.1 - Calibração do Aparelho de Raios X

Para a análise das macromoléculas em solução foram utilizados feixes incidentes com seção transversal em forma de retângulos de aproximadamente (30mm x 1mm), para possibilitar uma maior intensidade do feixe, exigida nesse tipo de estudo (Glatter e Kratky, 1982).

Os feixes com esses perfis foram conseguidos através de um sistema de colimação de Kratky ou simplesmente “câmara de Kratky”. Esse sistema, além de gerar feixes primários com as características descritas anteriormente, também possuem a vantagem de eliminar espalhamento parasita pela utilização de três blocos, conforme mostrado na figura 5.1. Em sistemas mais simples, com dois blocos apenas, estes espalhamentos são intensos, principalmente nas regiões de baixos ângulos (Glatter e Kratky, 1982).

Os blocos B_2 e B_3 possuem superfícies extremamente polidas e são posicionados de tal forma em que o plano de ambos coincidem formando o plano principal H. Um terceiro bloco B_1 , que define a fenda de entrada, é posicionado atrás da janela que separa a câmara de o tubo de raios X, permitindo ajustes em sua posição e sendo ainda esta câmara evacuada, para evitar a atenuação do feixe incidente pelo ar, como também eliminar espalhamento parasita pelo mesmo.

A amostra é colocada diretamente após o sistema de colimação. Na parte final da câmara está o “beam-stop”, que funciona como um anteparo que impede a incidência direta do feixe sobre o sistema de detecção, precavendo contra possíveis danos a esse sistema.



B1, B2 e B3: blocos com superfície polida

A : amostra

D: distância da amostra ao D.S.P.

H : plano principal

D.S.P.: detector sensível à posição

2θ : ângulo de espalhamento

bs : beam-stop

Figura 5.1 - Sistema de colimação por blocos ou sistema de colimação de Kratky (vista lateral).

Na prática a colimação é feita visualmente pelo ajuste dos blocos fazendo com que o feixe incida sobre uma tela fluorescente.

Feito isto, com o aparelho em baixa potência (20 kW - 10 mA) e utilizando-se filtros de Ni na saída do tubo e com o sistema de vácuo ligado, faz-se a leitura das intensidades de todo o perfil do feixe, tanto no sentido do comprimento quanto da largura.

Os gráficos referentes à calibração realizada antes das medidas de espalhamento a baixos ângulos que compõem este trabalho podem ser vistos na figura 5.2.

Figura 5.2 - Gráficos do perfil do feixe. (a) largura, (b) comprimento.

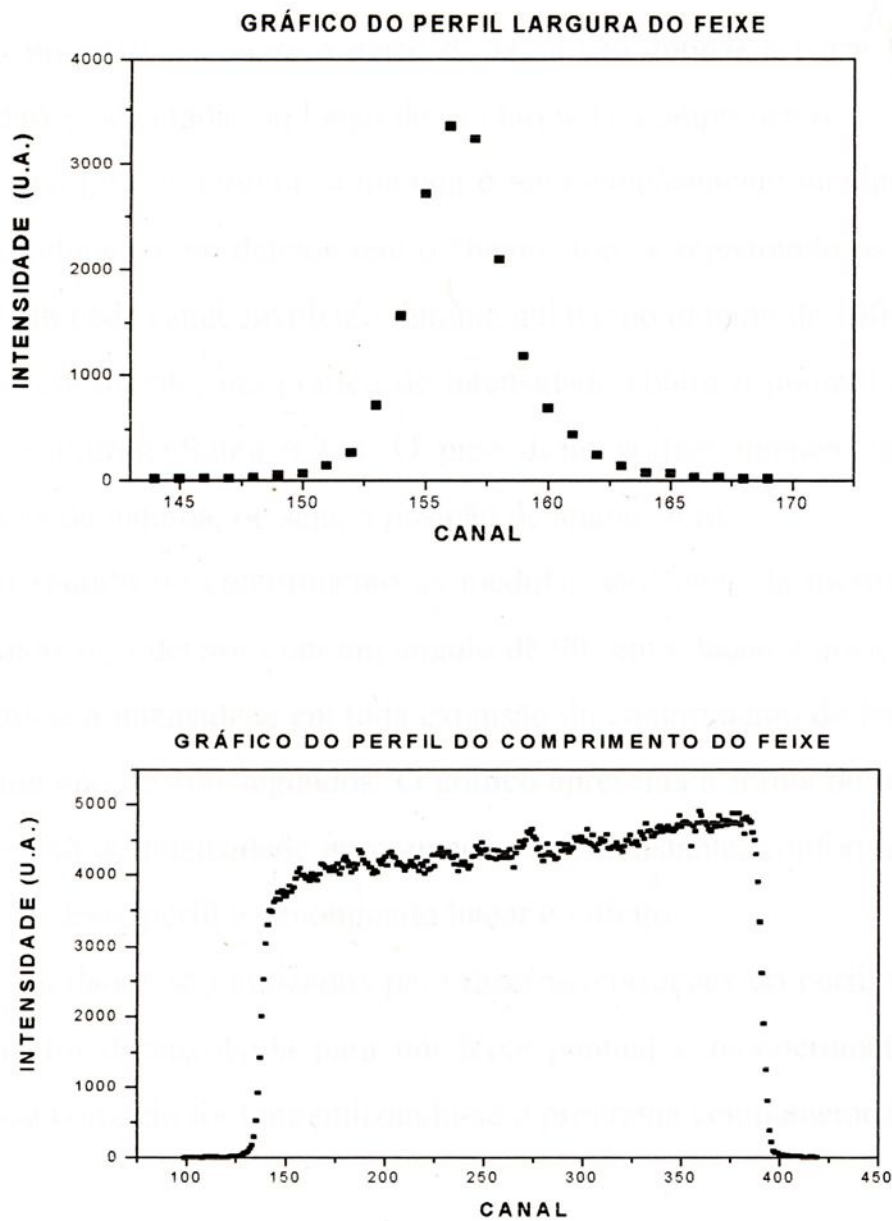


Figura 5.2 - Gráficos do perfil do feixe. (a) largura, (b) comprimento.

5.2.2 - Perfil do Feixe

As informações sobre o perfil do feixe são obtidas a partir do registro das intensidades detectadas ao longo de sua largura e comprimento.

No sentido da largura a medida é feita simplesmente incidindo o feixe de raios-x diretamente no detetor sem o “beam-stop” e registrando os valores da intensidade em cada canal envolvido durante um tempo mínimo de 100 segundos.

Posteriormente, um gráfico de intensidade contra o número de canal é construído, conforme figura 5.2 a. O pico deste gráfico também determina a posição inicial de medida, ou seja, a posição de ângulo zero.

No sentido do comprimento as medidas são feitas da mesma maneira, apenas girando-se o detetor com um ângulo de 90° em relação à posição original e registrando-se a intensidade em toda extensão do comprimento do feixe durante um tempo mínimo de 100 segundos. O gráfico apresenta a forma de um patamar com uma região de intensidade aproximadamente constante, conforme mostrado na figura 5.2b. Esse perfil é denominado linear e infinito.

Esses dados são utilizados para fazer as correções do perfil do feixe já que a teoria foi desenvolvida para um feixe puntual e monocromático. Neste trabalho, essa correção foi feita utilizando-se o programa computacional ITP.

5.2.3 - O Detetor

Para o registro da intensidade em função do ângulo de espalhamento utilizamos um detetor a gás, sensível à posição (PSD). Este detetor registra a posição de incidência de cada fóton sobre um filamento que está contido em seu interior.

A origem do sinal está na interação por efeito fotoelétrico da passagem do fóton pelo interior do gás que ioniza-o gerando um outro elétron que é coletado por um eletrodo.

O detetor consiste essencialmente de uma câmara de gás onde eletrodos são colocados de maneira a estabelecer um campo elétrico que acelera os elétrons em direção a um circuito coletor de cargas. Esses elétrons geram outros elétrons devido ao choque com as moléculas de gás ao longo de seu caminho, produzindo um fenômeno conhecido como “avalanche”. Isto produz uma alta densidade de carga na superfície do filamento do detetor, propiciando assim, a localização necessária na medida da posição.

Quando a magnitude do campo elétrico é tal que a energia da carga-avalanche é linearmente proporcional à energia do fóton incidente, o detetor é dito operar no modo “proporcional”.

Após os elétrons incidirem no filamento, geram dois sinais que vão por dois caminhos diferentes. Esses sinais chegam ao seu destino em tempos diferentes e é essa diferença que determina a posição de incidência.

O detetor além de determinar a posição ainda fornece o valor da intensidade através de um circuito somador-discriminador de pulsos. Como resposta, temos uma curva de espalhamento cuja intensidade será dada em unidades arbitrárias, devido a essa intensidade ser uma medida proporcional a

energia do fóton incidente (em nosso caso aproximadamente 8 eV) (Barbosa, 1994).

Assim, é construído um gráfico de intensidade em unidade arbitrárias, que na prática chamamos “contagens”, em função da posição de incidência do fóton sobre o filamento, que chamamos “canal”.

Mas, como trabalhamos em “unidades de h” faz-se necessária a conversão das unidades. Para isso, um gráfico de linearidade é construído da seguinte forma: com o detetor na posição normal (filamento na vertical) faz-se sucessivas medidas em tempos iguais (100 s), deslocando-o de 5 em 5 mm e anotando-se o valor das intensidades dos picos de cada medida. Então, um gráfico de número de canal contra a posição em milímetros é construído (ver figura 5.3).

Da inclinação da reta tiramos o fator de conversão de canal para posição em milímetros, possibilitando assim conhecer a distância, em milímetros, entre dois canais adjacentes.

Com base na figura 5.4, podemos agora converter canal para ângulo de espalhamento 2θ , simplesmente pela expressão $\text{tg } 2\theta = b/a$, e usando a aproximação de $\text{tg } 2\theta \cong \text{sen } 2\theta \cong 2\theta$, para ângulos pequenos.

$$\text{Sendo assim, } h = \frac{4 \pi \text{ sen } \theta}{\lambda} \cong \frac{2\pi(2\theta)}{\lambda} = \frac{2\pi b}{\lambda a} \quad (\text{ver apêndice C}).$$

O valor de “a” é obtido pela medida direta da distância entre amostra e detetor, que em nosso caso é 240 mm . O valor de “b” pode ser determinado pelo coeficiente angular da reta do gráfico da figura 5.3. A distância entre dois canais consecutivos é 0,213 mm, que multiplicado pelo n-ésimo canal (N_c) dá a distância, em milímetro, desse canal ao canal zero.



Dessa forma, a expressão para conversão de número de canal (N_c) para unidades de h encontrada foi $h = 0,003616 N_c$.

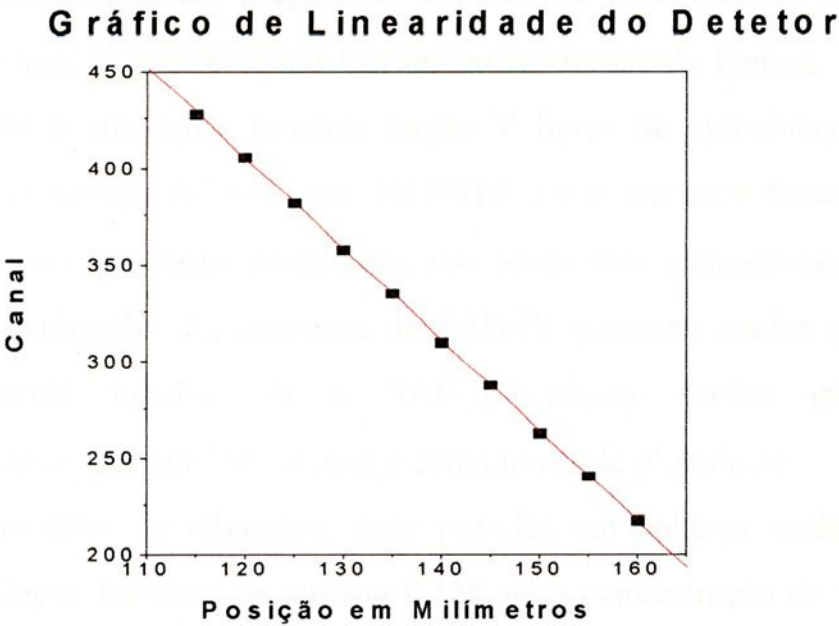


Figura 5.3 - Gráfico de linearidade do detetor para conversão de número de canal para unidades de h .

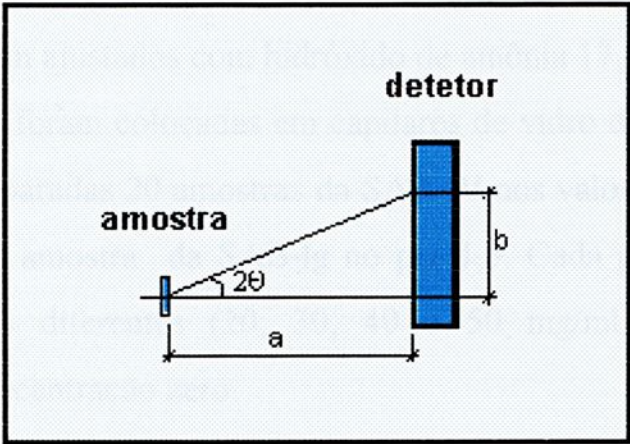


Figura 5.4 - Esquema mostrando a relação entre distâncias entre canais e o ângulo de espalhamento.

5.2.4 - As Amostras

As amostras foram preparadas a partir de albuminas liofilizadas. As albuminas bovinas fração V (SAB-fV) utilizadas foram da Pentex, código 81-003-2, lote 461 e albuminas bovinas fração V livres de globulinas (SAB-lg) foram da Sigma, código A-7638, lote 16H9314. Estas amostras foram utilizadas da mesma maneira que foram compradas, não tendo sido efetuado nenhum outro processo de purificação. As amostras de SAB-fV possuem ácidos graxos e/ou alguma globulina ligados. Já a SAB-lg, possui ácidos graxos, não necessariamente os mesmos da anterior e estão livres de globulinas.

As amostras de albumina, após pesadas em balança analítica, foram diluídas em tampão formiato de amônia 0,1M até a concentração de 50 mg/ml e pH desejado. As demais concentrações (40, 30 e 20 mg/ml) foram obtidas através da diluição dessa amostra inicial pela adição de mais tampão.

O tampão formiato de amônia foi preparado a partir de 0,2 ml de ácido fórmico 25,1M adicionando-se água destilada e deionizada até completar 50 ml e os valores de pH foram ajustados com hidróxido de amônia 17,03M.

As amostras foram colocadas em capilares de vidro de diâmetro interno de 1 mm. Foram preparadas 20 amostras da SAB-fV nos valores de pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 e uma amostra da SAB-lg no pH 4,0. Cada pH foi medido em quatro concentrações diferentes (20, 30, 40 e 50 mg/ml) para posterior extrapolação para concentração zero.

A temperatura ambiente foi mantida aproximadamente constante em 20°C pelo uso de aparelhos de ar condicionado.

Para cada um dos valores de pH foram feitos três conjuntos de medidas. No primeiro conjunto, medimos a albumina no pH escolhido e nas quatro



concentrações mencionadas, incluindo medidas do solvente e capilar vazio. Este procedimento foi então repetido por mais duas vezes, com o objetivo de se testar a reprodutividade do experimento.

5.3 - Tratamento dos Dados

5.3.1 - Normalização das curvas de espalhamento experimentais

A teoria de SAXS foi desenvolvida para um sistema constituído de uma única molécula, livre de influências externas. Mas na prática os dados são coletados de proteínas diluídas em solvente contidos em capilares de vidro. Dessa forma é necessário subtrair, das curvas de intensidades obtidas, as contribuições devidas ao solvente e ao capilar.

Para compararmos as diferentes curvas de intensidade, devemos normalizar em relação ao tempo de exposição à radiação, a intensidade do feixe direto e as dimensões dos capilares.

Em nosso caso usamos sempre os mesmos tempos de medidas, ou seja, uma hora, e sempre capilares de mesmas dimensões, 1 mm de diâmetro interno, sendo portanto necessária apenas a normalização pela intensidade do feixe direto.

Devido ao fato da energia do feixe primário ser muito intensa, excedendo a capacidade do detetor, podendo danificá-lo, o uso da amostra padrão Lupolen (Kratky *et al*, 1966) é imprescindível para a determinação do feixe direto.

A escolha do Lupolen como amostra padrão é devido a algumas de suas características como a de ser quimicamente estável e suficientemente homogêneo para dar intensidades constantes e, não sofrer alterações pela exposição à



radiação, mesmo que por longo tempo. Possui uma região linear decrescente (figura 5.5), da qual o cálculo do feixe direto será efetuado.

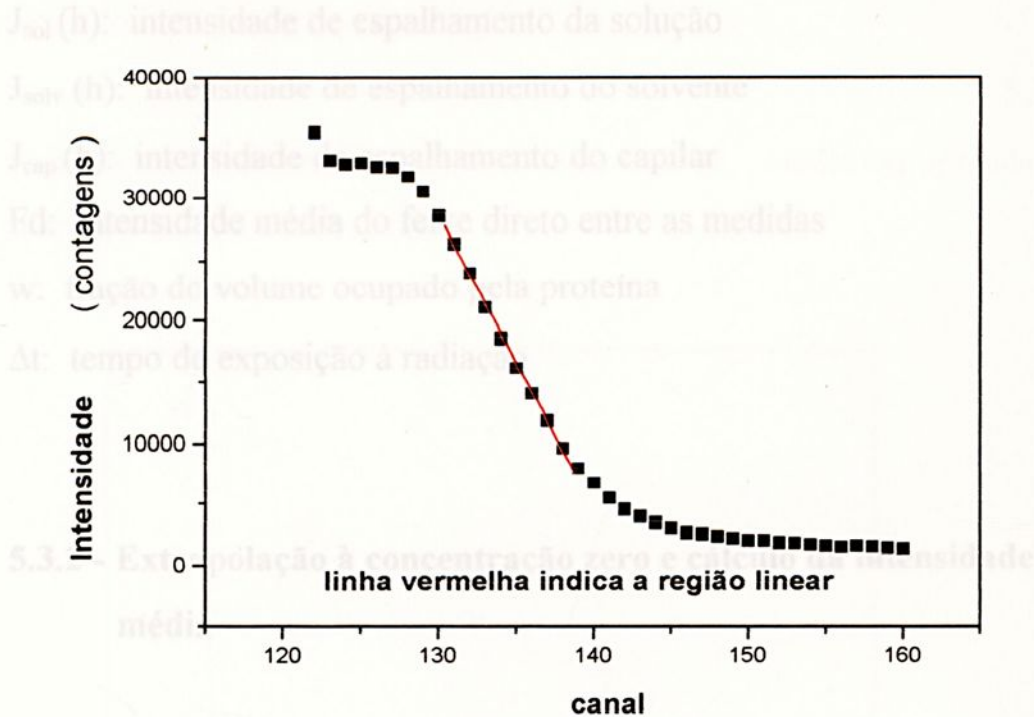


Figura 5.5 - Curva de intensidade de amostra padrão - lupolen - mostrando a região linear de onde é calculada a média aritmética para obtenção do feixe direto.

O cálculo do feixe direto é, então, feito através da média aritmética das intensidades de espalhamento dessa região linear, medidos durante um tempo de 100 s. Estas medidas são feitas imediatamente antes e após as medidas de cada uma das amostras e o feixe direto é determinado pela média dessas intensidades.

$$F_d = \frac{\text{média região linear lupolen inicial} + \text{média região linear lupolen final}}{2}$$

Assim, a expressão para normalização é dada a seguir:

$$J_N(h) = \frac{J_{sol}(h)}{F_{d_{sol}} \Delta t} - (1 - w) \frac{J_{solv}(h)}{F_{d_{solv}} \Delta t} - w \frac{J_{cap}(h)}{F_{d_{cap}} \Delta t} \tag{5.1}$$

onde:

$J_N(h)$: intensidade de espalhamento normalizada

$J_{sol}(h)$: intensidade de espalhamento da solução

$J_{solv}(h)$: intensidade de espalhamento do solvente

$J_{cap}(h)$: intensidade de espalhamento do capilar

F_d : intensidade média do feixe direto entre as medidas

w : fração do volume ocupado pela proteína

Δt : tempo de exposição à radiação

5.3.2 - Extrapolação à concentração zero e cálculo da intensidade média

Como já mencionado anteriormente, toda teoria de SAXS é desenvolvida para sistemas compostos por uma única partícula, e consequentemente, interações interpartículas não são consideradas. Para contornar tal problema, a solução que contém a amostra deve ser suficientemente diluída para diminuir tais efeitos. Mas, soluções desse tipo estão sujeitas a erros estatísticos altos, devido a fraca intensidade espalhada que produzem. Então, devemos medir uma série de concentrações diferentes e extrapolar à concentração zero através de método adequado.

Neste trabalho, realizamos a análise da proteína, para valores de pH variando de 3,0 a 7,0, em quatro concentrações diferentes, repetindo-se estas medidas novamente para formar uma série de três conjuntos, dos quais uma curva de intensidade média é calculada dentre cada uma das concentrações e posteriormente é feita uma extrapolação à concentração zero pelo método dos mínimos quadrados.



A intensidade média é calculada de acordo com a expressão (5.2) de forma a haver um melhor ajuste dessa curva em relação às intensidades experimentais dos três conjuntos (ver figura 5.6).

$$\hat{I}_i = \hat{a}_i + \hat{b} C_j \tag{5.2}$$

Sendo $\hat{I}_i$, a intensidade de um determinado h_i ; $\hat{a}_i$, média extrapolada à concentração zero e C_j , a concentração.

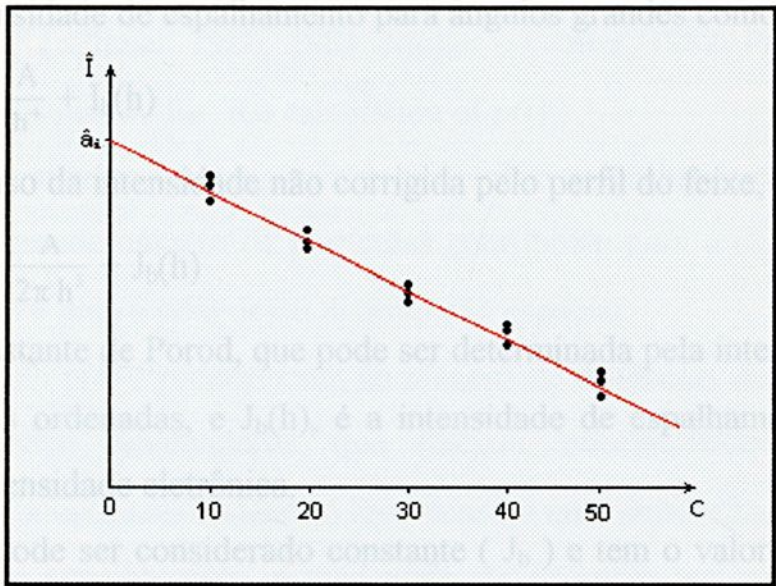


Figura 5.6 - Esquema de cálculo da intensidade média extrapolada à concentração zero para um determinado ângulo h_i .

5.3.3 - Background

A teoria de SAXS é baseada em sistemas de duas fases com densidades eletrônicas diferentes, mas sem flutuações (“background”) dentro de cada uma delas, o que não ocorre nas soluções de proteínas.

Em uma primeira aproximação, o espalhamento “background” pode ser corrigido por um termo constante. Negligenciar a eliminação do “background” leva a fortes oscilações na função $p(r)$ ou a um aumento na $p(r)$ em $r = 0$.

Para sistemas de densidades eletrônicas diferentes, é necessário subtrair do espalhamento experimental a contribuição dessas flutuações. Uma maneira de se fazer essa correção é através do método desenvolvido por Porod (Porod, 1951) e Luzzati (Luzzati, 1960), que baseado na equação (4.36), pode-se escrever a intensidade de espalhamento para ângulos grandes como:

$$I(h) = \frac{A}{h^4} + I_b(h) \tag{5.3}$$

ou ainda, no caso da intensidade não corrigida pelo perfil do feixe, temos:

$$J(h) = \frac{A}{2\pi h^3} + J_b(h) \tag{5.4}$$

onde A é a constante de Porod, que pode ser determinada pela intersecção da reta com o eixo das ordenadas, e $J_b(h)$, é a intensidade de espalhamento devido às flutuações na densidade eletrônica.

$J_b(h)$ pode ser considerado constante (J_b) e tem o valor do coeficiente angular da reta obtida de um gráfico de $J(h) h^3 \times h^3$, conforme indicado no gráfico da figura 5.7.

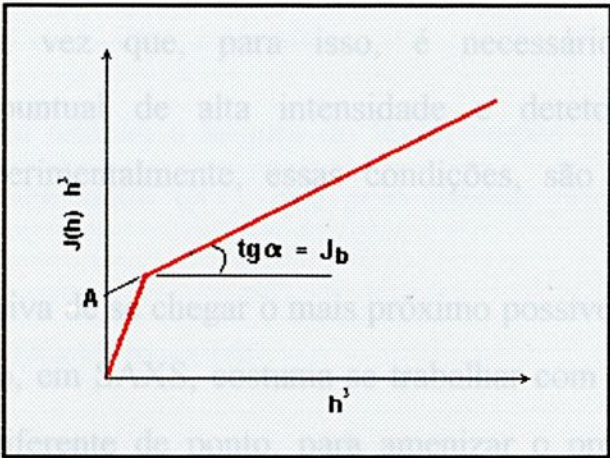


Figura 5.7 - Esboço de gráfico de $J(h) h^3 \times h^3$ representando o afastamento da lei de Porod devido às flutuações da densidade eletrônica da solução.

5.3.4 - Correções finais

O último passo para o tratamento dos dados é a obtenção das funções $I(h)$ e $p(r)$ a partir das curvas de espalhamento experimentais $J(h)$. Das curvas $J(h)$ experimentais devem ser subtraídas as contribuições devidas ao sistema de colimação do feixe. Para isso, utilizamos o método de transformação indireta de Fourier desenvolvido por Glatter, através do programa computacional denominado ITP (Glatter, 1980; 1981; Muller e Glatter, 1982; Pilz *et al*, 1979) (Indirect Transformation for the calculation of $p(r)$).

Nosso sistema restringe-se a partículas monodispersas em solução, sendo que um grande número de partículas contribuem para o espalhamento e o resultado obtido é uma média dessa distribuição espacial.

A função $p(r)$ é proporcional ao número de distâncias de comprimento r entre dois centros espalhadores, que estejam, necessariamente, dentro da partícula. Cada uma dessas distâncias leva consigo uma dependência angular com a intensidade de espalhamento, a qual pode ser expressa matematicamente por meio de uma transformada de Fourier.

Na prática, uma intensidade de espalhamento ideal não pode ser conseguida, uma vez que, para isso, é necessário um feixe primário monocromático puntual de alta intensidade e detetores com capacidades compatíveis. Experimentalmente, essas condições, são impossíveis de serem conseguidas.

Na tentativa de se chegar o mais próximo possível dessas condições, em relação à radiação, em SAXS, costuma-se trabalhar com radiação CuK_{α} , e com uma colimação diferente de ponto, para amenizar o problema da intensidade, conforme mencionado na seção 5.2.1, deste trabalho.



Assim, o programa ITP, além de calcular a função distribuição de distâncias - $p(r)$ - ainda faz as devidas transformações da intensidade experimental, em relação ao comprimento de onda e ao sistema de colimação.

Para as transformações devidas ao sistema de colimação, será considerado que a intensidade da radiação incidente tenha uma distribuição superficial ao longo do perfil do feixe. Vamos designar t como sendo a coordenada do centro do feixe primário na direção do comprimento, e x , a coordenada perpendicular a t . Dessa forma, podemos escrever a intensidade $I_0(t,x)$, como sendo um produto de duas distribuições independentes, tal como:

$$I_0(t,x) = P(t) \cdot Q(x) \quad 5.5$$

Primeiramente vamos analisar a transformação devido ao comprimento do feixe. Para isso, consideraremos inicialmente que a largura do feixe seja infinitamente pequena. Então, o feixe primário, com sua distribuição de intensidade $P(t)$, provoca uma intensidade espalhada $I(m)$, sendo m a medida da distância entre o feixe espalhado e o centro do feixe primário no plano de registro.

Portanto, de acordo com Guinier e Fournet (Guinier e Fournet, 1947 a, b) :

$$I(m) = \int_{-\infty}^{\infty} P(t) I(\sqrt{m^2 + t^2}) dt \quad 5.6$$

Agora, em relação à largura do feixe, vamos considerar que haja uma distribuição de intensidade $Q(x)$, que pelo mesmo princípio do comprimento temos:

$$I'(m) = \int_{-\infty}^{\infty} Q(x) I(m - x) dt \quad 5.7$$

Vale ressaltar que as transformações em relação ao comprimento de onda para feixes monocromáticos não se fazem necessárias, como é o caso deste trabalho.

A intensidade experimental pode ser obtida então, pela expressão:

$$I_{\text{exp}}(h) = 8 \pi \int_{-\infty}^{\infty} dx \int_0^{\infty} dt \int_0^{\infty} dr Q(x) P(t) p(r) \frac{\sin \beta}{\beta} \quad 5.8$$

onde $\beta = r [(h-x)^2 + t^2]^{1/2}$

A função distribuição de distâncias é, então, aproximada por uma série de N funções “B-splines” ($\phi_v(r)$) definida no intervalo $0 \leq r \leq D_{\text{max}}$. D_{max} é um valor estimado para a máxima dimensão D da partícula.

$$\text{Então, } p(r) = \sum_{v=1}^N c_v \phi_v(r) \quad 5.9$$

Os coeficientes c_v são determinados de forma a obter-se um ajuste ótimo dos dados experimentais.

Feitas as transformações, referidas anteriormente, sobre os dados experimentais, obtemos a função $\chi_v(h)$, antes do cálculo da $p(r)$. Sendo que, $\chi_v(h)$ é a transformada de Fourier de $\phi_v(r)$, representando assim, a intensidade corrigida pelos parâmetros já mencionados e definida como,

$$I(h) = \sum_{v=1}^N c_v \chi_v(h) \quad 5.10$$

Os coeficientes c_v são agora determinados pelo método dos mínimos quadrados, tal que ele represente uma ótima aproximação dos dados experimentais, ou seja:

$$\sum_{i=1}^M [I_{\text{exp}}(h_i) - \sum_{v=1}^N c_v \chi_v(h_i)]^2 / \sigma^2(h_i) = \text{mínimo} \quad 5.11$$

onde: M, número de dados experimentais e $\sigma^2(h_i)$, variação do i-ésimo ponto.

A curva de espalhamento corrigida é definida então por:

$$I(h) = \sum_{v=1}^N c_v \psi_v(h)$$

5.12

A figura 5.8 mostra o esquema das transformações referidas feitas através do programa ITP (ver apêndice D).

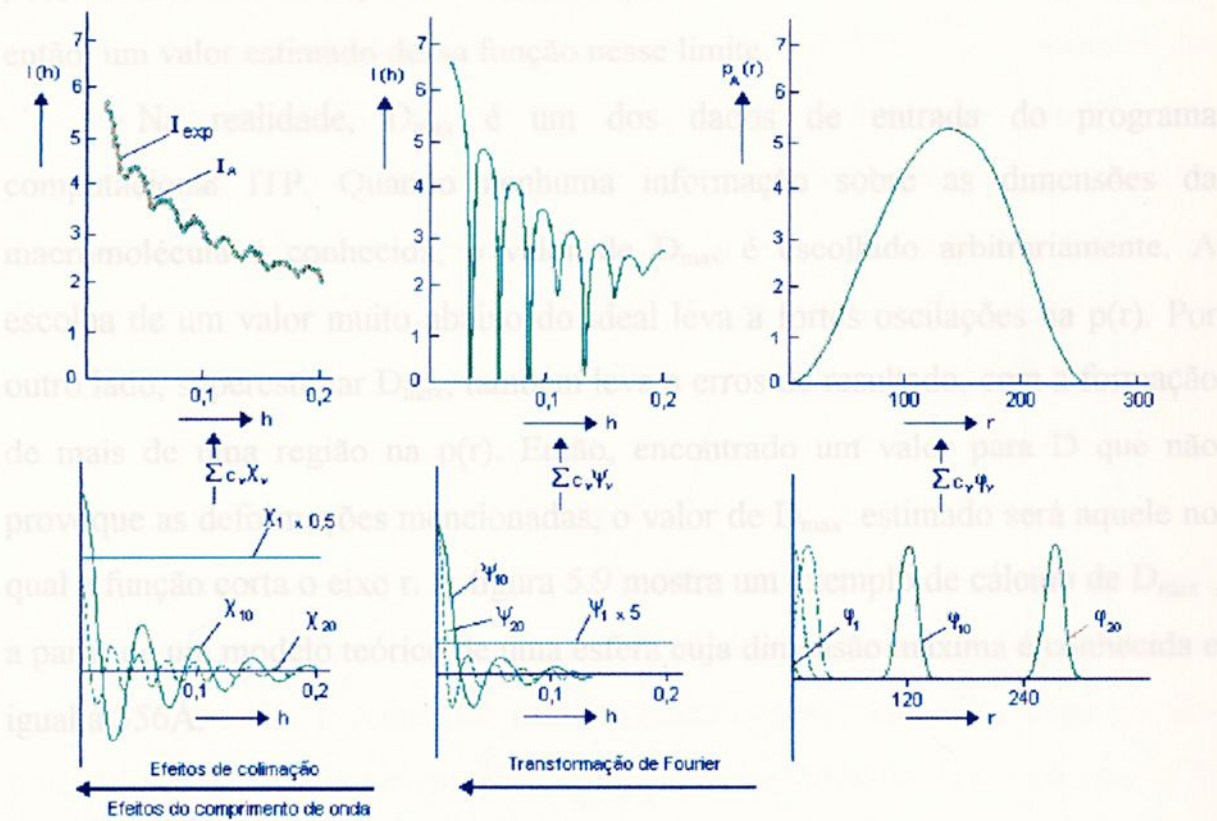


Figura 5.8 - Funções $\Phi_v(r)$, $\psi_v(h)$ e $\chi_v(h)$ usadas para a aproximação dos dados de espalhamento no método de transformação indireta.

O raio de giração (R_g) pode ser calculado a partir de $p(r)$ por:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^D P(r)r^2 dr}{2 \int_0^D P(r) dr}$$

5.13

O raio de giração calculado desta maneira utiliza todos os pontos da curva de espalhamento, e só necessita do valor da distância máxima D . A consequência disto é uma maior precisão no cálculo de R_g se comparado com o método de Guinier.



5.3.5 - Máxima dimensão da partícula - $D_{\max}$

Como mencionado anteriormente, a função distribuição de distâncias $p(r)$, assume valor zero para $r = 0$ e $r \geq D_{\max}$. A máxima dimensão da partícula, é então, um valor estimado dessa função nesse limite.

Na realidade, $D_{\max}$ é um dos dados de entrada do programa computacional ITP. Quando nenhuma informação sobre as dimensões da macromolécula é conhecida, o valor de $D_{\max}$ é escolhido arbitrariamente. A escolha de um valor muito abaixo do ideal leva a fortes oscilações na $p(r)$. Por outro lado, superestimar $D_{\max}$, também leva a erros de resultado, com a formação de mais de uma região na $p(r)$. Então, encontrado um valor para D que não provoque as deformações mencionadas, o valor de $D_{\max}$ estimado será aquele no qual a função corta o eixo r . A figura 5.9 mostra um exemplo de cálculo de $D_{\max}$, a partir de um modelo teórico de uma esfera cuja dimensão máxima é conhecida e igual a 356 Å.

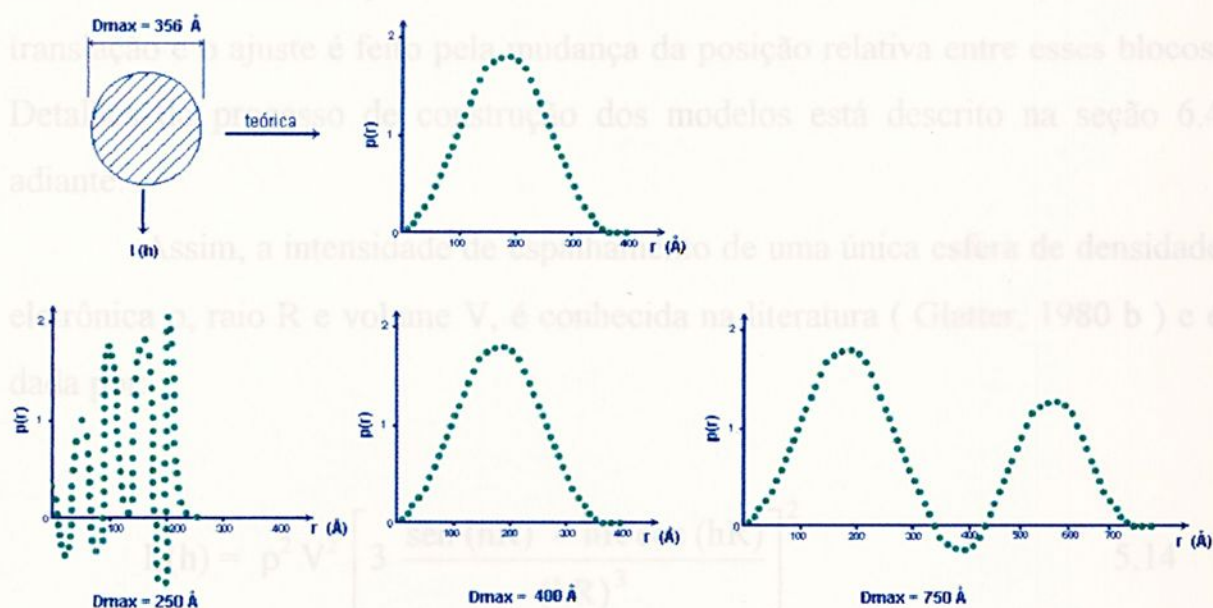


Figura 5.9 - Solução da função $p(r)$ de um modelo teórico de uma esfera para vários valores de $D_{\max}$.

5.4 - Modelos

A próxima etapa do trabalho é a geração de modelos teóricos que melhor represente a conformação da proteína.

Algumas moléculas em estudo não podem ser aproximadas satisfatoriamente por modelos triaxiais simples, como elipsóides, prismas, etc. Porém, alguns métodos podem ser utilizados para a geração de modelos compostos de vários corpos triaxiais distribuídos espacialmente, como é o caso do programa computacional MULTIBODY. Esses modelos são constituídos por uma grande quantidade de pequenas subunidades esféricas ou cúbicas idênticas.

O programa calcula uma curva de intensidade teórica para o modelo e posteriormente, a sua respectiva função de distribuição de distâncias ($p(r)$), a qual será comparada com a $p(r)$ obtida da curva de intensidade de espalhamento experimental corrigida pelo programa ITP. Esses modelos são compostos de vários blocos todos preenchidos por pequenas esferas, sendo que cada um dos blocos individualmente possui liberdade de movimento tanto de rotação como de translação e o ajuste é feito pela mudança da posição relativa entre esses blocos. Detalhes do processo de construção dos modelos está descrito na seção 6.4 adiante.

Assim, a intensidade de espalhamento de uma única esfera de densidade eletrônica ρ , raio R e volume V , é conhecida na literatura (Glatter, 1980 b) e é dada por:

$$I_1(h) = \rho^2 V^2 \left[3 \frac{\text{sen}(hR) - hR \cos(hR)}{(hR)^3} \right]^2 \quad 5.14$$



Portanto, a intensidade total será dada pela soma de todas as intensidades devidas a todas as esferas que compõem o modelo e levando-se em consideração as suas respectivas posições espaciais (Glatter, 1983).

Um exemplo de modelo obtido por este programa pode ser visto na figura 2.3 do capítulo 2 deste trabalho.

As medidas foram feitas para os valores de pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0; utilizando as albuminas bovinas fração V (SAB-fv), e pH 4,0, utilizando a albumina bovina livre de globulina (SAB-lg), sendo que para cada um dos valores de pH efetuamos medidas em concentrações variando de 20 mg/ml a 50 mg/ml, para depois fazermos a extrapolação a concentração zero das curvas de intensidade de espalhamento tendo em vista que toda a teoria foi feita não levando-se em conta interferências interpartículas.

Para eliminar as contribuições do espalhamento devido ao solvente e ao capilar fizemos medidas de cada um dos solventes em seu respectivo pH e capilares vazios, e em seguida, pela utilização da equação (5.1), normalizamos as curvas de espalhamento calculando as curvas $J_N(h)$.

O tempo de medida para cada amostra, inclusive os solventes e capilares, foi de uma hora. Vale lembrar que segundo testes realizados em outros trabalhos (Olivieri, 1992) para a mesma proteína, danos à amostra devido a radiação não são observados mesmo para longos tempos de exposição (ao redor de 40 horas).

Os resultados aqui obtidos serão posteriormente comparados aos de Olivieri e Craievich das albuminas humana e bovina livres de ligantes.



CAPÍTULO 6 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS

6.1 - Comentários

As medidas foram feitas para os valores de pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0; utilizando as albuminas bovinas fração V (SAB-fV), e pH 4,0, utilizando a albumina bovina livre de globulina (SAB-lg), sendo que para cada um dos valores de pH efetuamos medidas em concentrações variando de 20 mg/ml a 50 mg/ml, para depois fazermos a extrapolação à concentração zero das curvas de intensidade de espalhamento tendo em vista que toda a teoria foi feita não levando-se em conta interferências interpartículas.

Para eliminar as contribuições do espalhamento devido ao solvente e ao capilar fizemos medidas de cada um dos solventes em seu respectivo pH e capilares vazios, e em seguida, pela utilização da equação (5.1), normalizamos as curvas de espalhamento calculando as curvas $J_N(h)$.

O tempo de medida para cada amostra, inclusive os solventes e capilares, foi de uma hora. Vale lembrar que segundo testes realizados em outros trabalhos (Olivieri, 1992) para a mesma proteína, danos à amostra devido a radiação não são observados mesmo para longos tempos de exposição (ao redor de 40 horas).

Os resultados aqui obtidos serão posteriormente comparados aos de Olivieri e Craievich das albuminas humana e bovina livres de ligantes.



6.2 - Resultados Preliminares da SAB

Apenas a título de ilustração e melhor compreensão dos métodos de normalização utilizados, somente os gráficos referentes a SAB-fV, nas várias concentrações e no pH 6,0, são mostrados na figura 6.1, sendo que para os demais valores de pH os métodos foram os mesmos.

A referida figura mostra gráficos de intensidade contra ângulo de espalhamento, após normalização de acordo com a equação 5.1, para as várias concentrações e para os três conjuntos de medidas. Além da normalização, ainda é feita a conversão de número de canal à unidade h , conforme comentado na seção 5.2.3.

A partir dessas curvas normalizadas, construímos um gráfico de Porod ($J(h) \cdot h^3 \times h^3$), para cada concentração em seu respectivo pH, para obtenção dos parâmetros para eliminar o efeito “background”. Esses parâmetros são determinados pela inclinação da região linear (J_b) desse gráfico, como já referido na seção 5.3.3.

A figura 6.2a-b-c, representa um exemplo de obtenção de J_b para os três conjuntos de medidas da SAB-fV no pH 6,0 e suas concentrações.

Depois de calculado e eliminado o “background” de todas as curvas das várias concentrações e em seus respectivos valores de pH, novos gráficos de intensidade de espalhamento são construídos. A figura 6.3 apresenta um exemplo para o pH 6,0.

Figura 6.1 - Gráfico de intensidade de espalhamento do conjunto de medidas da SAB-fV - pH 6,0 para cálculo da intensidade média extrapolada à concentração zero.

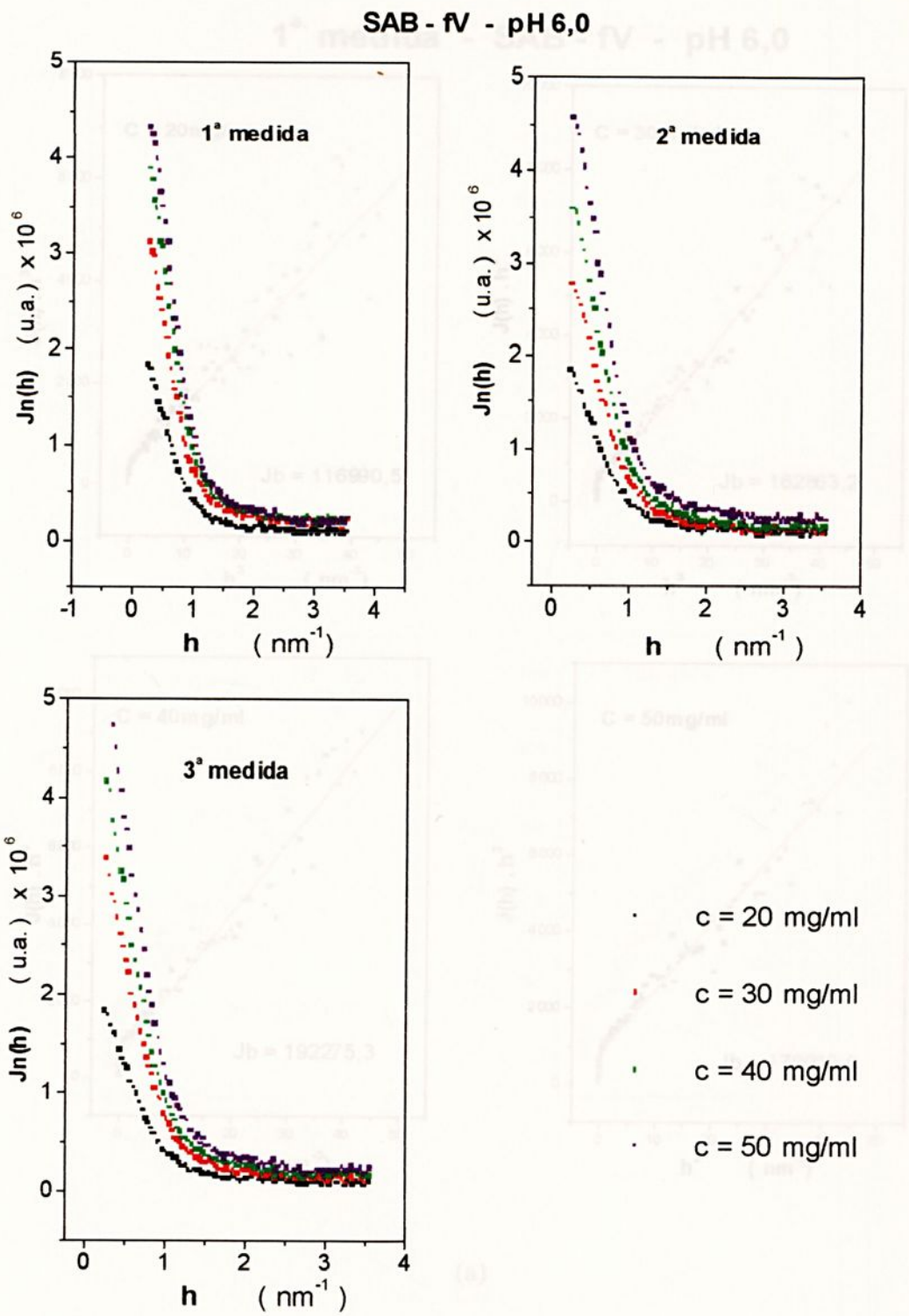
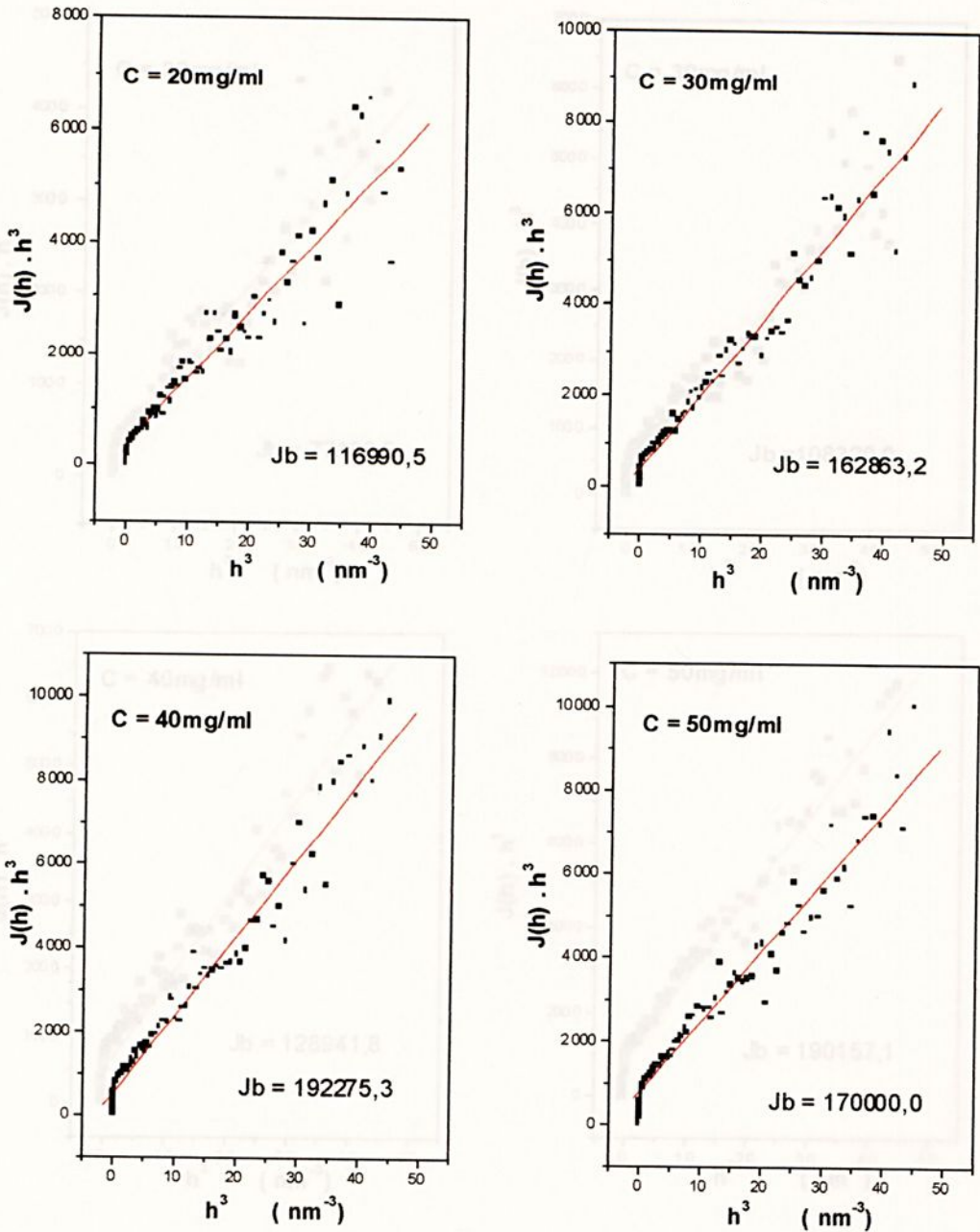


Figura 6.1 - Gráfico de intensidade de espalhamento do conjunto de medidas da SAB-fV -pH 6,0 para cálculo da intensidade média extrapolada à concentração zero.

1^a. medida - SAB - fV - pH 6,0



(a)

2ª medida - SAB - fV - pH 6,0

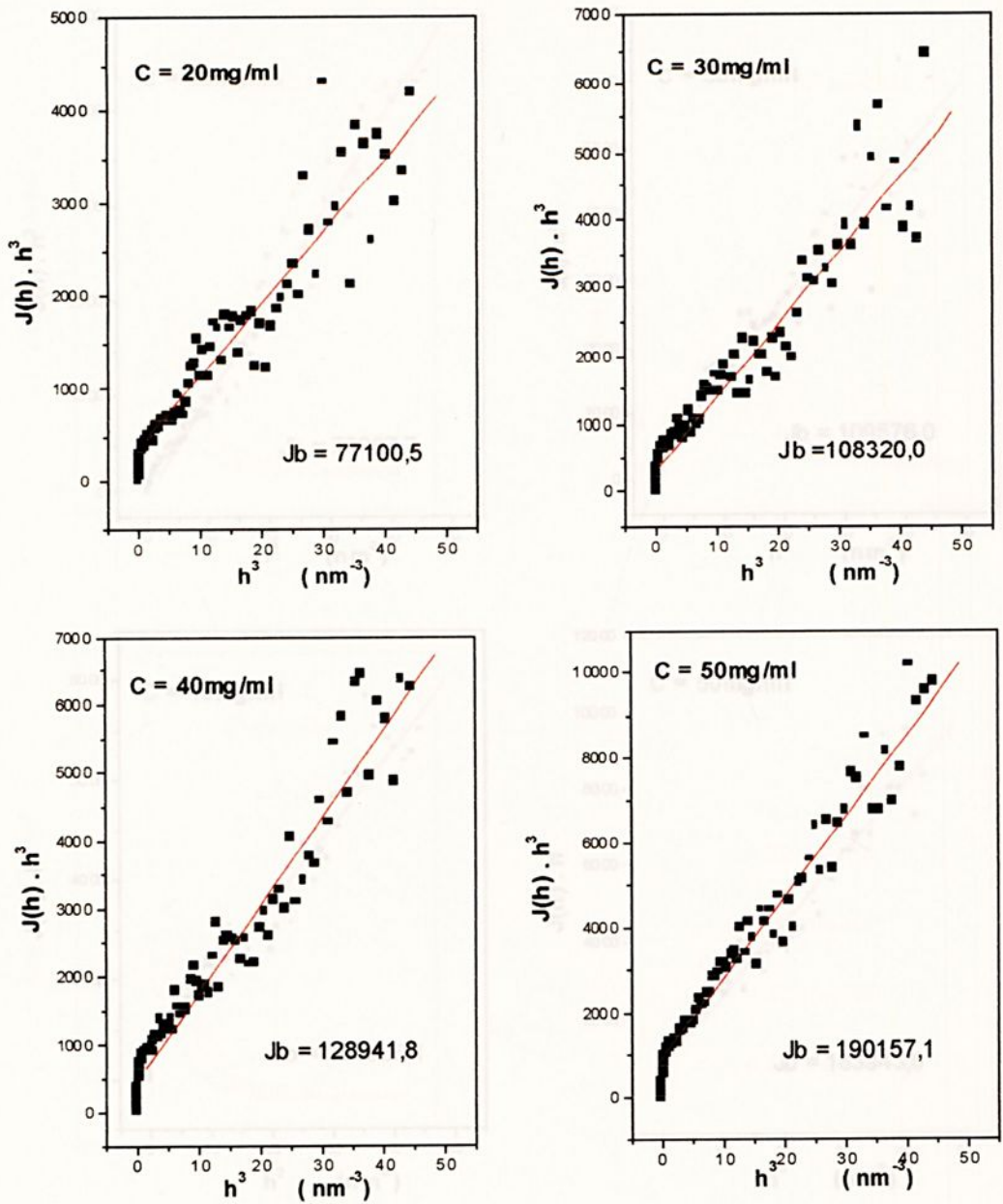


Figura 6.2 (a-b-c) - Gráficos de Porczi para a função do "background" das várias concentrações do pH 6,0 dos três compostos de medidas

3ª medida - SAB - fV - pH 6,0

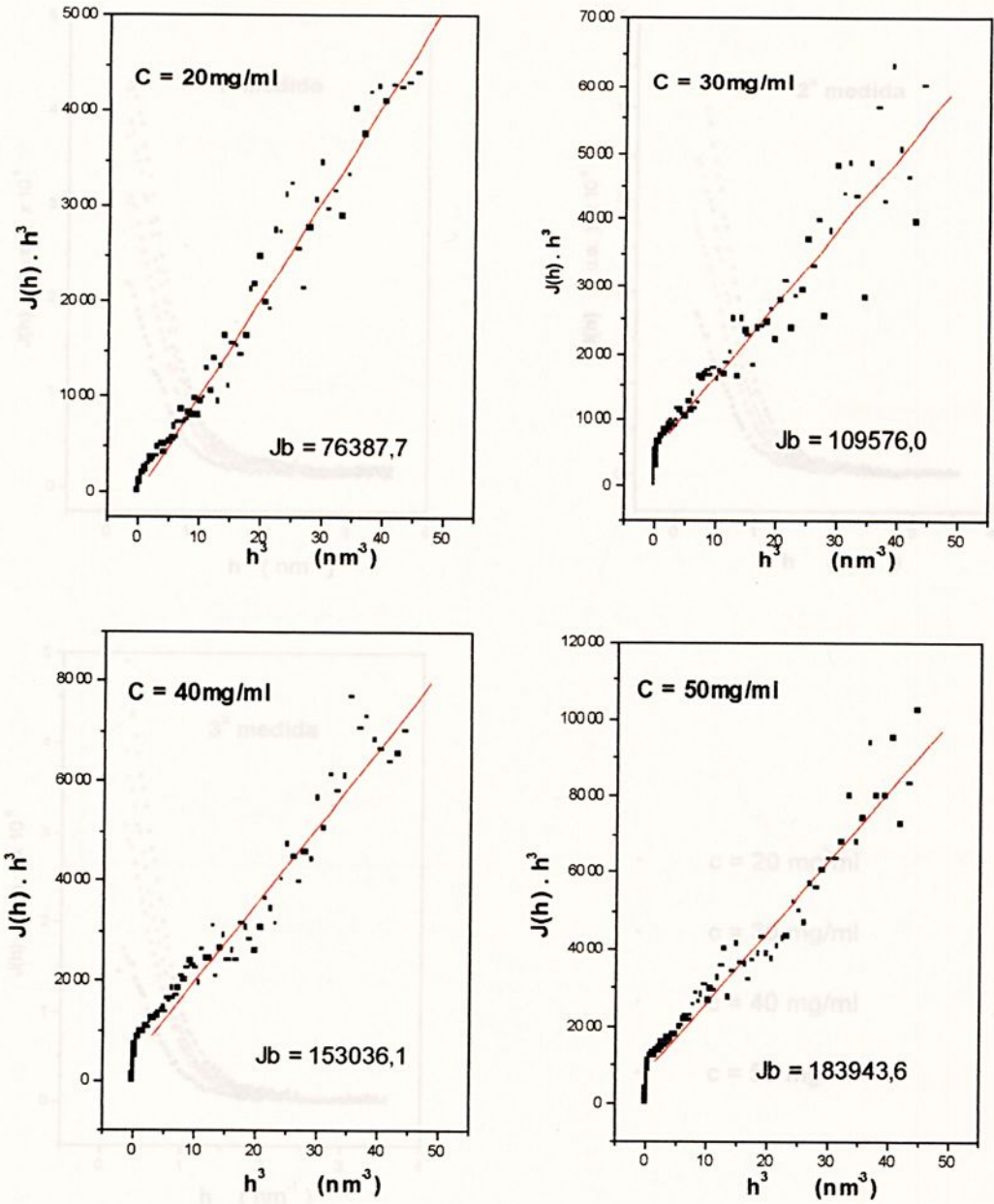


Figura 6.2 (a-b-c) - Gráficos de Porod para eliminação do “background” das várias concentrações do pH 6,0 dos três conjuntos de medidas.

Este processo é então repetido para cada pH e suas várias concentrações, e em seguida, é calculada uma média dos três conjuntos de medidas, como mencionado na seção 5.3.2, e feita a extrapolação à concentração

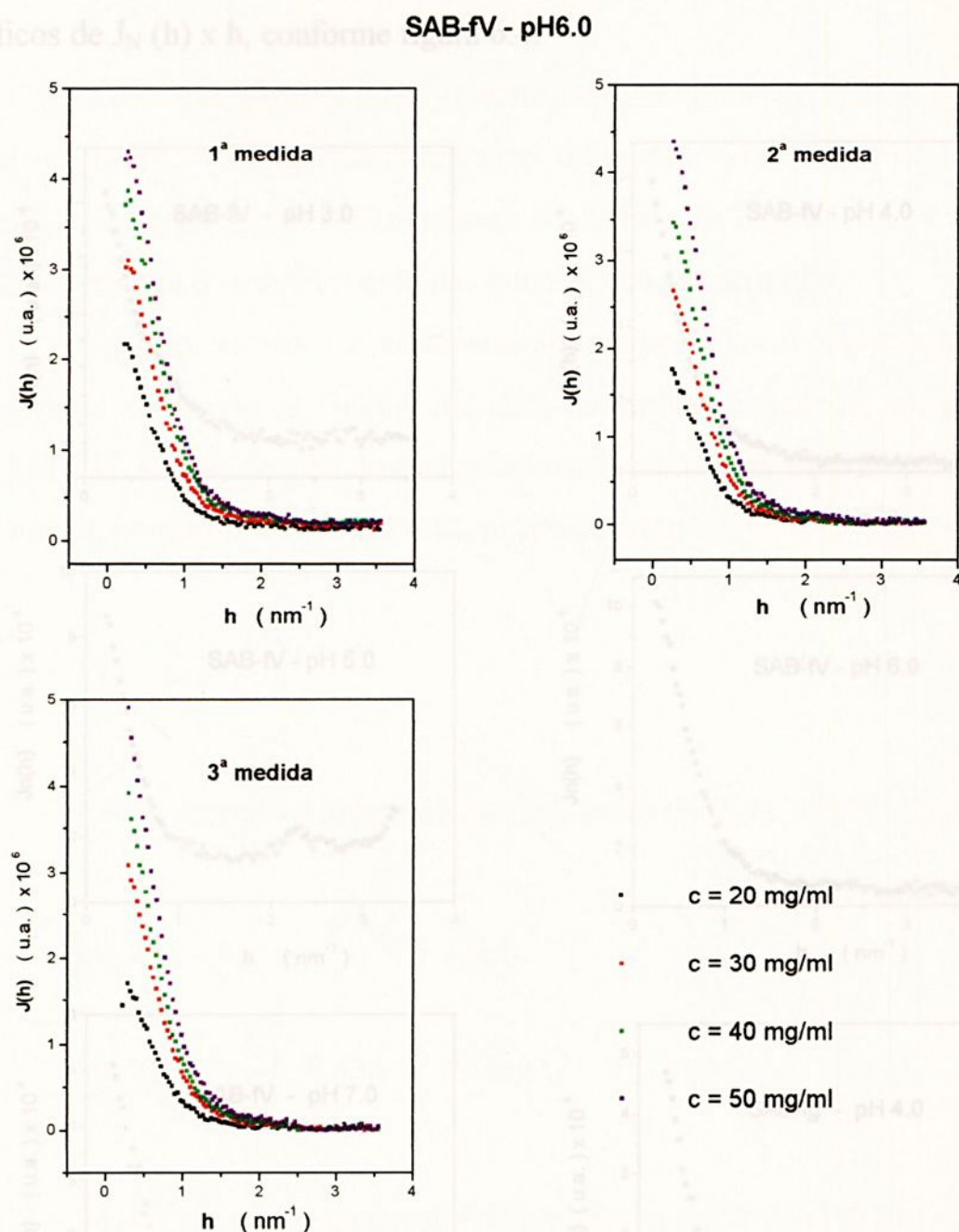


Figura 6.3 - Gráficos de intensidade de espalhamento dos três conjuntos de medidas com “background” eliminado, da SAB-fV - pH 6,0.

Este processo é então repetido para cada pH e suas várias concentrações, e em seguida, é calculada uma média dos três conjuntos de medidas, como mencionado na seção 5.3.2, e feita a extrapolação à concentração

zero de cada um dos valores de pH, e as curvas obtidas são colocadas em gráficos de $J_N(h) \times h$, conforme figura 6.4.

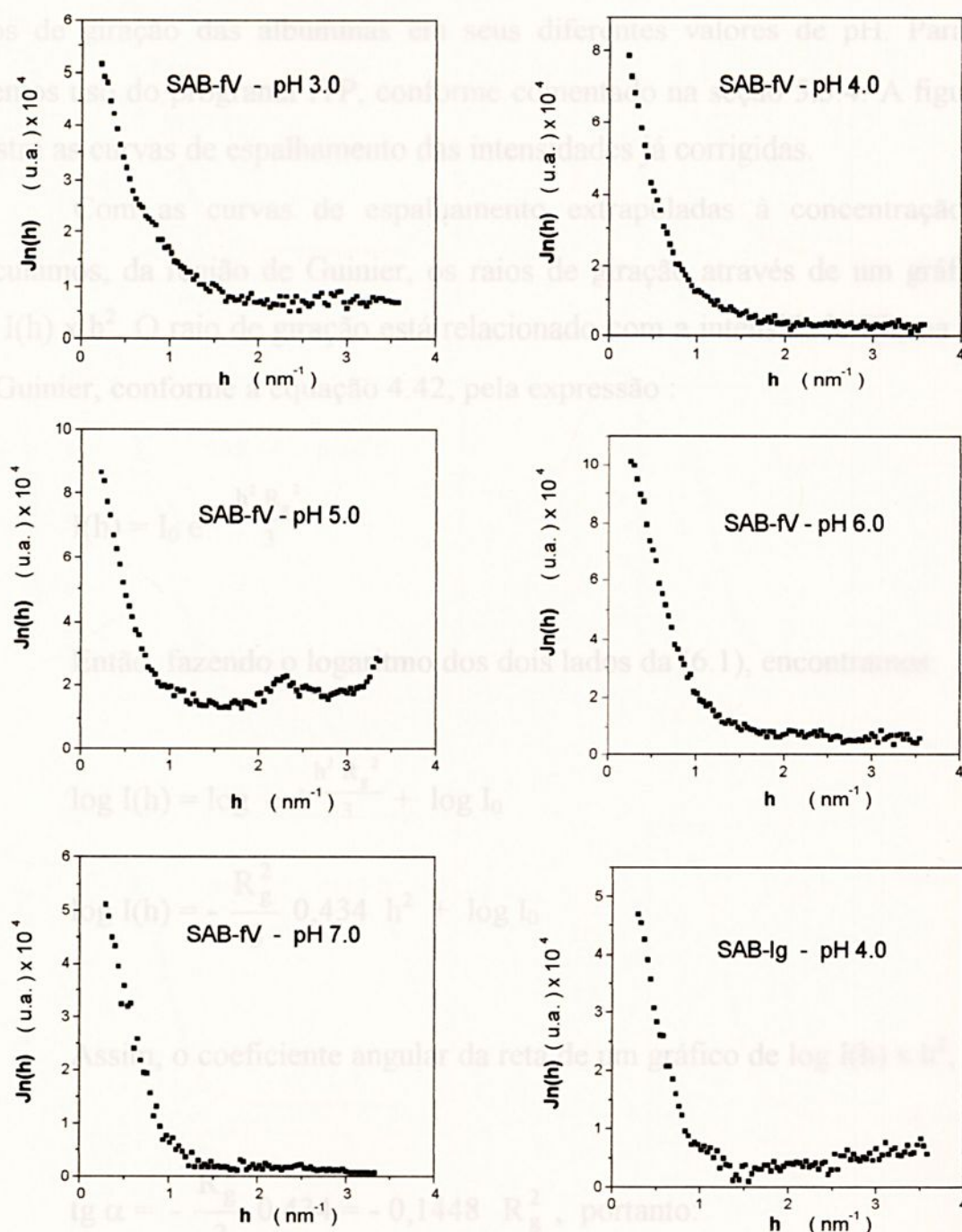


Figura 6.4 - Gráficos de intensidade de espalhamento extrapolada à concentração zero, pelo método dos mínimos quadrados, obtidos a partir das curvas de intensidade média dos vários valores de pH.

6.3 - Correções pelo programa ITP

O próximo passo é fazer as correções pelo perfil do feixe e calcular os raios de giração das albuminas em seus diferentes valores de pH. Para isso, faremos uso do programa ITP, conforme comentado na seção 5.3.4. A figura 6.5 mostra as curvas de espalhamento das intensidades já corrigidas.

Com as curvas de espalhamento extrapoladas à concentração zero calculamos, da região de Guinier, os raios de giração através de um gráfico de $\log I(h) \times h^2$. O raio de giração está relacionado com a intensidade $I(h)$ na região de Guinier, conforme a equação 4.42, pela expressão :

$$I(h) = I_0 e^{-\frac{h^2 R_g^2}{3}} \quad 6.1$$

Então, fazendo o logaritmo dos dois lados da (6.1), encontramos:

$$\log I(h) = \log e^{-\frac{h^2 R_g^2}{3}} + \log I_0$$

$$\log I(h) = -\frac{R_g^2}{3} 0,434 h^2 + \log I_0$$

Assim, o coeficiente angular da reta de um gráfico de $\log I(h) \times h^2$, será:

$$\text{tg } \alpha = -\frac{R_g^2}{3} 0,434 = -0,1448 R_g^2, \text{ portanto:}$$

$$R_g = 2,628 \sqrt{-\text{tg } \alpha} \quad 6.2$$

Figura 6.5 - Gráficos da intensidade de espalhamento ($I(h) \times h$), calculadas pelo ITP

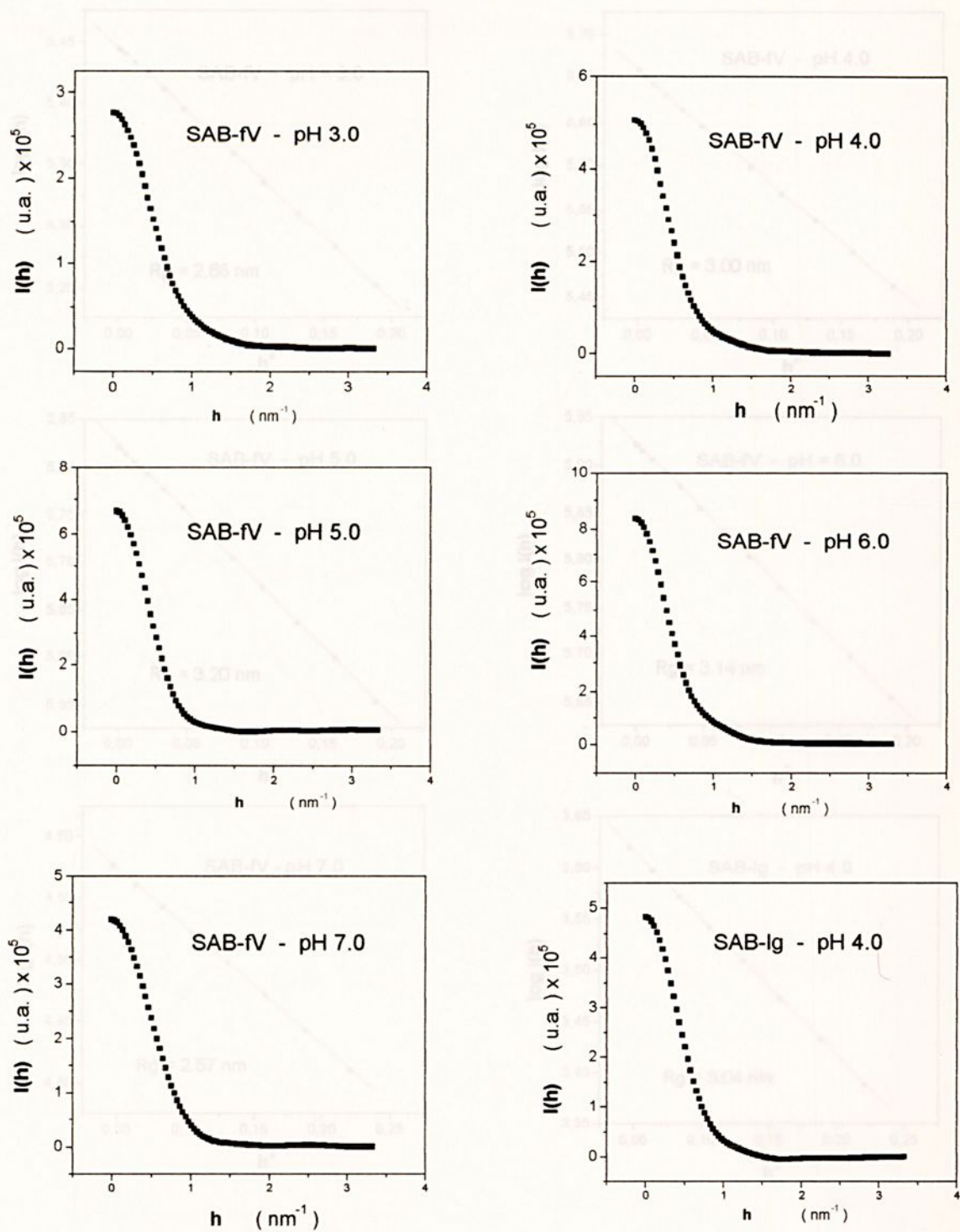


Figura 6.6 - Gráficos de Guinier ($\log I(h) \times h^2$) mostrando os valores de raio de giração dos vários valores de pH calculados a partir dos coeficientes angulares das retas.

Figura 6.5 - Gráficos de intensidade de espalhamento ($I(h) \times h$), calculadas pelo ITP.

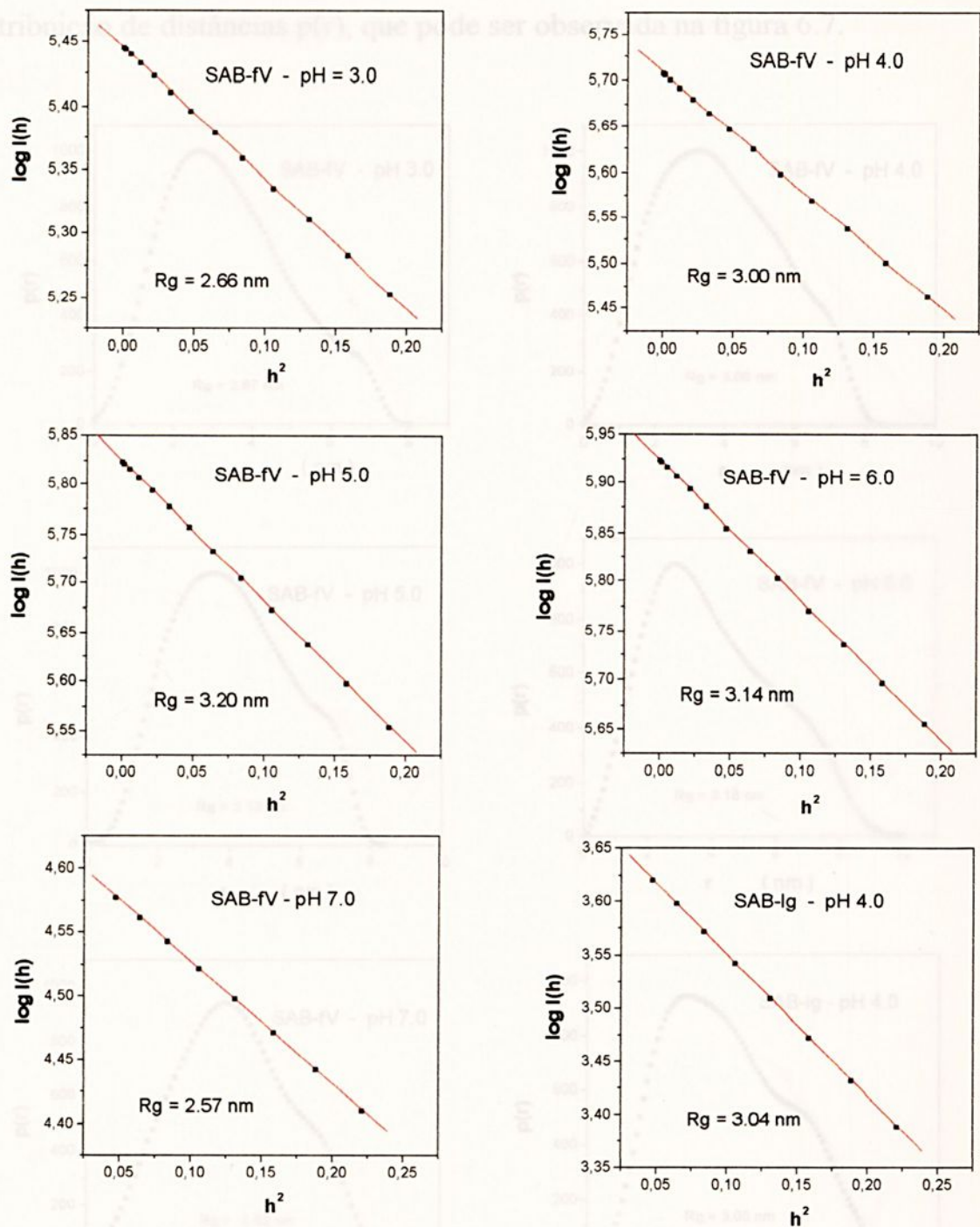


Figura 6.6 - Gráficos de Guinier ($\log I(h) \times h^2$) mostrando os valores de raio de giração dos vários valores de pH calculados a partir dos coeficientes angulares das retas.

O programa computacional ITP também nos fornece as funções distribuição de distâncias $p(r)$, que pode ser observada na figura 6.7.

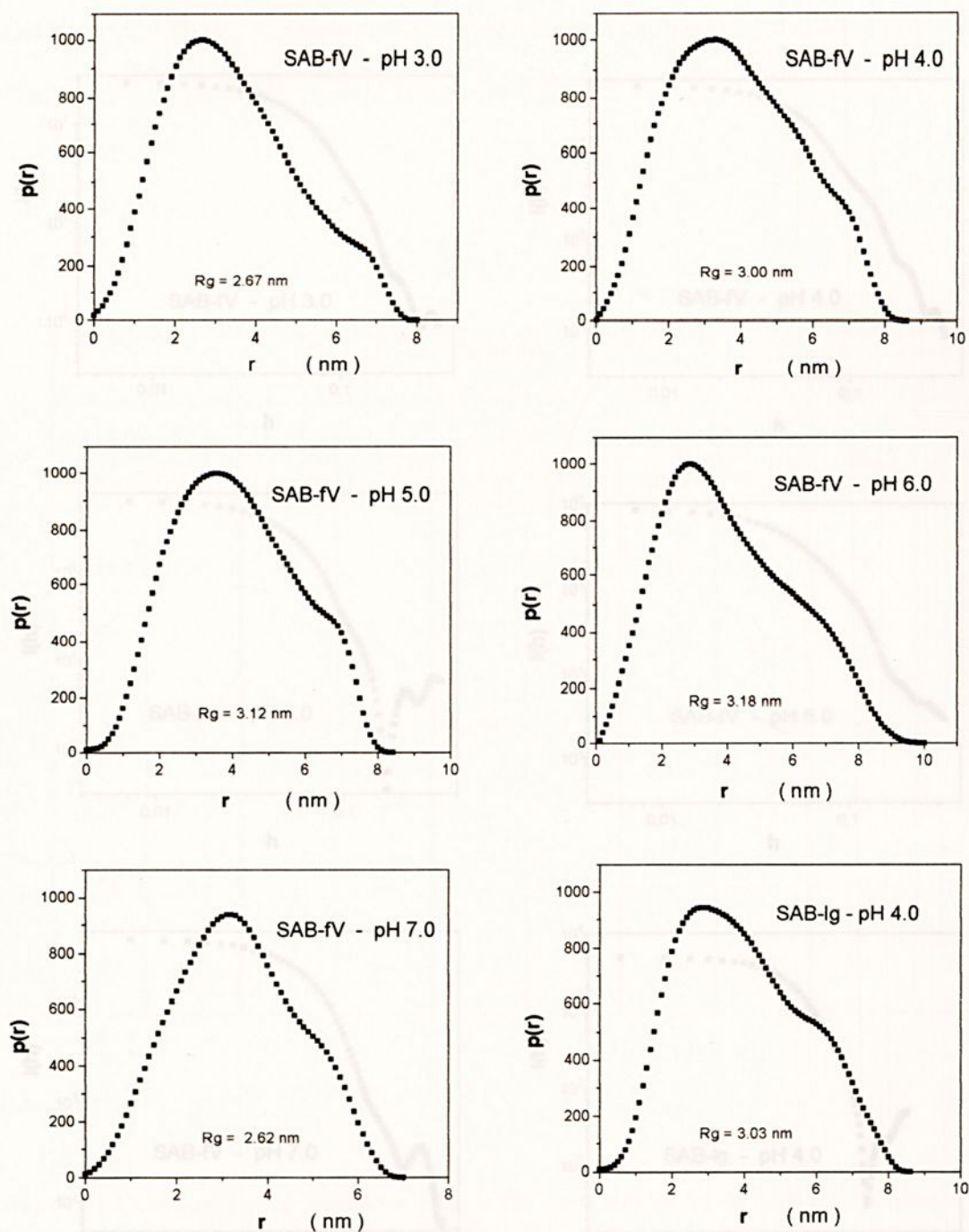


Figura 6.7 - Função de distribuição de distâncias - $p(r)$ - das SAB-fV nos vários valores de pH e SAB-Ig no pH 4,0, indicando os valores dos raios de giração.

Na figura 6.8 abaixo, graficamos $\log I(h) \times \log h$, onde podemos observar uma forte variação das curvas, indicando a ocorrência de mudanças na forma da proteína.

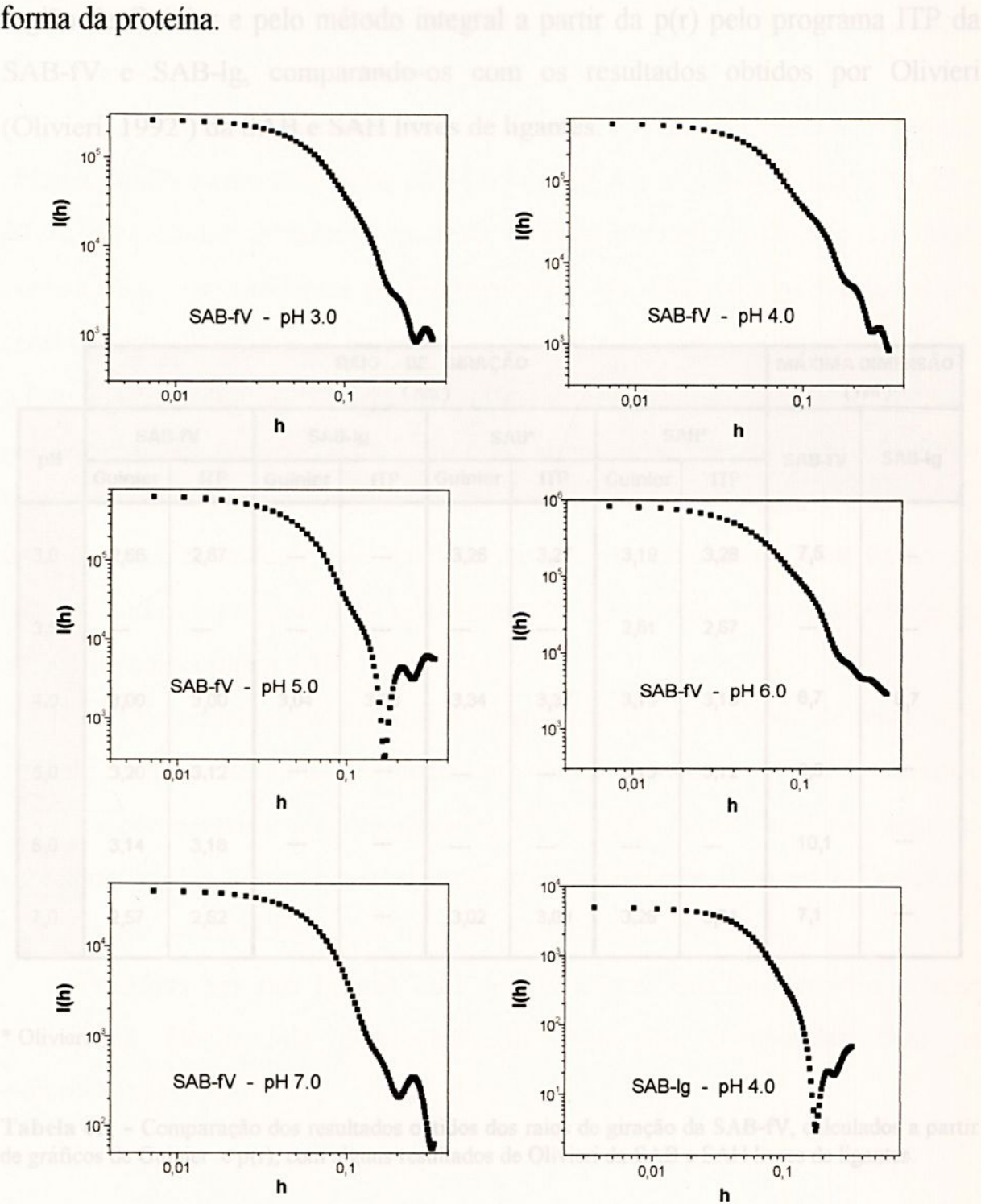


Figura 6.8 - Gráficos de $\log I(h) \times \log h$ - informações sobre a forma das partículas.

6.4 - Modelos obtidos pelo programa MULTIBODY

A tabela 6.1 reúne os resultados dos raios de giração calculados pela região de Guinier e pelo método integral a partir da $p(r)$ pelo programa ITP da SAB-fV e SAB-Ig, comparando-os com os resultados obtidos por Olivieri (Olivieri, 1992) da SAB e SAH livres de ligantes.

pH	RAIO DE GIRAÇÃO (nm)								MÁXIMA DIMENSÃO (nm)	
	SAB-fV		SAB-Ig		SAB*		SAH*		SAB-fV	SAB-Ig
	Guinier	ITP	Guinier	ITP	Guinier	ITP	Guinier	ITP		
3,0	2,66	2,67	---	---	3,26	3,27	3,19	3,28	7,5	---
3,5	---	---	---	---	---	---	2,61	2,67	---	---
4,0	3,00	3,00	3,04	3,03	3,34	3,37	3,13	3,16	8,7	8,7
5,0	3,20	3,12	---	---	---	---	3,13	3,12	8,5	---
6,0	3,14	3,18	---	---	---	---	---	---	10,1	---
7,0	2,57	2,62	---	---	3,02	3,03	3,28	3,34	7,1	---

* Olivieri

Tabela 6.1 - Comparação dos resultados obtidos dos raios de giração da SAB-fV, calculados a partir de gráficos de Guinier e $p(r)$, com alguns resultados de Olivieri da SAB e SAH livres de ligantes.

6.4 - Modelos obtidos pelo programa MULTIBODY

O programa MULTIBODY (Glatter, 1983) foi utilizado para a geração dos modelos teóricos, conforme descrito na seção 5.4.

Os modelos construídos são constituídos de 6 blocos, ou seja, elipsóides oblatos, sendo 3 com dimensões de $34 \times 34 \times 22 \text{ \AA}$ e os outros 3, com $22 \times 22 \times 22 \text{ \AA}$, preenchidos totalmente em seus volumes por esferas de raio $1 \text{ \AA}$. Mais precisamente, são montados pela sobreposição de vários discos formados por estas esferas (figura 6.9). Esses blocos são arranjados espacialmente, de forma a buscar um melhor posicionamento entre eles que possibilite o cálculo de uma $p(r)$ possivelmente mais próxima da $p(r)$ experimental. A escolha dos 6 blocos foi baseada na estrutura primária da albumina que de acordo com a distribuição das pontes de dissulfeto pode ser dividida em 6 subdomínios. Dessa forma, os blocos maiores representam os subdomínios A e os menores, os subdomínios B, de acordo com a figura 6.10.

Vale ressaltar que como o programa trabalha no método de tentativa e erro ele exige muitas horas de trabalho até que se encontre o melhor ajuste entre as $p(r)$ experimentais e $p(r)$ dos modelos. Os modelos obtidos seguiram algumas características de outros modelos propostos na literatura (Olivieri e Craievich, 1995), onde procuramos manter os mesmos padrões de dimensão.

Podemos ver nas figuras 6.11 e 6.12 alguns modelos gerados e suas respectivas funções de distribuição de distâncias comparadas com as experimentais.

Figura 6.10 - Exemplo de modelo indicando os domínios I e II e seus respectivos subdomínios A e B.

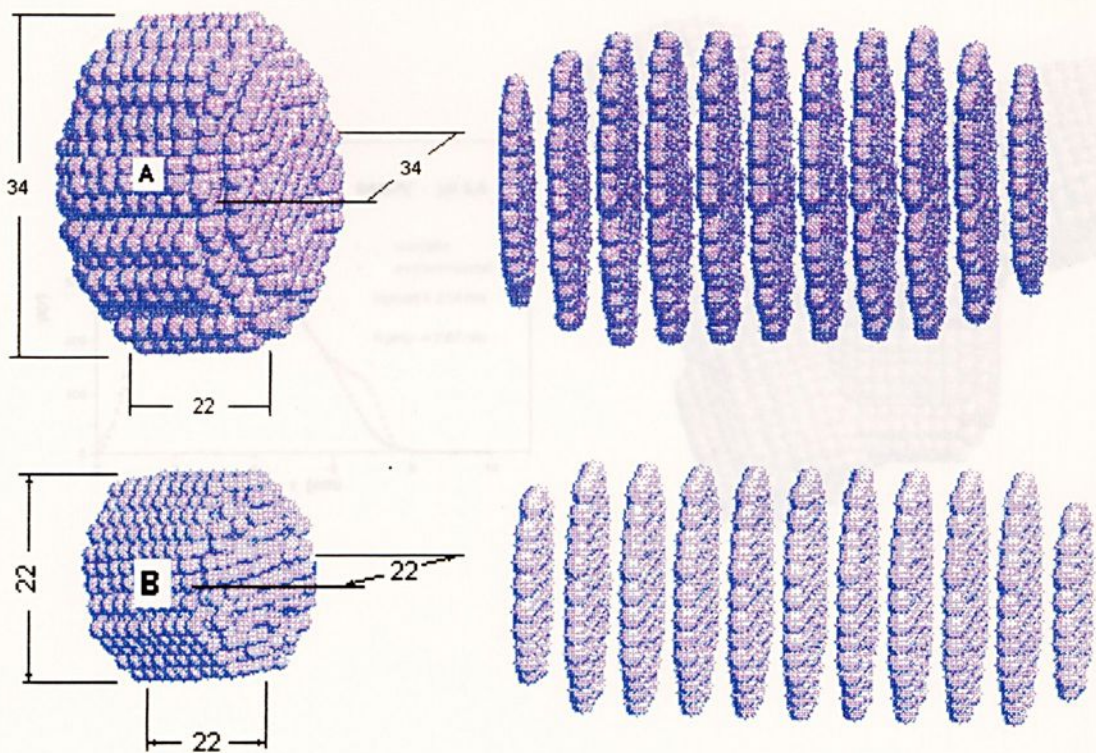


Figura 6.9 - Blocos utilizados na construção dos modelos representando os subdomínios A e B.

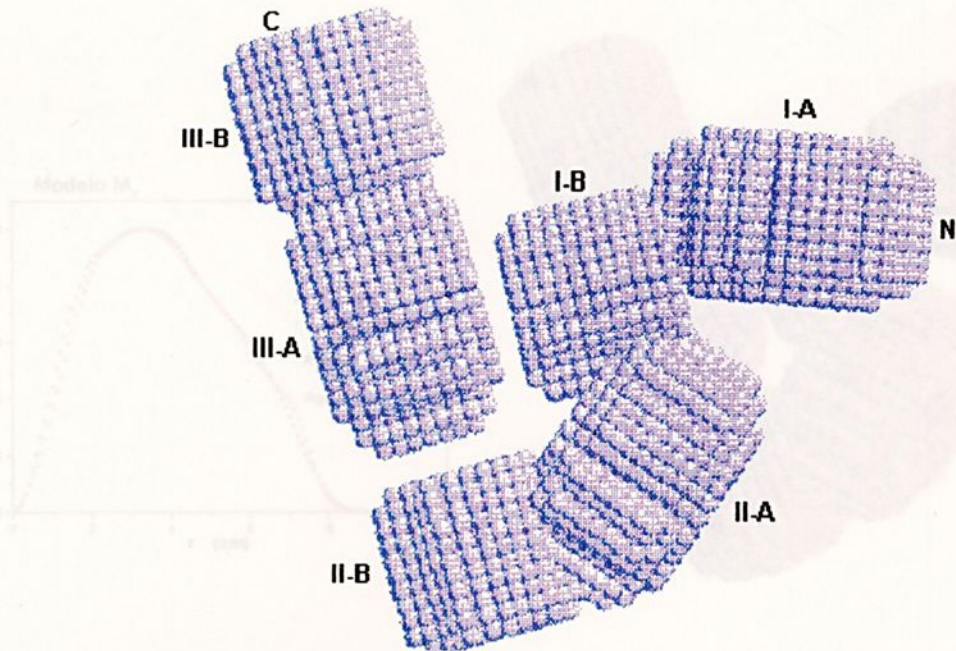


Figura 6.10 - Exemplo de modelo indicando os domínios I e II e seus respectivos subdomínios A e B.

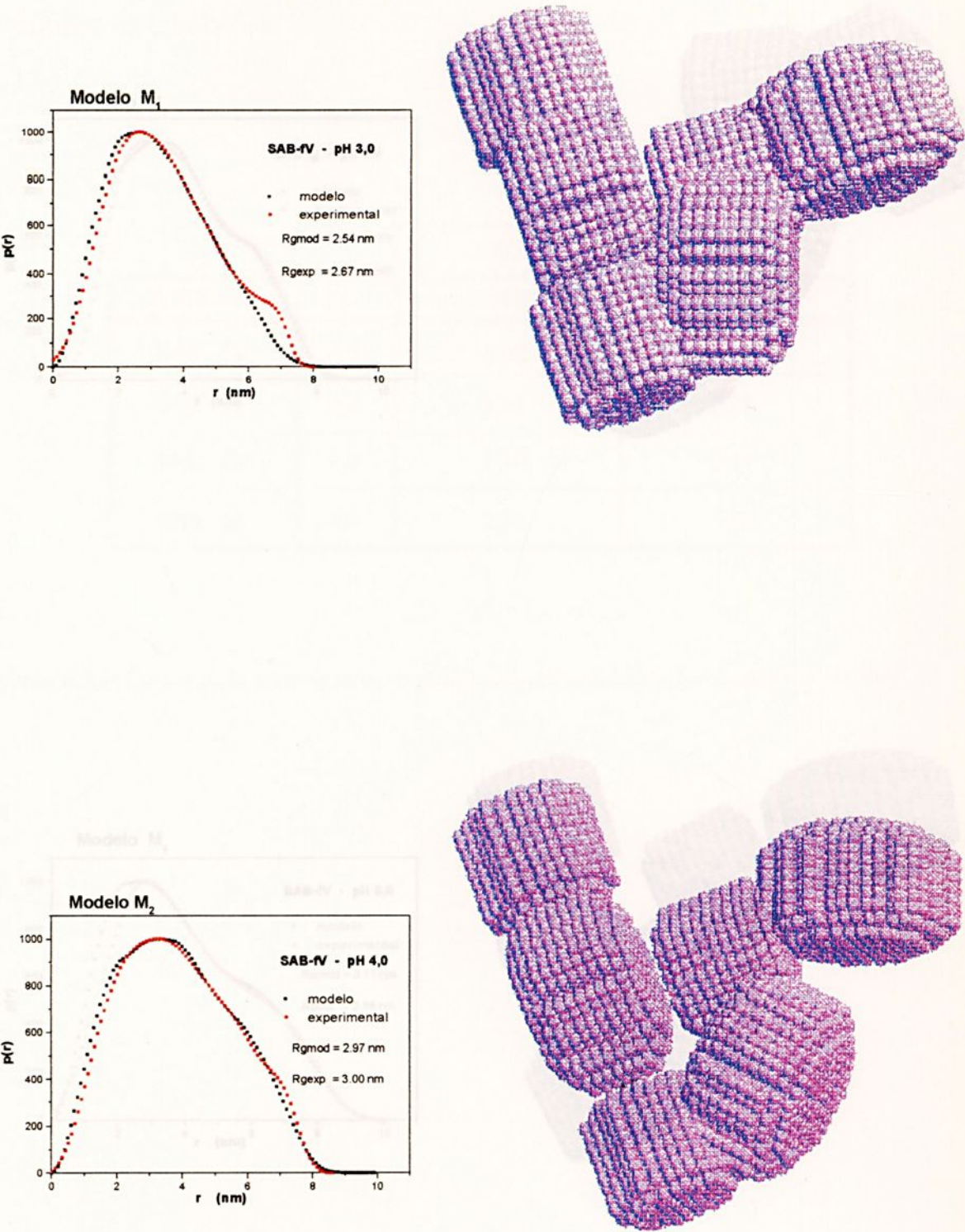


Figura 6.11 - Modelos teóricos obtidos pelo programa MULTIBODY para as SAB-fV nos valores de pH 3,0 e 4,0. As $p(r)$ experimentais e teóricas também são comparadas.

Os resultados dos raios de giração experimentais e dos modelos são mostrados na tabela 6.2.

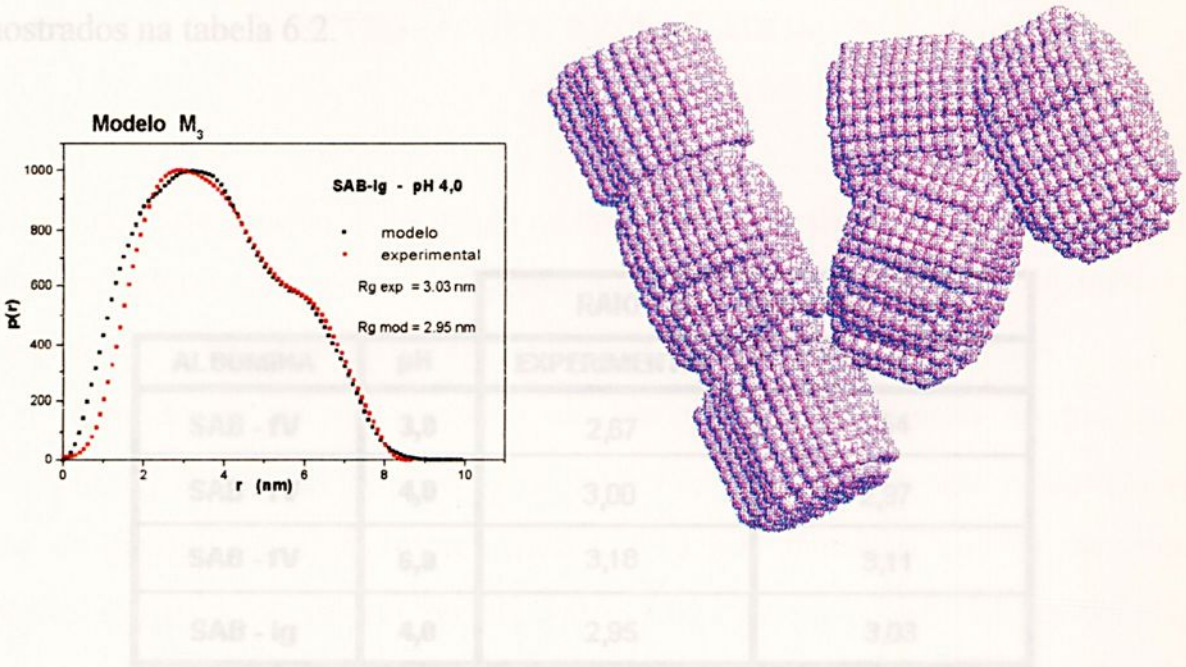


Tabela 6.2 - Comparação entre os raios de giração experimentais com os obtidos dos modelos

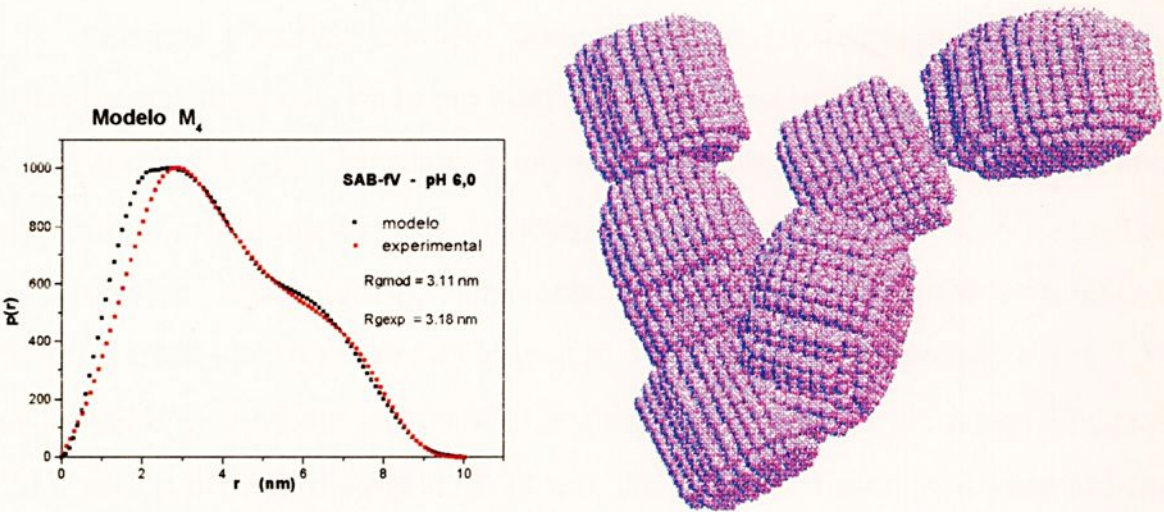


Figura 6.12 - Modelos teóricos obtidos pelo programa MULTIBODY para as SAB-fV no pH 6,0 e, SAB-Ig no pH 4,0. As p(r) experimentais e teóricas também são comparadas.

Os resultados dos raios de giração experimentais e dos modelos são mostrados na tabela 6.2.

		RAIO DE GIRAÇÃO (nm)	
ALBUMINA	pH	EXPERIMENTAL	MODELO
SAB - fV	3,0	2,67	2,54
SAB - fV	4,0	3,00	2,97
SAB - fV	6,0	3,18	3,11
SAB - Ig	4,0	2,95	3,03

Tabela 6.2 - Comparação entre os raios de giração experimentais com os obtidos dos modelos.

Podemos observar também que os valores encontrados na literatura e mostrados na tabela 6.1, estão em bom acordo com os nossos.

Para o pH 3,0, observamos um raio de giração de 2,67 nm, mostrando uma grande diminuição em relação aos outros valores. Este resultado aparentemente contraditório, apresenta similaridade em outros trabalhos. Olivieri e Craievich (Olivieri e Craievich, 1995), encontraram para o pH 3,5 o mesmo valor de 2,67 nm para o raio de giração para a SAH, e Luzzati (Luzzati, 1961), para o pH 3,6, o valor de 2,72 nm, para a SAB. Esses resultados indicam que a proteína deve sofrer uma forte contração ou empacotamento entre os valores de pH 3,0 e 3,5.

No pH 7,0, o resultado obtido também indica uma diminuição no raio de giração para 2,62 nm. Outros trabalhos também indicam uma pequena mudança no raio de giração nesse pH, porém menos acentuada.

CAPÍTULO 7 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O raio de giração, como visto na tabela 6.1, apresenta valores compatíveis entre os valores calculados tanto pelo método de Guinier como pelo método integral. Essa concordância ocorre para todos os valores de pH medidos.

Observando as variações do raio de giração em função do pH, por exemplo, 2ª coluna da tabela 6.1, da SAB-fV, encontramos uma mudança no raio de giração entre os valores 2,62 a 3,18 nm. Notamos que os menores valores são para os valores de pH 3,0 e 7,0. Para os outros valores de pH, existem variações, porém não muito intensas, sugerindo que a molécula permanece mais ou menos estável, com pequenas variações conformacionais, isto é, podendo apresentar diferentes formas mas com aproximadamente o mesmo tamanho.

Podemos observar também que os valores encontrados na literatura e mostrados na tabela 6.1, estão em bom acordo com os nossos.

Para o pH 3,0, observamos um raio de giração de 2,67 nm, mostrando uma grande diminuição em relação aos outros valores. Este resultado aparentemente contraditório, apresenta similaridade em outros trabalhos. Olivieri e Craievich (Olivieri e Craievich, 1995), encontraram para o pH 3,5 o mesmo valor de 2,67 nm para o raio de giração para a SAH, e Luzzati (Luzzati, 1961), para o pH 3,6, o valor de 2,72 nm, para a SAB. Esses resultados indicam que a proteína deve sofrer uma forte contração ou empacotamento entre os valores de pH 3,0 e 3,5.

No pH 7,0, o resultado obtido também indica uma diminuição no raio de giração para 2,62 nm. Outros trabalhos também indicam uma pequena mudança no raio de giração nesse pH, porém menos acentuada.



Se observarmos as funções distribuição de distâncias $p(r)$, mostradas na figura 6.7, notamos que elas apresentam distintas formas para os diversos valores de pH. A figura 7.1 reúne as funções $p(r)$ para mostrar essas diferenças. Porém, quase todas apresentam um máximo em torno de r igual a 3,0 nm, o que está relacionado com as distâncias entre centros espalhadores dentro de uma mesma subunidade e/ou subunidades vizinhas. Em alguns casos ocorrem picos em valores de r entre 6,0 nm e 7,0 nm, os quais estão relacionados com distâncias entre centros espalhadores de subunidades mais distantes. Picos muito próximos da máxima dimensão da proteína não tem relação com a sua forma, podendo estar relacionado apenas com as flutuações que ocorrem na parte final das curvas de intensidade onde os ângulos de espalhamento são maiores.

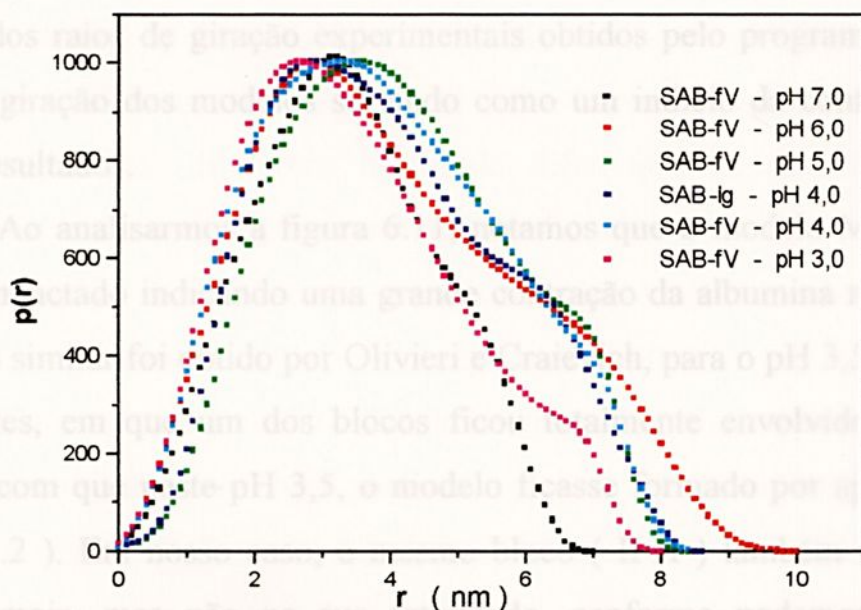


Figura 7.1 - Comparação das funções $p(r)$ das SAB-fV e SAB-Ig nos vários valores de pH para ser usadas como indicação de mudanças conformacionais.

Essas funções $p(r)$ são utilizadas para auxiliar na construção dos modelos teóricos, onde procuramos um melhor ajuste entre as $p(r)$ experimentais e dos modelos, conforme comentado anteriormente. Este ajuste também poderia ser feito entre as curvas de intensidade, porém, torna-se mais conveniente trabalhar com as $p(r)$ devido às informações diretas que temos das distâncias entre os centros espalhadores da partícula.

Os modelos são construídos a partir da posição relativa entre seis blocos que representam os subdomínios da albumina (comentado no capítulo 2). Dessa maneira, os modelos são construídos por tentativa e erro, daí a grande dificuldade de se trabalhar com o programa MULTIBODY, além de nem sempre conseguirmos ajustes perfeitos entre as $p(r)$. Ressaltamos que os nossos modelos propostos indicam a melhor aproximação possível da conformação da proteína, pois esses blocos não representam idealmente a forma real da molécula.

Se observarmos a tabela 6.2, notamos uma grande proximidade entre os valores dos raios de giração experimentais obtidos pelo programa ITP com os raios de giração dos modelos servindo como um indício da confiabilidade dos nossos resultados.

Ao analisarmos a figura 6.11, notamos que o modelo M_1 , encontra-se mais compactado indicando uma grande contração da albumina no pH 3,0. Um resultado similar foi obtido por Olivieri e Craievich, para o pH 3,5 da SAH livre de ligantes, em que um dos blocos ficou totalmente envolvido pelos outros fazendo com que neste pH 3,5, o modelo ficasse formado por apenas 5 blocos (figura 7.2). Em nosso caso, o mesmo bloco (II-A) também fica envolvido pelos demais, mas não na sua totalidade, conforme podemos observar na comparação mostrada na figura 7.4.

Quando a albumina passa do pH 3,0 ao pH 4,0, segundo os modelos M_2 e M_3 (figuras 6.11 e 6.12), ocorre uma abertura entre os blocos indicando que a proteína, com ligantes, fica num estado de relaxamento intermediário quando se



aproxima do ponto isoelétrico (pH 4,8). Se compararmos estes resultados com os de Olivieri e Craievich (figuras 7.2 e 7.3), da SAH livre de ligantes no mesmo pH, observamos uma grande diferença na conformação, talvez induzida pela presença dos ligantes. Mas mesmo para valores de pH idênticos, ligantes diferentes conduzem a molécula a formas diferentes, indicando afinidades diferentes para ligantes diversos (figura 7.5). Muito provavelmente estas ligações ocorrem em regiões distintas, mas não é possível através de nossos resultados localizar essas regiões de ligação devido às dimensões dos ligantes serem pequenas se comparadas com a albumina.

Um estado de maior relaxamento é observado no modelo M_4 para o pH 6,0 quando a proteína afasta-se do seu ponto isoelétrico. Não encontramos na literatura resultados neste pH para comparação.

Apesar de não termos conseguido modelos para os valores de pH 5,0 e 7,0, podemos fazer comparações entre as funções $p(r)$ (figura 7.6). Notamos no pH 5,0 os mesmos valores de raio de giração entre os nossos resultados e os de Olivieri e Craievich, segundo tabela 6.1. Mesmo assim, as funções $p(r)$ apresentam formas diferentes indicando diferenças na conformação dessas albuminas quando na presença e ausência de ligantes.

No pH 7,0 também observamos diferenças nas dimensões da proteína, consequência provavelmente da diferença de conformação.

Como vimos (capítulo 2), eram previstas mudanças conformacionais em proteínas induzidas tanto pela variação do pH como pela presença de ligantes, e neste trabalho, isto foi constatado, como é o caso dos modelos M_2 e M_3 e literatura para o pH 4,0, em que ambos, pH e ligantes, influenciam na conformação.

Figura 7.2 - Modelos obtidos por Olivieri e Craievich para SAH nos valores de pH 3,3 e 4,0 juntamente com suas respectivas funções $p(r)$.

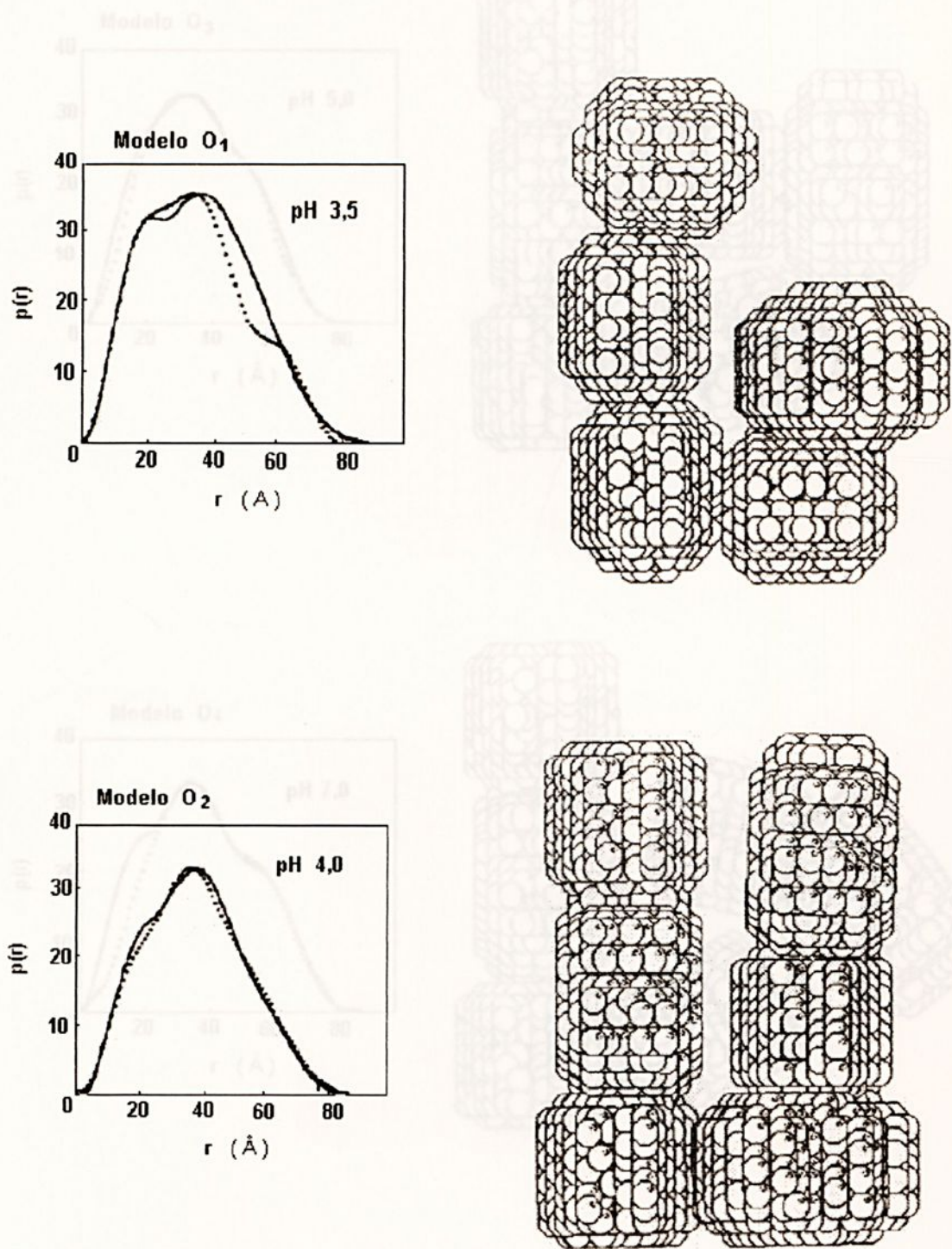
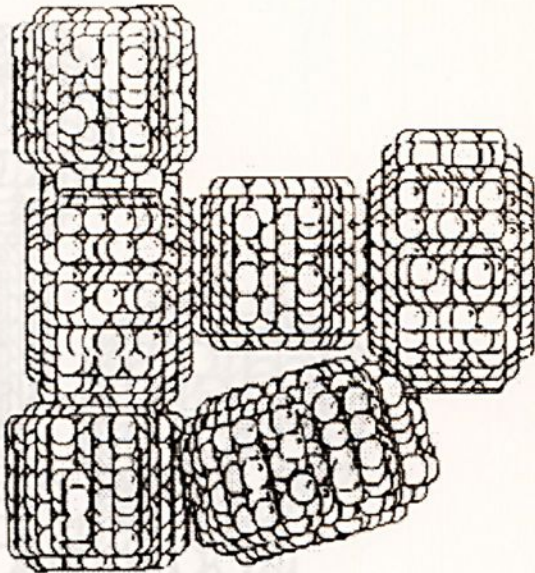
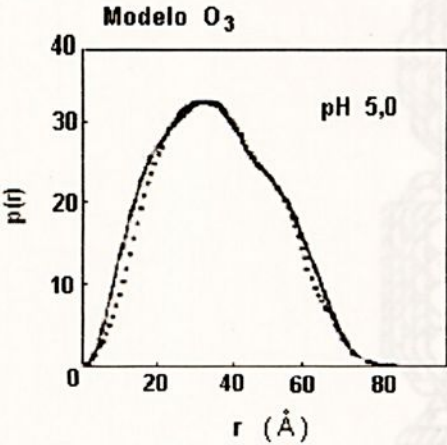


Figura 7.3 - Modelos obtidos por Olivieri e Craievich para SAH nos valores de pH 3,0 e 7,0 juntamente com suas respectivas funções $p(r)$.

Figura 7.2 - Modelos obtidos por Olivieri e Craievich para SAH nos valores de pH 3,5 e 4,0 juntamente com suas respectivas funções $p(r)$.

Modelo O₃



Modelo O₄

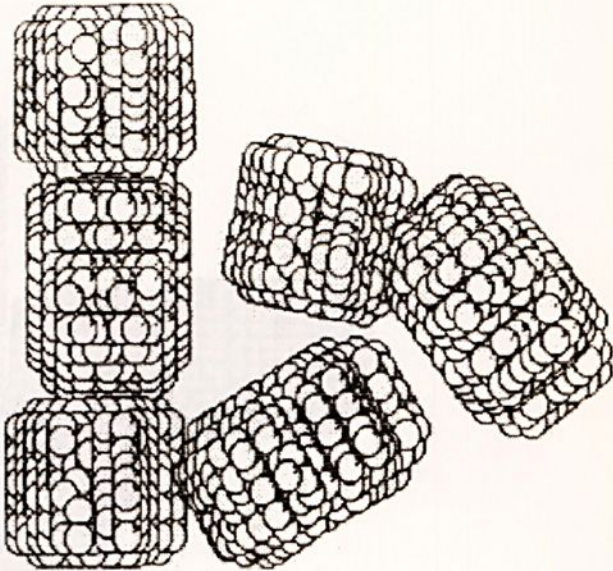
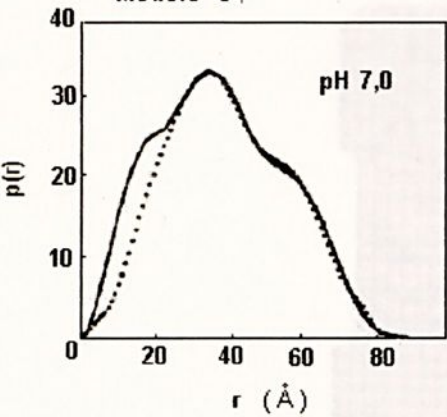
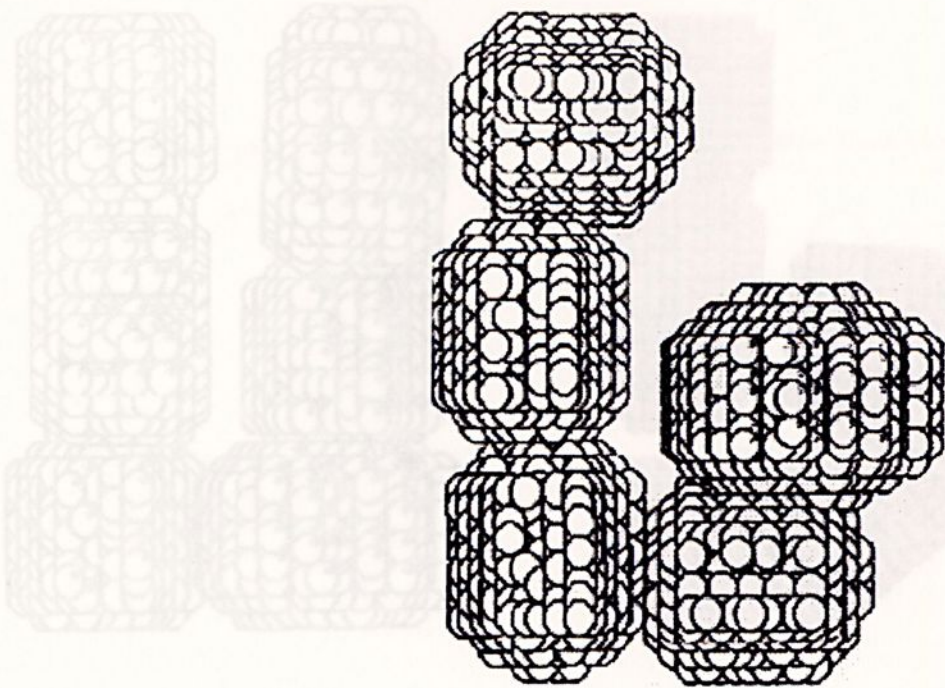


Figura 7.3 - Modelos obtidos por Olivieri e Craievich para SAH nos valores de pH 5,0 e 7,0 juntamente com suas respectivas funções $p(r)$.

Modelo O_1



Modelo M_1

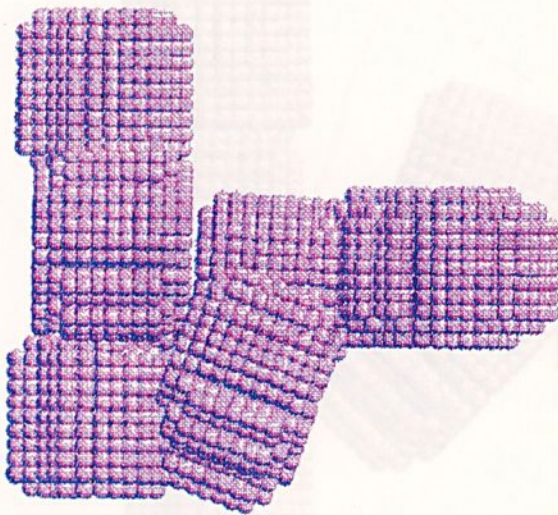
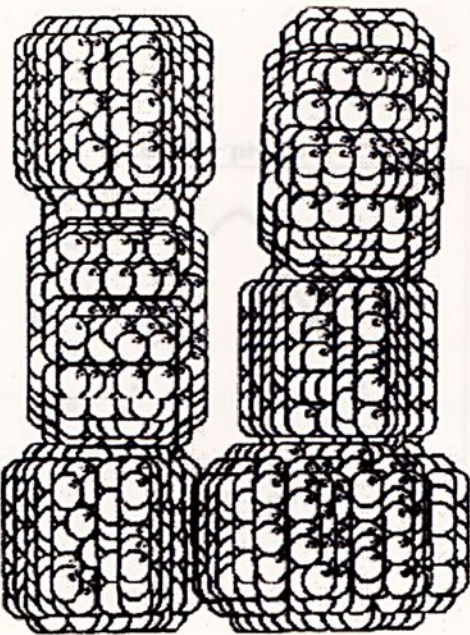


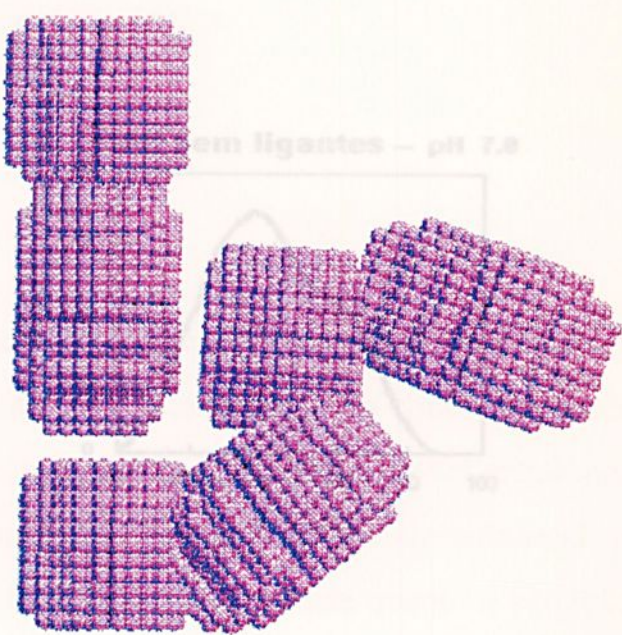
Figura 7.5 - Comparação entre os modelos de Olivieri e Craievich da SAH livre de ligantes com os

Figura 7.4 - Comparação entre os modelos de Olivieri e Craievich da SAH livre de ligantes no pH 3,5 com o modelo da SAB-fV no pH 3,0.

Modelo O₂



Modelo M₂



Modelo M₃



Figura 7.5 - Comparação entre os modelos de Olivieri e Craievich da SAH livre de ligantes com os modelos da SAB-fv e SAB-lg no pH 4,0.

CAPÍTULO 8 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

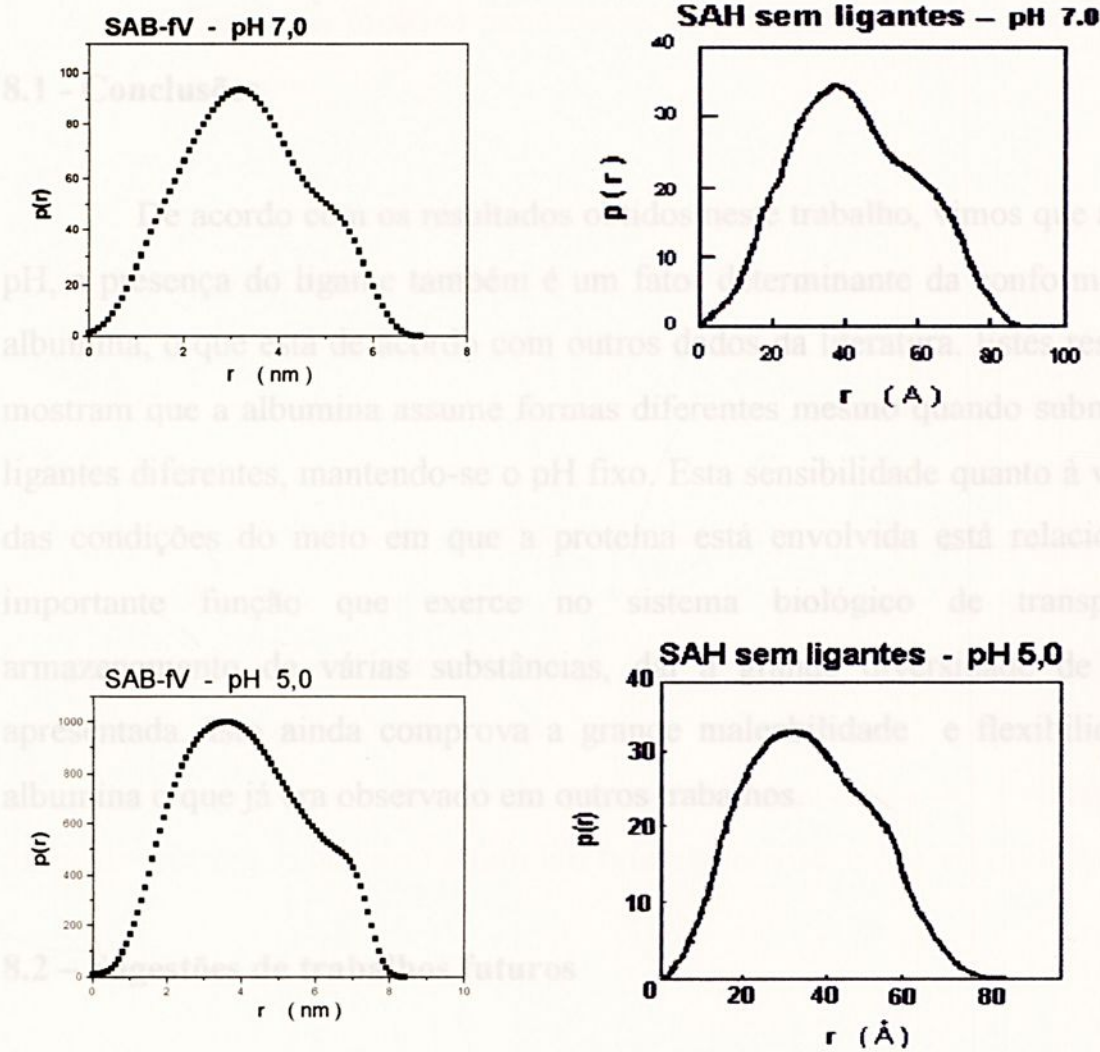


Figura 7.6 - Comparação entre as funções de distribuição de distâncias $p(r)$ das SAH livres de ligantes com as SAB-fV nos valores de pH indicado.

- As seguintes sugestões são propostas para trabalhos futuros:
- Estudar a SAB-Ig em um maior número de pH para comparação com os resultados obtidos da SAB-fV, SAH e SAB livres de ligantes para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas mudanças conformacionais induzidas pelos ligantes.

CAPÍTULO 8 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

8.1 - Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, vimos que além do pH, a presença do ligante também é um fator determinante da conformação da albumina, o que está de acordo com outros dados da literatura. Estes resultados mostram que a albumina assume formas diferentes mesmo quando submetida a ligantes diferentes, mantendo-se o pH fixo. Esta sensibilidade quanto à variação das condições do meio em que a proteína está envolvida está relacionada à importante função que exerce no sistema biológico de transporte e armazenamento de várias substâncias, daí a grande diversidade de formas apresentada. Isto ainda comprova a grande maleabilidade e flexibilidade da albumina o que já era observado em outros trabalhos.

8.2 – Sugestões de trabalhos futuros

As seguintes sugestões são propostas para trabalhos futuros:

- Estudar a SAB-Ig em um maior número de pH para comparação com os resultados obtidos da SAB-fV, SAH e SAB livres de ligantes para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas mudanças conformacionais induzidas pelos ligantes.



- Repetir o experimento para albuminas inicialmente puras, mas adicionando-se ligantes conhecidos de maneira controlada.
- Estudar a proteína em valores de pH acima do pH 7,0 com e sem ligantes.

8.3 - Comentários

Um outro ponto a se destacar é o de que, pessoalmente falando, este trabalho exerceu um papel importante na minha formação, tendo como base a aprendizagem da técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos, em que foram introduzidos entre outros, a parte de calibração e montagem do equipamento de raios X, identificação e solução de diversos problemas surgidos no período, estudo da teoria envolvida e utilização dos vários programas computacionais relacionados desde o tratamento dos dados até a obtenção dos modelos teóricos, o que será muito útil futuramente na minha vida profissional.

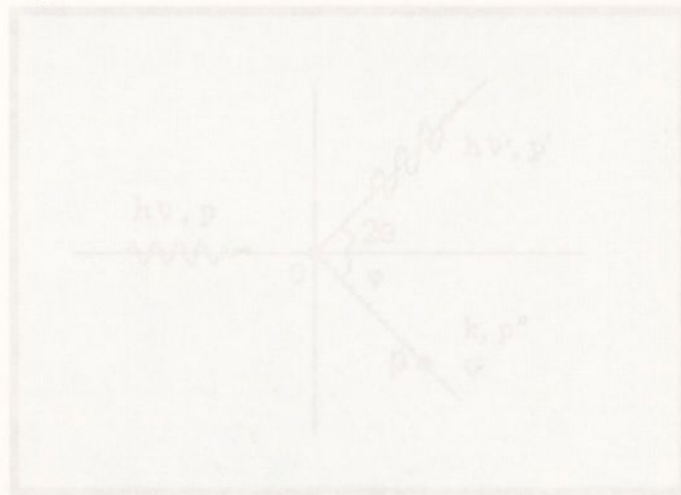


Figura B.1 - Esquema mostrando interação fóton-elétron por efeito Compton.

APÊNDICE A

Dependência do Efeito Compton com o Ângulo de espalhamento

O entendimento de como a radiação é espalhada por um objeto não é simples. Somente uma parte da radiação tem o mesmo comprimento de onda da radiação incidente, o restante do espectro possui comprimentos de onda diferentes, e essa diferença é dependente do ângulo de espalhamento.

Esse segundo tipo de radiação foi descoberto por A. H. Compton (1926) e é facilmente interpretada pelo modelo corpuscular da radiação. Consideramos o espalhamento como o resultado do impacto de um fóton incidente, $h\nu$, sobre um elétron, conforme figura B.1, e aplicamos as leis usuais da mecânica (Guinier, 1963; Eisberg e Resnick, 1979).

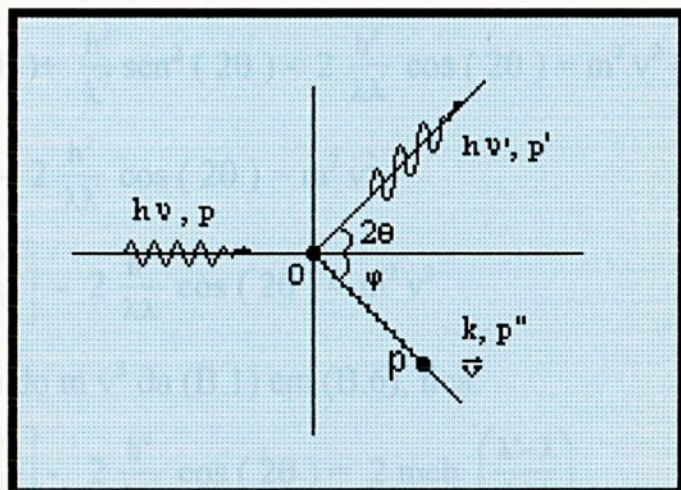


Figura B.1 - Esquema mostrando interação fóton-elétron por efeito Compton.

Pela conservação da energia:

$$h\nu = h\nu' + k = h\nu' + \frac{1}{2} m v^2 \quad \text{B.1}$$

ou $m v^2 = 2 hc \left(\frac{\lambda' - \lambda}{\lambda \lambda'} \right)$, com $v = \frac{c}{\lambda}$, e $v' = \frac{c}{\lambda'}$.

onde, m é a massa do elétron, λ , o comprimento de onda do fóton incidente e λ' , o comprimento de onda do fóton espalhado.

Pela conservação do momento:

$$\vec{p} = \vec{p}' + \vec{p}''$$

$$\frac{h}{\lambda} = \frac{h}{\lambda'} \cos(2\theta) + m v \cos \varphi \quad \text{B.2}$$

e $\frac{h}{\lambda} \sin(2\theta) = m v \sin \varphi \quad \text{B.3}$

Elevando as equações (B.2) e (B.3) ao quadrado, obtemos:

$$\frac{h^2}{\lambda^2} - 2 \frac{h^2}{\lambda \lambda'} \cos(2\theta) + \frac{h^2}{\lambda'^2} \cos^2(2\theta) = m^2 v^2 \cos^2 \varphi \quad \text{B.4}$$

$$\frac{h^2}{\lambda'^2} \sin^2(2\theta) = m^2 v^2 \sin^2 \varphi \quad \text{B.5}$$

Somando as equações (B.4) e (B.5), encontramos:

$$\frac{h^2}{\lambda^2} + \frac{h^2}{\lambda'^2} \cos^2(2\theta) + \frac{h^2}{\lambda'^2} \sin^2(2\theta) - 2 \frac{h^2}{\lambda \lambda'} \cos(2\theta) = m^2 v^2 (\sin^2 \varphi + \cos^2 \varphi)$$

$$\frac{h^2}{\lambda^2} + \frac{h^2}{\lambda'^2} - 2 \frac{h^2}{\lambda \lambda'} \cos(2\theta) = m^2 v^2$$

$$h^2 \left[\frac{\lambda^2 + \lambda'^2}{(\lambda \lambda')^2} \right] - 2 \frac{h^2}{\lambda \lambda'} \cos(2\theta) = m^2 v^2 \quad \text{B.6}$$

Substituindo $m v^2$ da (B.1) em (B.6), fica:

$$h^2 \left[\frac{\lambda^2 + \lambda'^2}{(\lambda \lambda')^2} \right] - 2 \frac{h^2}{\lambda \lambda'} \cos(2\theta) = 2 m c h \left(\frac{\lambda' - \lambda}{\lambda \lambda'} \right) \quad \text{B.7}$$

Vamos assumir que v' é aproximadamente igual a v , e fixamos

$$\lambda' = \lambda + d\lambda \quad \text{B.8}$$

Elevando a (B.8) ao quadrado, obtemos:

$$(\lambda' - \lambda)^2 = (d\lambda)^2$$

$$\lambda^2 + \lambda'^2 - 2\lambda\lambda' = (d\lambda)^2$$

Desprezando o termo do lado direito da expressão acima, fica:

$$\lambda^2 + \lambda'^2 = 2\lambda\lambda' \quad \text{B.9}$$

Substituindo (B.8) e (B.9) em (B.7):

$$h^2 \left[\frac{2\lambda\lambda'}{(\lambda\lambda')^2} \right] - 2 \frac{h^2}{\lambda\lambda'} \cos(2\theta) = 2 mch \left(\frac{d\lambda}{\lambda\lambda'} \right)$$

$$2 \frac{h^2}{\lambda\lambda'} (1 - \cos(2\theta)) = 2 \frac{h}{\lambda\lambda'} mc d\lambda$$

$$d\lambda = \frac{h}{mc} (1 - \cos(2\theta)) \quad \text{B.10}$$

Sendo, $\frac{h}{mc} = 0,0243 \text{ \AA}$, para cálculos de $d\lambda$ em $\text{\AA}$.

Dessa forma, com base na equação (B.10), verificamos que para baixos ângulos $d\lambda$ fica muito próximo de zero, mostrando assim, que o espalhamento Compton é desprezível na região de baixo ângulo.

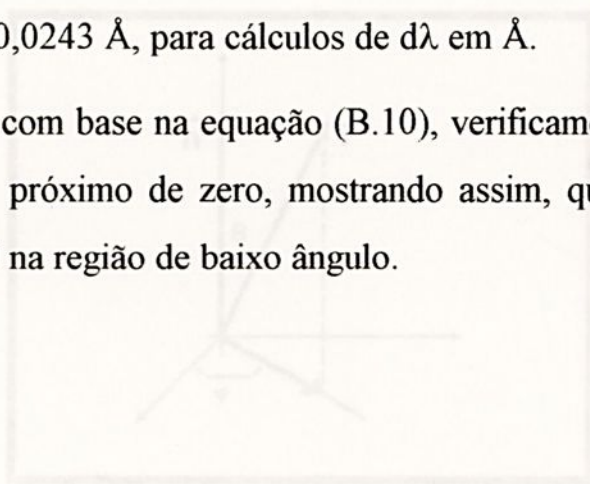


Figura A.1 - Vetores $\vec{h}$ e $\vec{r}$ para cálculo da média do $\cos(\vec{h} \cdot \vec{r})$.

Assim,

$$\langle \cos(\vec{h} \cdot \vec{r}) \rangle = \frac{1}{4\pi} \int_0^\pi \sin \theta d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \cdot \cos(\vec{h} \cdot \vec{r})$$

Fazendo, $\vec{h} \cdot \vec{r} = hr \cos \theta$, então,

$$\langle \cos(\vec{h} \cdot \vec{r}) \rangle = \frac{1}{4\pi} \int_0^\pi \cos(hr \cos \theta) \sin \theta d\theta \int_0^{2\pi} d\phi$$

APÊNDICE B

Cálculo da média do $\cos(\vec{h} \cdot \vec{r})$

A média do $\cos(\vec{h} \cdot \vec{r})$ é calculada pela razão entre a soma de todos os elementos de direção distribuídos esfericamente e a direção total.

Para isso, consideramos um dos vetores fixos em um dos eixos cartesianos, conforme figura A.1.

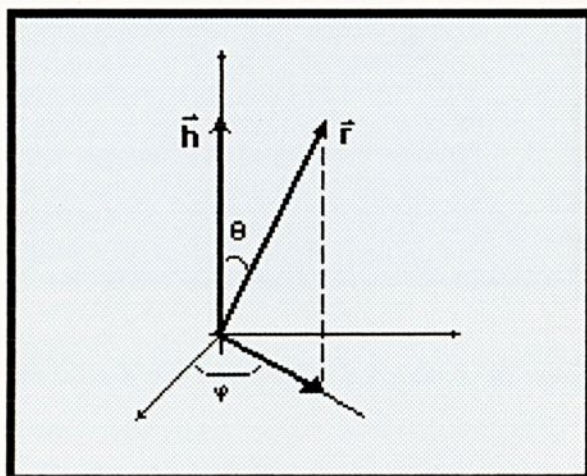


Figura A.1 - Vetores $\vec{h}$ e $\vec{r}$ para cálculo da média do $\cos(\vec{h} \cdot \vec{r})$.

Assim,

$$\langle \cos(\vec{h} \cdot \vec{r}) \rangle = \frac{1}{4\pi} \int_0^\pi \sin \theta \, d\theta \int_0^{2\pi} d\varphi \cdot \cos(\vec{h} \cdot \vec{r})$$

Fazendo, $\vec{h} \cdot \vec{r} = h r \cos \theta$, então,

$$\langle \cos(\vec{h} \cdot \vec{r}) \rangle = \frac{1}{4\pi} \int_0^\pi \cos(hr \cos \theta) \sin \theta \, d\theta \int_0^{2\pi} d\varphi$$

APÊND Sendo,

$$u = h r \cos \theta, \quad du = -h r \sin \theta \, d\theta$$

Dessa forma,

$$\langle \cos (\vec{h} \cdot \vec{r}) \rangle = \frac{1}{2 h r} \int_0^\pi \cos u \frac{du}{-h r}$$

Portanto,

$$\langle \cos (\vec{h} \cdot \vec{r}) \rangle = \frac{\sin h r}{h r} \quad \text{C.1, onde definimos os vetores unitários } \vec{S}_0 \text{ e } \vec{S} \text{ que indicam respectivamente as direções de incidência e de espalhamento.}$$



Figura C.1 - Espalhamento de raios X por uma partícula indicando os vetores de incidência $\vec{S}_0$ e de espalhamento $\vec{S}$.

Conforme definido na seção 4.2, $\vec{s} = \frac{\vec{S} - \vec{S}_0}{\lambda}$ e $\vec{h} = 2 \pi \vec{s}$.

O módulo destes vetores podem ser determinados a partir do triângulo retângulo destacado na figura acima

Assim, $\sin \theta = \frac{s}{\lambda}$, como $S = |\vec{S}| = 1$, temos:

$$s = \frac{\lambda \sin \theta}{2}$$

$$h = 2 \pi s$$

$$h = \frac{4 \pi \sin \theta}{\lambda}$$

APÊNDICE C

A figura 5.8 é um exemplo de atuação do programa ITP para uma curva experimental. **Relação entre as unidades $\bar{s}$, $\bar{h}$ e 2θ .**

A princípio bastaria apenas corrigirmos a curva de intensidade experimental. Vamos considerar um centro espalhador sendo incidido por um feixe de raios X paralelo conforme figura C.1, onde definimos os vetores unitários $\bar{S}_0$ e $\bar{S}$ que indicam respectivamente as direções de incidência e de espalhamento.

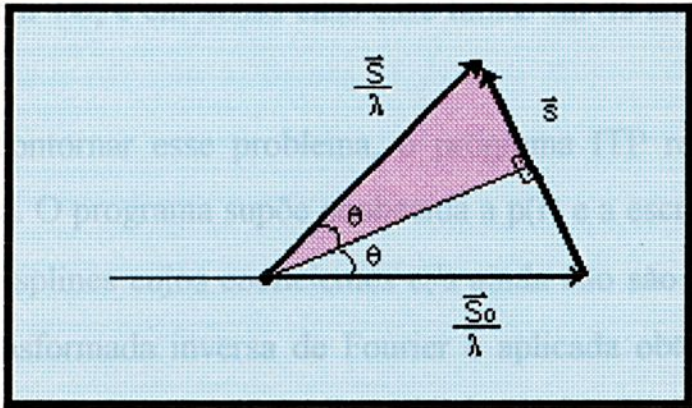


Figura C.1 - Espalhamento de raios X por uma partícula indicando os vetores de incidência $\bar{S}_0$ e de espalhamento $\bar{S}$. Sobre esse resultado são ainda aplicadas as transformações

inversas em relação ao sistema de colimação que dá como resposta uma intensidade corrigida que representa uma incalculável técnica corrigida pelos efeitos do perfil de feixe sendo que os coeficientes permanecem inalterados devido a

Conforme definido na seção 4.2, $\bar{s} = \frac{\bar{S} - \bar{S}_0}{\lambda}$ e $\bar{h} = 2 \pi \bar{s}$. Logo após,

é feito O módulo destes vetores podem ser determinados a partir do triângulo retângulo destacado na figura acima.

Assim, $\text{sen}\theta = \frac{s}{2} \frac{\lambda}{S}$, como $S = |\bar{S}| = 1$, temos:

$$s = \frac{2 \text{ sen } \theta}{\lambda}$$

$$h = 2 \pi s$$

$$h = \frac{4 \pi \text{ sen } \theta}{\lambda}$$

APÊNDICE D

CAPÍTULO 9 - BIBLIOGRAFIA

A figura 5.8 é um exemplo de atuação do programa ITP para uma curva experimental obtida do espalhamento de uma esfera.

A princípio bastaria apenas corrigirmos a curva de intensidade experimental devido aos efeitos de colimação de acordo com as equações (5.10) e (5.11) e aplicarmos uma transformada de Fourier para obtenção de uma função $p(r)$. Caso o procedimento fosse esse, obteríamos como resultado uma função $p(r)$ cheia de oscilações, pois os limites de integração da transformada de Fourier são definidos de $-\infty$ a $+\infty$, e em nosso caso esse limite vai de um certo h_1 a um certo h_2 .

Para contornar esse problema, o programa ITP resolve a questão de maneira indireta. O programa supõe conhecida a $p(r)$ e a escreve como uma soma de n funções β -splines cujos coeficientes c_v 's ainda não são conhecidos. Mesmo assim, uma transformada inversa de Fourier é aplicada obtendo como resposta uma intensidade que representa uma intensidade teórica corrigida pelos efeitos do perfil do feixe, sendo que os coeficientes permanecem inalterados durante a transformada. Sobre esse resultado são ainda aplicadas as transformações inversas em relação ao sistema de colimação, o que dá como resposta uma intensidade teórica que representa a própria intensidade experimental. Logo após, é feito um ajuste entre essas curvas buscando um mínimo entre curva teórica e experimental (equação 5.11). Desse ajuste, obtém-se os coeficientes c_v 's. De posse desses valores, retorna-se às curvas teóricas e calcula-se a intensidade corrigida e a função $p(r)$.

Glatter, O., *Acta Phys. Austr.*, **52**, 243-236 (1980 b)



CAPÍTULO 9 - BIBLIOGRAFIA

- Anderegg, J. W.; Beeman, W. W. Shulman, S. and Kaesberg, P. . *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2927 (1955).
- Barbosa, A.. “Gas Position Sensitive X-Ray Detectors”. CBPF-NC-68 / 94 (1994).
- Carter, D. C.; Xiao-Min He; Munsons, H.; Twigg, R. D.; Gernet, K. M.; Broom, M. B.; Miller, T. K.; *Science*, **244**, 1195-1198 (1989).
- Carter, D. C.; Xiao-Min He; Munsons, H.; Twigg, R. D.; Gernet, K. M.; Broom, M. B.; Miller, T. K.; *Science*, **249**, 302-303 (1990).
- Cullity, B. D.. “Elements of X-ray Diffraction”. Addison-Wesley Publishing Company, inc, California (1978).
- Cunningham, V. J., Hay, L., Stoner, M. B.. *Biochem. J.*, **146**, 653-658 (1975)
- Eisberg, R. e Resnick, R.. “Física Quântica de Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas”. Editora Campus LTDA. Rio de Janeiro (1979)
- Glatter, O. . *J. Appl. Cryst.*, **13**, 7-11 (1980).
- Glatter, O.. *Acta Phys. Austr.*, **52**, 243-256 (1980 b)



Glatter, O. . *J. Appl. Cryst.*, **13**, 577-584 (1982). IFQSC-USP (1992)

Glatter, O. ; Kratky, O.; "Small Angle Scattering of X-Ray". Academic Press, London (1982).

Peters, Theodore Jr.; *Adv. Protein Chem.*, **37**, 161, Academic Press (1985).

Glatter, O.. *Manual de uso dos programas ITP e MULTIBODY*, Áustria (1983)

Pilz, I.; Glatter, O. and Kratky, O. *Methods in Enzymology*, **61**, part 1B, 148-149

Guinier, A. and Fournet, G. ; Small-Angle Scattering of X-Rays. J. Wiley & Sons, New York (1955).

Porod, G.. *Kolloid-z.*, **124**, 83-114 (1951).

Guinier, A.. "X-ray diffraction". W. H. Freeman and Company, USA (1963)

Squire, P. G.; Moser, P. and O'konsky, C. T. . *Biochemistry*, **7**, **12**, 4261-4272

Hunter, M. J., and Mc Duffie, F. C. . *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1400-1406 (1959).

Trehwella, J. . *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 702-708 (1997).

Kratky, O.; Pilz, I. and Schimitz, J.. *J. Colloid and Interface Sci*, **21**, 24-34 (1966). Ragh-Hansen. *Pharmacological Reviews*, **33**, 17-52 (1981).

Laggner, P.; Kratky, O.; Palm, W. H.; Holasek, A. . *Mh. Chem.*, **102**, 1729 (1971).

Luzzati, V. . *Acta Cryst.*, **13**, 939-945 (1960).

Luzzati, V.; Witz J. and Nicolaief A. . *J. Mol. Biol.*, **3**, 379-392 (1961).

Muller, K., Glatter, O. . *Makromol. Chem.*, **183**, 465-479 (1982).



Olivieri, J. R.; Craievich, A. F. *Tese de doutorado*, IFQSC-USP (1992)

Olivieri, J. R.; Craievich, A. F. . *European Biophysics J.*, **24**, 77-84 (1995)

Peters, Theodore Jr.; *Adv. Protein Chem.*, **37**, 161, Academic Press (1985).

Pilz, I.; Glatter, O. and Kratky, O.. *Methods in Enzymology*, **61**, part Hb, 148-149 (1979)

Porod, G.. *Kolloid-z*, **124**, 83-114 (1951).

Squire, P. G.; Moser, P. and O'konsky, C. T. . *Biochemistry*, **7**, 12, 4261-4272 (1968).

Trewhella, J. . *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 702-708 (1997).

Ulrich Kragh-Hansen. *Pharmacological Reviews*, **33**, 17-52 (1981).

Wallevik, K.. *J. Biol. Chem.*, **248**, 8, 2650-2655 (1973).



