

Carolina Tatiani Alves Ferreira

Pivot-SAXS: Desenvolvimento de uma nova
metodologia para caracterização estrutural e
conformacional de macromoléculas combinando SAXS
e simulações computacionais.

São José do Rio Preto

2023

Pivot-SAXS: Desenvolvimento de uma nova
metodologia para caracterização estrutural e
conformacional de macromoléculas combinando SAXS
e simulações computacionais.

Carolina Tatiani Alves Ferreira

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Bio-
física Molecular, junto ao Programa de Pós-
Graduação em Biofísica Molecular, do Insti-
tuto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio
Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Leandro Cristante de
Oliveira

São José do Rio Preto - SP

2023

F383p

Ferreira, Carolina Tatiani Alves

Pivot-SAXS : Desenvolvimento de uma nova metodologia para caracterização estrutural e conformacional de macromoléculas combinando SAXS e simulações computacionais. / Carolina Tatiani Alves Ferreira. -- São José do Rio Preto, 2023

122 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Leandro Cristante de Oliveira

1. Biofísica. 2. Macromoléculas. 3. Desenvolvimento de software. 4. Raios X Espalhamento a baixo ângulo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Pivot-SAXS: desenvolvimento de uma nova metodologia para
caracterização estrutural e conformacional de macromoléculas
combinando SAXS e simulações computacionais

Carolina Tatiani Alves Ferreira

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Leandro Cristante de Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Dr^a. Aline Ribeiro Passos
LNLS – CNPEM

Prof. Dr. Paulo Mascarello Bisch
UFRJ – Câmpus do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Antônio Francisco Pereira de Araújo
Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Letícia Maria Zanthorlin Murakami
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

São José do Rio Preto - SP

23 de março de 2019

À menina esperta de só 4 anos, à criança teimosa e determinada,
à adolescente confusa e assustada, à jovem adulta perdida e
sonhadora,
à mulher inteira que hoje escreve aqui
e a todas que ainda serei.
Não esqueça, essa é pra mim mesma.

Agradecimentos

- Agradeço ao Universo por cada uma das oportunidades que surgiram no meu caminho.
- Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais por todo o amor e carinho, além de serem o melhor exemplo profissional que eu poderia ter.
- Agradeço ao meu orientador, Dr. Leandro Cristante, pela paciência e por me proporcionar uma excelente orientação através de uma nova linha de pesquisa. Aos meus colegas do grupo DoPreDin pelo apoio, contribuições e discussões extremamente valiosas.
- To my foreign advisor, Dr. Sichun Yang, thank you for receiving me during the sandwich period and continuing to advise me even after that.
- Aos meus amigos, fisicamente próximos ou espalhados pelo globo, pela companhia e perseverança durante esses anos e por me permitirem fazer parte dessa família. Eu sei que posso ser difícil, então muito obrigada.
- Aos meus médicos e terapeutas, que me permitiram finalizar esse ciclo em meio a condições menos do que ideais.
- Ao corpo docente e aos funcionários da Escola Bilíngue América pelo apoio nessa reta final.
- Às meninas do grupo Time to Work - PrintGirls, sem vocês eu não teria conseguido escrever nenhuma linha, se esse trabalho existe é por vocês me inspirarem e me lembrarem o quanto a ciência é incrível e que existe espaço pra nós.
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.
- Aos meus professores por construírem meu conhecimento.
- A todos que foram parte da minha vida nesse período e, portanto, me ajudaram a construir esta conquista, eu agradeço e ofereço meu carinho.

"Recognize who you are sometimes, I know it's so hard...
...Realize how far you've come this time, you won't be outdone...
...Give yourself some applause, you deserve it give yourself some
respect 'cause you've earned it..."

Diane Warren & Sofia Carson, Applause

Resumo

A comunidade científica já se utiliza da combinação de técnicas experimentais e computacionais em suas investigações, especialmente para sistemas biológicos complexos devido à dinâmica das macromoléculas em solução e mudanças conformacionais. No entanto, a predição da estrutura de moléculas biológicas em solução é um problema desafiador para teóricos e experimentalistas, dada a falta de técnicas disponíveis para observar esses sistemas. O espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS) é uma técnica experimental que fornece informações quantitativas, como raio de giro e distância entre pares, mas não informações estruturais precisas. No entanto, combinado com uma técnica computacional, SAXS já é capaz de analisar estruturalmente estes sistemas gerando o "envelope", por exemplo. Assim, foi desenvolvido o programa Pivot-SAXS para ampliar as possibilidades de estudos conformacionais. O programa usa uma estrutura inicial e informações de estrutura secundária para criar um potencial baseado em um fator de esfera rígida, que proíbe choques estéricos e minimiza o espaço conformacional. O programa gera novas conformações usando um algoritmo de pivot e avalia a similaridade entre as curvas de espalhamento teórica e experimental, completando o potencial usando o critério de Metropolis. O código está disponível em [Github](#). Os resultados obtidos pelo Pivot-SAXS foram satisfatórios e congruentes com outras metodologias, o que indica sua aplicabilidade em estudos futuros.

Palavras Chaves: Algoritmo. Análise conformacional. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo. Modelagem computacional. Predição de estrutura.

Abstract

The scientific community widely recognizes the importance of combining experimental and computational techniques, especially in complex biological systems due to the dynamic behavior of macromolecules in solution and conformational changes. However, predicting the structure of biological molecules in solution has been a challenging problem for both experimentalists and theoreticians, and there are only a limited number of techniques available to observe these system variations. Small Angle X-ray Scattering (SAXS) is a low-resolution experiment that provides only quantitative information, such as the gyration radius and pair distance. Nevertheless, SAXS can address these systems by providing the "envelope" of the protein. When combined with computational techniques, it becomes a powerful tool for characterizing macromolecules in solution. To address this problem, we developed the Pivot-SAXS software for theoretical protein structure prediction and conformational analysis. The program uses an input conformation to model the molecule and considers information from the secondary structure to build a potential based on a hard-sphere factor to forbid steric clashes and minimize the conformational space. New conformations are generated using a pivot algorithm, and they are assessed by a potential factor that calculates the similarity between the theoretical scattering curve and the experimental profile. This process is completed by evaluating the potential using the Metropolis criteria. It is possible to access the code on [Github](#). The software has achieved satisfactory and coherent results with other methodologies, indicating its potential for future studies.

Key Words: Algorithm; Computational modeling; Small angle X-ray scattering; Structure prediction;

Lista de Figuras

1.1	Planta baixa do Sirius no LNLS.	21
2.1	Ilustração geométrica da lei da reciprocidade.	24
2.2	Esboço de curvas de espalhamento qualitativas para a inci- dência de ondas com o mesmo comprimento de onda sobre partículas de diferentes tamanhos e formas.	24
2.3	Esquema de montagem do experimento de SAXS.	25
2.4	Espalhamento de raios-X por dois elétrons.	27
2.5	Curvas de espalhamento devido à diferentes geometrias.	35
2.6	Gráfico de Guinier para a lisozima.	38
2.7	Representação de uma partícula e seu “fantasma”, formado pelo deslocamento.	38
2.8	Gráfico de Porod para a lisozima.	39
2.9	Diferentes curvas de espalhamento analisadas pelo gráfico de Kratky.	40
2.10	Macromolécula envolta por uma camada de hidratação de es- pessura Δ .	41
3.1	Gráficos de correlação entre os programas SAXS-factor, Cry- sol, Fast-SAXS-pro e FoXS.	51
3.1	Gráficos de correlação entre os programas SAXS-factor, Cry- sol, Fast-SAXS-pro e FoXS. (cont.)	52
3.2	Comparativo entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast- SAXS-pro e FoXS.	53

3.2 Comparativo entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS.(cont.)	54
3.2 Comparativo entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS.(cont.)	55
4.1 Representação da estrutura geral de um aminoácido. Fonte: Autoria própria.	58
4.2 Representação das cadeias laterais de todos os aminoácidos essenciais. Fonte: Nelson e Cox[1].	59
4.3 Representação dos ângulos em um aminoácido. Fonte: Nelson e Cox[1].	59
4.4 Conformação totalmente planar de uma ligação peptídica. Os ângulos φ e ψ estão em posição de 180° . Fonte: Autoria própria.	60
4.5 Ramachandram plot	60
4.6 Representação do sistema de coordenadas 'linha' formado a partir da rotação de ω em torno de Z . Fonte: Autoria própria. .	62
4.7 Validação do potencial do Pivot-SAXS	66
4.8 Conformação de menor chi gerado pelo programa Pivot-SAXS sobreposta à estrutura cristalográfica e à estrutura de entrada.	68
4.9 Diversas conformações obtidas pelo Pivot-SAXS para XylLich	69
4.10 Conformação com menor chi encontrada pelo Pivot-SAXS . .	71
4.11 Comparação dos perfis experimentais da GH5 com o perfil teórico calculado pelo SAXS-factor	72
4.12 Representação das quatro regiões utilizadas como pivot nas simulações. Fonte: Autoria própria.	73
4.13 Comparação entre as conformações iniciais e finais da GH5 . .	74
A.1 Relação entre $f(q)$ e q para diferentes elementos químicos. Fonte:autoria própria	84

B.1 Fluxograma do critério de Metropolis.	87
C.1 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para 1HYPHP.	88
C.2 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para 1RECBP.	89
C.3 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para 1XYNTP.	90
C.4 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para 2HYPHP.	91
C.5 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para APSODP.	92
C.6 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para AT5GHP.	93
C.7 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para C3bEfP.	94
C.8 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para LAR12P.	95
C.9 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para MnmG2X.	96

C.10 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para MRERAP.	97
C.11 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDA32.	98
C.12 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDA62.	99
C.13 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDA78.	100
C.14 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAA2.	101
C.15 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAB2.	102
C.16 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAC2.	103
C.17 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAH2.	104
C.18 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAJ5.	105

C.19 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAK2.	106
C.20 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAK6.	107
C.21 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAL2.	108
C.22 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAN2.	109
C.23 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAQ2.	110
C.24 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAX6.	111
C.25 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDB52.	112
C.26 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDB76.	113
C.27 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDBT4.	114

C.28 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDCD6.	115
C.29 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDCJ6.	116
C.30 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDDH9.	117
C.31 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDDL3.	118
C.32 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDDL6.	119
C.33 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDEL6.	120
C.34 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDEV5.	121
C.35 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDEY3.	122

Lista de Tabelas

3.1	Valores de χ^2 calculados pelos programas SAXS-factor, FoXS, Crysol e Fast-SAXS-pro	49
4.1	Valores de χ^2 e RMSD entre a conformação com menor χ^2 e a estrutura cristalográfica.	67
A.1	Valores de a_i , b_i e c para diversos elementos químicos.	85

Sumário

1	Introdução.	19
2	Fundamentação teórica e metodológica.	23
2.1	Lei da reciprocidade.	23
2.2	Espalhamento da Luz	25
2.3	A interferência e o vetor momento de transferência $\vec{q}$.	27
2.4	Espalhamento por vários elétrons.	28
2.5	Função de auto-correlação.	30
2.6	Aproximação de Debye e função de correlação.	31
2.7	Sistema em solução.	33
2.8	Análises das curvas experimentais de SAXS.	36
2.9	Análise computacional dos dados de SAXS.	40
3	SAXS-Factor	44
3.1	Introdução ao SAXS-factor	44
3.2	Camada de hidratação	45
3.3	Cálculo do fator de espalhamento.	46
3.4	Cálculos Possíveis	47
3.5	Resultados	48
4	Pivot-SAXS	56
4.1	Introdução ao Pivot-SAXS	56
4.2	Dados de entrada	57
4.3	Matrizes de rotação	58
4.4	Potencial do Pivot-SAXS	63
4.5	Resultados	65

5 Conclusão.	75
Referências.	76
Anexo A Parâmetros de Cromer-Mann.	83
Anexo B Critério de Metropolis.	86
Anexo C Curvas teóricas	88

1. Introdução.

Conhecer a estrutura terciária de uma macromolécula é um passo fundamental para estudos tanto do comportamento da proteína em diversos ambientes[2, 3, 4, 5, 6] quanto de sua interação com outras moléculas[7, 8, 9, 10]. Assim, muitas técnicas experimentais foram desenvolvidas para tentar observar o arranjo conformacional das macromoléculas, cada qual com suas vantagens e desvantagens, possibilitando hoje a existência de um banco de dados de estruturas de proteínas com mais de 202000 sequências depositadas até dia 15 de março de 2023, o PDB - do inglês Protein Data Bank[11]. As técnicas de caracterização conformacional em solução disponíveis atualmente, tais quais o espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), a ressonância magnética nuclear (RMN) e transferência ressonante de energia por fluorescência(FRET), possuem fatores limitantes ao estudo das proteínas que dificultam a observação de macromoléculas biológicas muito grandes, muito flexíveis ou com alguma dinâmica conformacional, abrindo espaço para a predição teórica de estruturas.

A partir do estudos de Anfinsen[12], diversas teorias sobre como a conformação final está codificada na estrutura primária surgiram e possibilitaram o desenvolvimento de métodos de predição baseados na sequência de resíduos de aminoácidos[13, 14, 15, 16] e na homologia com estruturas cristalográficas já depositadas no PDB. Nesses casos, a mobilidade e as possibilidades de mudanças conformacionais ainda não são plenamente consideradas. Assim, uma combinação entre técnicas experimentais de estudos em solução e métodos teórico-computacionais se mostra uma boa alternativa à investigação do sistema biológico e suas dinâmicas.

A técnica de espalhamento de raio-X a baixo ângulo ou SAXS, do

nome em inglês *small angle X-ray scattering* é muito eficiente para a observação do comportamento estrutural da proteína em solução e está disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), o único laboratório de luz síncrotron da América Latina. Porém a falta de ferramentas capazes de calcular modelos estruturais que satisfaçam o dado experimental, leva ao descarte destes dados e à busca por outras técnicas mais cara e complexas.

O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado no campus do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas-SP, possui laboratórios de ponta que oferecem uma infraestrutura avançada para a obtenção de dados de SAXS. Anteriormente, o local abrigava o UVX, que era o único equipamento desse tipo na América Latina na época de sua inauguração e possuía um anel de cerca de 93 metros de circunferência e 30 metros de diâmetro. No entanto, o UVX foi desativado para dar lugar ao Sirius, um projeto revolucionário na ciência brasileira, cuja construção teve início em 2014 e foi inaugurado em 14 de novembro de 2018. O Sirius abriga um anel de cerca de 518 metros de circunferência e 165 metros de diâmetro, com até 38 linhas de luz e a capacidade de alcançar energias de 3 GeV[17]. Em 2020, a primeira linha de luz do Sirius foi ativada, o que tem auxiliado em estudos importantes, incluindo pesquisas relacionadas à COVID-19. Para melhor compreensão da estrutura do Sirius, é possível conferir o esquema na figura 1.1.

O Brasil oferece tecnologia avançada para a comunidade científica, incluindo equipamentos de ponta para análise de SAXS no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas-SP, como descrito anteriormente. No entanto, é importante destacar que essa técnica também está acessível a outros pesquisadores, pois existem equipamentos de bancada disponíveis que permitem a obtenção de dados de boa qualidade de forma simples e prática. Dessa forma, o SAXS é uma ferramenta amplamente disponível e pode ser utilizada em diversas áreas de pesquisa.

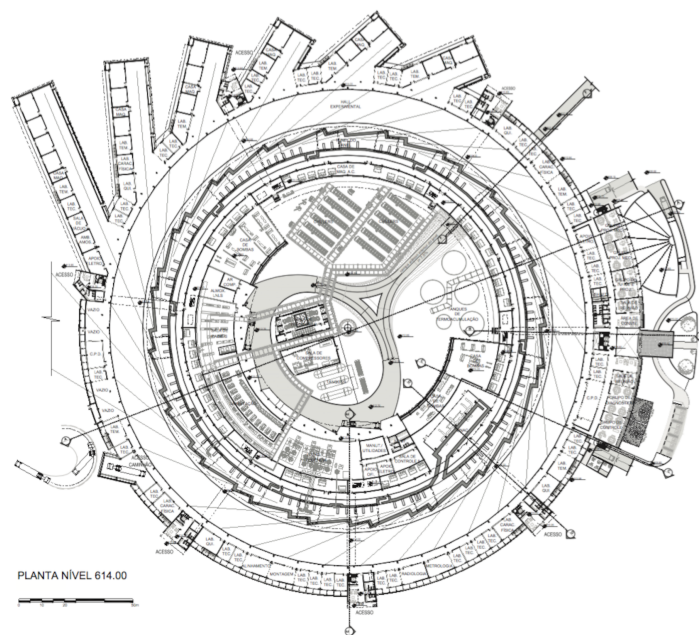


Figura 1.1: Planta baixa do Sirius no LNLS. A figura mostra o anel do Sirius em detalhes, incluindo suas 40 linhas de luz e as estações de pesquisa. [17].
 Fonte: CNPEM [17].

Por si só, os dados de SAXS já permitem diversas análises estruturais [18, 19] tais como raio de giro, estado de enovelamento, distância de pares [20] e mudanças conformacionais. SAXS é uma técnica de baixa resolução, ou seja, limitações intrínsecas do método, discutidas na seção 2.4, impossibilitam a recuperação completa das posições atômicas tridimensionais e assim, a associação com algoritmos computacionais foi essencial para que as análises estruturais tivessem maior precisão. Stuhmann [21] foi pioneiro no cálculo do envelope das proteínas a partir de uma curva experimental, desde então já se desenvolveram programas capazes de calcular uma curva de espalhamento teórica a partir de posições atômicas fornecidas, dentre os mais conhecidos estão o Crysol [22] e FoXS [23]. A combinação das ferramentas teórico e experimental se prova, assim, muito proveitosa para enriquecer os estudos sobre a superfície da molécula [24, 25, 26], enovelamento [5] e mudanças conformacionais [27, 28].

Este trabalho teve como objetivo expandir a aplicabilidade da técnica SAXS, utilizada em estudos de superfície de proteínas, para análises estruturais mais complexas. Para isso, foi desenvolvido o programa Pivot-SAXS, que utiliza o perfil de espalhamento e movimentos de pivot para estimar possíveis estruturas terciárias da proteína em solução. A utilização desta informação é importante para o estudo de mudanças conformacionais, mecanismos de funcionamento e para a possibilidade de utilização em conjunto com preditores de estrutura secundária para estruturas não cristalizáveis. Neste estudo, são descritos os algoritmos utilizados no Pivot-SAXS, incluindo o algoritmo SAXS-factor, que é semelhante a outros softwares utilizados pela comunidade científica. O algoritmo SAXS-factor foi validado no capítulo 3 e, em seguida, incorporado ao Pivot-SAXS no capítulo 4.

Nos capítulos seguintes detalharemos mais sobre a teoria do espalhamento de raios-X a baixo ângulo, demonstraremos os passos e explicaremos todas as etapas de validação que foram necessárias durante a construção do programa final.

2. Fundamentação teórica e metodológica.

O espalhamento de raios-X a baixo ângulo é uma técnica de análise espectroscópica, amplamente utilizada para análise conformacional e estrutural de moléculas biológicas[18]. As amostras não precisam ser cristalizadas, podendo ser analisadas em solução e permitindo o estudo de sistemas em diferentes condições de pH, temperatura e concentração. Também é um recurso de baixo custo quando comparado com outras técnicas que visam o estudo dos aspectos estruturais de sistemas isotrópicos e não-periódicos de diversos tamanhos.

2.1 Lei da reciprocidade.

O SAXS, assim como várias outras técnicas de espalhamento, baseia-se na chamada lei da reciprocidade, responsável pela redução proporcional entre o ângulo de espalhamento observável e o tamanho da partícula. A técnica é assim eficiente na avaliação de estruturas de tamanhos coloidais, na faixa de dezenas e milhares de Å, consideradas gigantes quando comparadas com o comprimento de onda dos raios-X, cerca de 1,54Å para as linhas comumente usadas em experimentos com proteínas. Tal propriedade pode ser observada pela comparação entre partículas de tamanhos diferentes.

As figuras 2.1 e 2.2 apresentam as ideias fundamentais do espalhamento pela lei da reciprocidade e por esboços de curvas de espalhamento. Na figura 2.1a, duas ondas são espalhadas a um ângulo 2θ e possuem uma diferença de caminho ótico de 1λ . Quando a interferência de todos os elétrons é considerada, há uma interferência destrutiva na direção 2θ , e, portanto, não há contribuição de espalhamento. Ao analisar ângulos menores, a interferên-

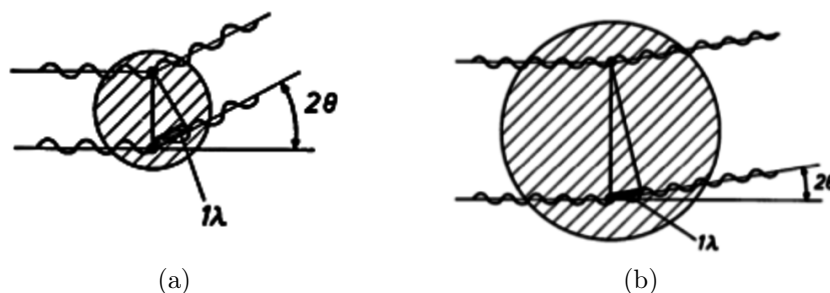


Figura 2.1: Ilustração geométrica da lei da reciprocidade.

Fonte: [Glatter e Kratky \[18\]](#)

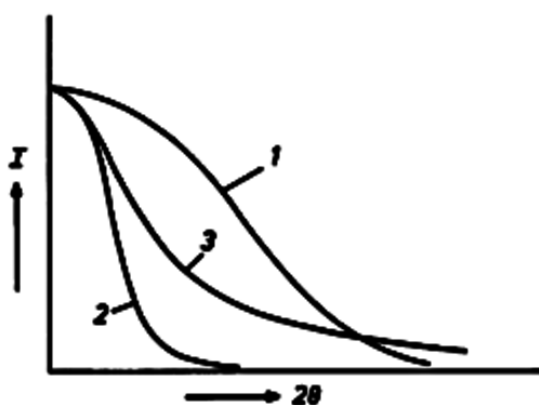


Figura 2.2: Esboço de curvas de espalhamento para a incidência de ondas com o mesmo comprimento de onda sobre partículas de diferentes tamanhos e formas.

Fonte: [Glatter e Kratky \[18\]](#).

cia se torna construtiva, e a intensidade de espalhamento aumenta até atingir seu máximo na direção em que o ângulo de espalhamento é zero e todas as ondas estão em fase. A curva de espalhamento gerada é representada pela curva 1 na figura [2.2](#). As curvas 1 e 2 representam objetos de mesmo formato, enquanto a figura 3 possui um formato mais alongado.

Ao considerar uma partícula maior e com forma e distribuição isotrópica semelhantes às ilustradas na figura [2.1b](#), é possível perceber que a diferença de caminho ótico de 1λ ocorre para valores de 2θ relativamente menores. Nesse caso, a interferência destrutiva se inicia em ângulos baixos,

tornando a curva de espalhamento mais estreita e semelhante à curva 2 na figura 2.2. Assim, entende-se que o espalhamento de raio-X a baixo ângulo ocorre para partículas grandes em relação ao comprimento de onda do raio incidente, comprovando a lei da reciprocidade.

2.2 Espalhamento da Luz

Feixes de raios-X podem ser obtidos por luz síncrotron. Isso permite que a fonte seja contínua e de alta intensidade e colimação. Assim, é possível a realização de uma grande diversidade de experimentos com vários materiais e condições.

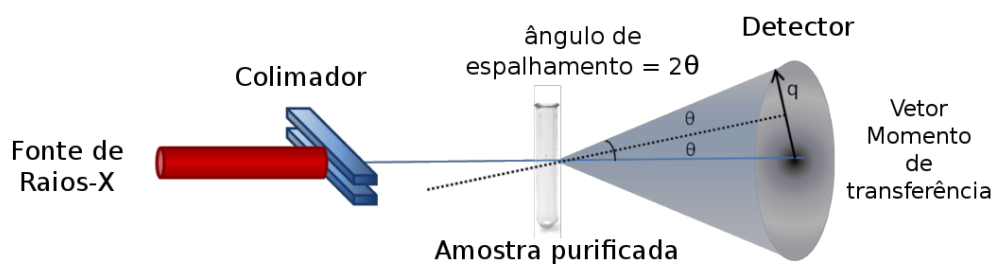


Figura 2.3: Esquema de montagem do experimento de SAXS. O sistema é mantido no vácuo.

Fonte: adaptada de Putnam, Lowe e Meiler[29].

O experimento está apresentado na figura 2.3 e consiste em uma fonte de raios-X paralelos ou colimados, um suporte para a amostra, um bloqueio na direção de incidência dos raios-X e um detector.

O feixe de raios-X deve incidir sobre a amostra fazendo com que os elétrons vibrem na mesma frequência. Devido a esta ressonância, os elétrons emitem ondas secundária coerentes que interferem de forma destrutiva ou construtiva. A interferência destrutiva de todas as ondas secundárias espalhadas com ângulo 2θ leva a um espalhamento nulo nesta direção, e a máximo em $\theta = 0$. Na montagem o bloqueio, chamado beamstop é colocado neste ponto para evitar que o perfil seja distorcido pela alta intensidade, pois

grande parte da radiação não interage com a amostra e, portanto, atingiria o coletor com ângulo $\theta = 0$. O beamstop impede que esta radiação afete os resultados, porém o valor de $I(0)$ também é perdido e este deve ser calculado computacionalmente, como explicado na seção [2.8](#)

É importante avaliar o balanço de energia do sistema. Nesta montagem, a energia de um fóton de raios-X é maior que a energia nuclear de ligação de um átomo, assim, todos os elétrons se comportarão como uma partícula espalhadora livre e as ondas espalhadas serão coerentes. A amplitude resultante, nomeada aqui por A , será dada pela soma das amplitudes A_n de todas as ondas espalhadas N como apresentado na equação [2.1](#).

$$A = \sum_{n=1}^N A_n \quad (2.1)$$

Este tipo de experimento envolve uma onda eletromagnética interagindo com um elétron. Tal interação é chamada espalhamento elástico de Thompson. Ao ser espalhada, a onda perde uma quantidade de energia proporcional ao seu ângulo de espalhamento. E todas as ondas secundárias possuem a mesma intensidade dada por:

$$I_e(\theta) = I_p \cdot \frac{e^2}{mc^2} \cdot \frac{1}{r^2} \cdot \frac{1 + \cos^2(2\theta)}{2}, \quad (2.2)$$

onde I_p é a intensidade primária, ou seja, relativa à onda incidente, r se refere à distância entre a partícula espalhadora e o detetor. A relação (e^2/mc^2) é devido ao quadrado do raio do elétron clássico.

A dependência da intensidade com o ângulo de espalhamento 2θ é bem sutil, podendo ser reduzida a 1 para os baixos valores de θ analisados no experimento.

2.3 A interferência e o vetor momento de transferência $\vec{q}$.

Por convenção, a amplitude e a intensidade das ondas espalhadas assumiram os valores de 1 por facilidade nos cálculos, fazendo com que somente exista diferença na fase, que está relacionada com a posição no espaço do elétron espalhador. Cada onda espalhada é representada pela função complexa $e^{i\varphi}$, onde φ indica a fase.

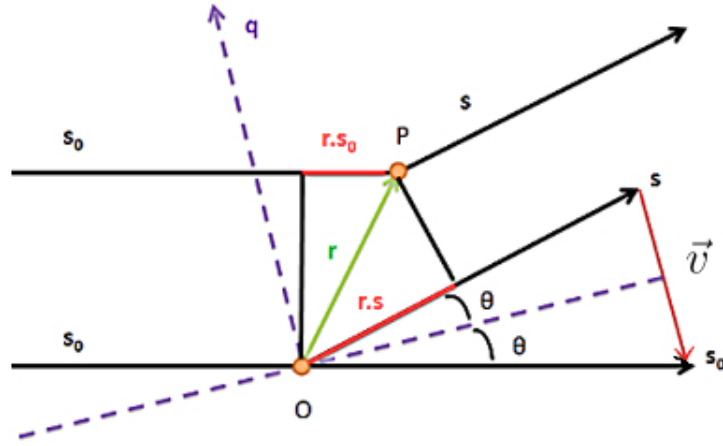


Figura 2.4: Espalhamento de raios-X por dois elétrons para uma partícula fixa.

Fonte: adaptada de [Putnam, Lowe e Meiler\[29\]](#).

A magnitude da fase é dada pelo fator $2\pi/\lambda$ multiplicado pela diferença de caminho entre as ondas incidente e espalhada, cujas direções são representadas na figura [2.4](#), por S_0 e S , respectivamente. O ponto P, na mesma figura, é dado pela distância $\vec{r}$ até a origem O. Há uma diferença de caminho ótico entre estes pontos de $-\vec{r} \cdot \vec{v}$, em que $\vec{v}$ é o vetor diferença entre a onda espalhada e a projeção da onda incidente. Assim, a fase será dada pela equação:

$$\varphi = -\frac{2\pi}{\lambda} \vec{r} \cdot \vec{v} \quad (2.3)$$

Um outro importante parâmetro que pode ser obtido é o vetor momento de transferência $\vec{q}$, também apresentado na figura 2.4, e que define a curva de espalhamento no espaço recíproco, possuindo unidade inversas de comprimento. Tal grandeza independe da distância até o detetor e do tipo de radiação incidente e é utilizada para comparação entre diferentes técnicas de espalhamento, tais quais o SAXS e a difração. O vetor $\vec{q}$ possui módulo dado por:

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}. \quad (2.4)$$

Os vetores $\vec{q}$ e $\vec{v}$ possuem a mesma direção e, segundo o esboço da figura 2.4, a magnitude de $\vec{v}$ é de $2 \sin \theta$, com θ sendo a metade do ângulo de espalhamento. Então ao substituir este valor na equação 2.4, obtêm-se o vetor $\vec{q}$:

$$\vec{q} = \frac{2\pi}{\lambda} \times \vec{v} \quad (2.5)$$

Analisando as equações 2.3 e 2.5, nota-se que a fase pode ser escrita como função do vetor momento de espalhamento e da distância $\vec{r}$.

$$\varphi = -\vec{q} \cdot \vec{r} \quad (2.6)$$

2.4 Espalhamento por vários elétrons.

Considerando que a amostra possui uma grande quantidade de elétrons, não precisamente localizados, o conceito de densidade eletrônica se faz útil para os cálculos. A densidade eletrônica é definida como o número de elétrons por unidade de volume dV .

No experimento de SAXS, a diferença de densidade eletrônica (ρ) entre a amostra e o solvente é observado. Se a $\rho_{amostra}$ é igual à $\rho_{solvente}$

não há espalhamento observável, pois as ondas espalhadas se cancelam. Para obter a densidade eletrônica apenas da amostra, é subtraída a densidade eletrônica do solvente puro e a densidade eletrônica da solução (soluto + solvente).

Em casos pela literatura científica[19], o termo densidade eletrônica pode ser usado para expressar a ideia de contraste ou diferença de densidade eletrônica entre soluto e solvente.

Este conceito permite dizer que a amplitude A_n da onda espalhada por uma unidade de volume dV é dada por:

$$A_n = dV \cdot \rho(\vec{r})e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}}, \quad (2.7)$$

onde $e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}}$ é a representação complexa da onda espalhada pelo volume dV com densidade eletrônica $\rho(\vec{r})$, com $\vec{q}$ dado pela equação 2.4. Ao transformar o somatório da equação 2.1 em uma integral sobre todo o volume V irradiado pelo feixe é possível calcular a amplitude A .

$$A(\vec{q}) = \iiint dV \cdot \rho(\vec{r})e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} \quad (2.8)$$

Pode-se notar que a amplitude é dada, matematicamente, pela transformada de Fourier de $\rho(\vec{r})$ e, pela a propriedade da transformada inversa, $\rho(\vec{r})$ pode ser calculada a partir da amplitude $A(\vec{q})$ pela equação 2.9, tornando-a proporcional ao módulo $|A(\vec{q})|$ e a fase φ por meio da exponencial $e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}}$.

$$\rho(\vec{r}) = \iiint dV \cdot A(\vec{q})e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} \quad (2.9)$$

O cálculo de $\rho(\vec{r})$ é relevante por ser uma variável real e positiva, porém a amplitude não é uma quantidade possível de ser medida. A intensidade de espalhamento é obtida experimentalmente e é proporcional ao quadrado da amplitude da forma explicitada na equação 2.10, onde A^* é o complexo conjugado da amplitude.

$$I(\vec{q}) \propto A^* A = |A(\vec{q})|^2 e^{-i\vec{q} \cdot \vec{r}} e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} \quad (2.10)$$

Dessa forma, a intensidade é proporcional apenas ao módulo da amplitude e a fase $\varphi = \vec{q} \cdot \vec{r}$ é perdida durante o cálculo, impossibilitando que $\rho(\vec{r})$ seja devidamente conhecido. Tal situação leva a um entrave chamado de problema da fase, discutido a seguir.

2.5 Função de auto-correlação.

O problema da fase impede o cálculo da densidade eletrônica diretamente, como exposto na seção anterior. Todavia, a relação entre a amplitude e a intensidade na equação 2.10 apresenta uma abordagem alternativa. Em seus estudos, Patterson[30] utilizou-se das relações de proporcionalidade entre a amplitude e a intensidade estabelecida pela equação 2.10, assim como da proporção entre a amplitude e a densidade eletrônica, demonstrada na equação 2.8.

Seguindo suas ideias é possível obter a intensidade como a transformada de Fourier de ρ .

$$I(\vec{q}) = \iiint \iiint dV_1 \cdot dV_2 \cdot \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_2) \exp[-i\vec{q}(\vec{r}_1 - \vec{r}_2)] \quad (2.11)$$

Ao considerar uma partícula diluída a integral 2.11 torna-se relativa, apenas, às propriedades dos elementos dV da própria partícula, ou seja, da distância intra partícula $\vec{r} = \vec{r}_2 - \vec{r}_1$ e das densidades eletrônicas ρ de cada um.

Por ser uma integral de resolução complexa, a solução deve ser feita em dois passos:

- Cálculo da função de auto-correlação $\tilde{\rho}(\vec{r})$: Também conhecida como

função de Patterson [18] é definida por uma relação entre o espaço real e o chamado espaço recíproco. Cada par disposto à uma distância relativa $\vec{r} = (\vec{r}_2 - \vec{r}_1)$ constante será representado por um ponto no espaço recíproco e a densidade desses pontos é dada por $\tilde{\rho}(\vec{r})$ na equação 2.12. Como cada par é contabilizado duas vezes, o espaço recíproco deverá possuir um centro de simetria.

$$\tilde{\rho}^2(\vec{r}) = \iiint dV_1 \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_2). \quad (2.12)$$

- Integração sobre todo o espaço recíproco: Esse segundo passo leva á outra transformada de Fourier e prova que a intensidade depende apenas da estrutura do objeto de estudo.

$$I(\vec{q}) = \iiint dV \cdot \tilde{\rho}^2(\vec{r}) \cdot e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}}. \quad (2.13)$$

Assim, a função de auto-correlação pode ser obtida a partir da transformada inversa da intensidade $I(\vec{q})$, dada por:

$$\tilde{\rho}^2 = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^3 \iiint dq_x dq_y dq_z \cdot I(\vec{q}) \cdot e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}}, \quad (2.14)$$

As equações acima demonstram uma relação de proporcionalidade inversa entre o espaço real e o espaço recíproco, pois são ligadas apenas pelo fator $e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}}$. A equação demonstra matematicamente a lei da reciprocidade discutida na seção 2.1.

2.6 Aproximação de Debye e função de correlação.

É possível utilizar duas restrições, encontradas na maioria dos casos, para facilitar as análises das curvas.

- Sistema estatisticamente isotrópico: O espalhamento não é afetado pela direção de incidência, impondo que a distribuição de pares de distâncias depende apenas de $|\vec{r}|$ e confirma a centro-simetria do espaço recíproco. Devido a independência da distribuição de pares com relação a direção, é possível substituir o fator de fase pela sua média sobre todas as direções.

$$\langle e^{i\vec{q}\cdot\vec{r}} \rangle_{\vec{r}} = \frac{\sin qr}{qr}. \quad (2.15)$$

Esta equação é chamada fórmula fundamental de Debye [18]. Com esta substituição a intensidade definida na equação 2.13 se torna:

$$I(q) = 4\pi \int_0^\infty r^2 \tilde{\rho}^2 \frac{\sin qr}{qr}. \quad (2.16)$$

- Ausência de correlação entre pontos distantes: No limite de grandes valores de $\vec{r}$, as densidades de elétrons $\rho_1(\vec{r}_1)$ e $\rho_2(\vec{r}_2)$ se tornam independentes e podem ser substituídas pela média $\langle \rho \rangle$, fazendo a função de Patterson tender para um valor constante $V \langle \rho \rangle$ e assumindo, na origem, seu valor máximo igual a $\tilde{\rho}^2(0) = V \overline{\rho^2}$.

A informação estrutural se concentra na região finita, em que $\langle \rho \rangle^2$ difere do valor final. Tal valor, por ser constante, não contribui para o padrão de difração, não tendo, portanto, relevância para as investigações sobre as estruturas estudadas.

Convém utilizar a flutuação de densidade eletrônica $\eta = \rho - \langle \rho \rangle$ por ser mais informativa que apenas a densidade eletrônica ρ . Deve-se, então redefinir a função de auto-correlação 2.12

$$\tilde{\eta}^2 = (\widetilde{\rho - \langle \rho \rangle})^2 = V \cdot \gamma(r). \quad (2.17)$$

Na equação 2.17 foi introduzida a chamada função de correlação 31 $\gamma(r)$ que pode ser definida pela equação 2.18 com $r = |r_1 - r_2|$ e interpretada como a média do produto de duas flutuações à uma distância r uma da outra.

$$\gamma(r) = \langle \eta(r_1)\eta(r_2) \rangle \quad (2.18)$$

Esta função também segue as restrições acima tendo $\gamma(0) = \langle \eta^2 \rangle$ e $\gamma \rightarrow 0$ para r muito grande.

2.7 Sistema em solução.

Em sistemas diluídos, como uma proteína em meio intracelular, o contraste entre a partícula (ρ) e o meio (ρ_0) é uma medida viável e informativa. É possível relacionar a função de correlação $\gamma(\vec{r})$ e $(\Delta\rho)^2 = (\rho - \rho_0)^2$ usando uma função γ_0 chamada função intrínseca 32, dada por:

$$\gamma(r) = (\Delta\rho)^2 \gamma_0(r) \text{ com } \begin{cases} \gamma_0(0) = 1 \\ \gamma_0(r \geq D_{\text{máx}}) = 0 \end{cases}, \quad (2.19)$$

onde $D_{\text{máx}}$ é a maior distância entre pontos internos da proteína e γ_0 depende apenas da geometria da partícula. Assim a intensidade de espalhamento, apresentada na equação 2.20, pode ser escrita de forma generalizada e intuitiva como uma transformada de Fourier da função intrínseca, possibilitando o cálculo da mesma pela transformada inversa na equação 2.21

$$I(q) = 4\pi V (\Delta\rho)^2 \int_0^{D_{\text{máx}}} r^2 dr \cdot \gamma_0(r) \frac{\sin qr}{qr}, \quad (2.20)$$

$$V (\Delta\rho)^2 \gamma_0(r) = \int_0^\infty q^2 dq \cdot I(q) \frac{\sin qr}{qr} \quad (2.21)$$

A intensidade é uma variável medida experimentalmente, portanto é uma vantagem se ter uma quantidade possível de ser calculada através da

mesma. A distribuição de distância de pares permite uma análise da geometria da partícula estudada e, também pode ser calculada a partir da intensidade, pois se relaciona com a função intrínseca da forma $p(r) = 4\pi r^2 \gamma_0(r)$. O espaço real e recíproco são, então, unidos pela equação [2.22](#)

$$I(q) = V(\Delta\rho)^2 \int_0^{D_{\text{máx}}} p(r) \cdot dr \frac{\sin qr}{qr} \quad (2.22)$$

A distribuição de pares $p(r)$ possui as mesmas informações que a intensidade, porém a $p(r)$, por estar representando o espaço real, possui uma visualização mais imediata sobre a geometria da molécula.

A figura [2.5](#)(b) apresenta diversos objetos com a mesma distância interna máxima ($D_{\text{máx}}$) e as respectivas curvas de intensidade e distâncias de pares. As diferenças nas curvas de $p(r) \times r$ são bastante características de cada formato, estruturas globulares possuem uma curva gaussiana com o máximo, aproximadamente, em $D_{\text{máx}}/2$. Partículas achatadas ou alongadas causam um deslocamento do máximo para $r < D_{\text{máx}}/2$ enquanto para cascas esféricas o deslocamento é para $r > D_{\text{máx}}/2$. Estruturas compostas por subunidades separadas produzem dois máximos, um relativo às distâncias internas de cada subunidade e outro à distância entre as subunidades.

Para auxiliar os cálculos posteriores é possível estabelecer uma quantidade Q chamada de invariante. Em situações em que o fator de Debye $\frac{\sin qr}{qr}$ assume valor 1, ou seja, quando $r = 0$ ou $q = 0$, a intensidade $I(0)$ é dada pela equação [2.23](#) mas não pode ser medida, precisando ser extrapolada computacionalmente. Tornando $V\gamma(0)$, na equação [2.24](#), uma melhor opção de cálculo, pois evita a necessidade de calcular $I(0)$.

$$I(q) = 4\pi V(\Delta\rho)^2 \int_0^{D_{\text{máx}}} r^2 dr \cdot \gamma_0(r) \frac{\sin qr}{qr} \approx (\Delta\rho)^2 V^2 \quad (2.23)$$

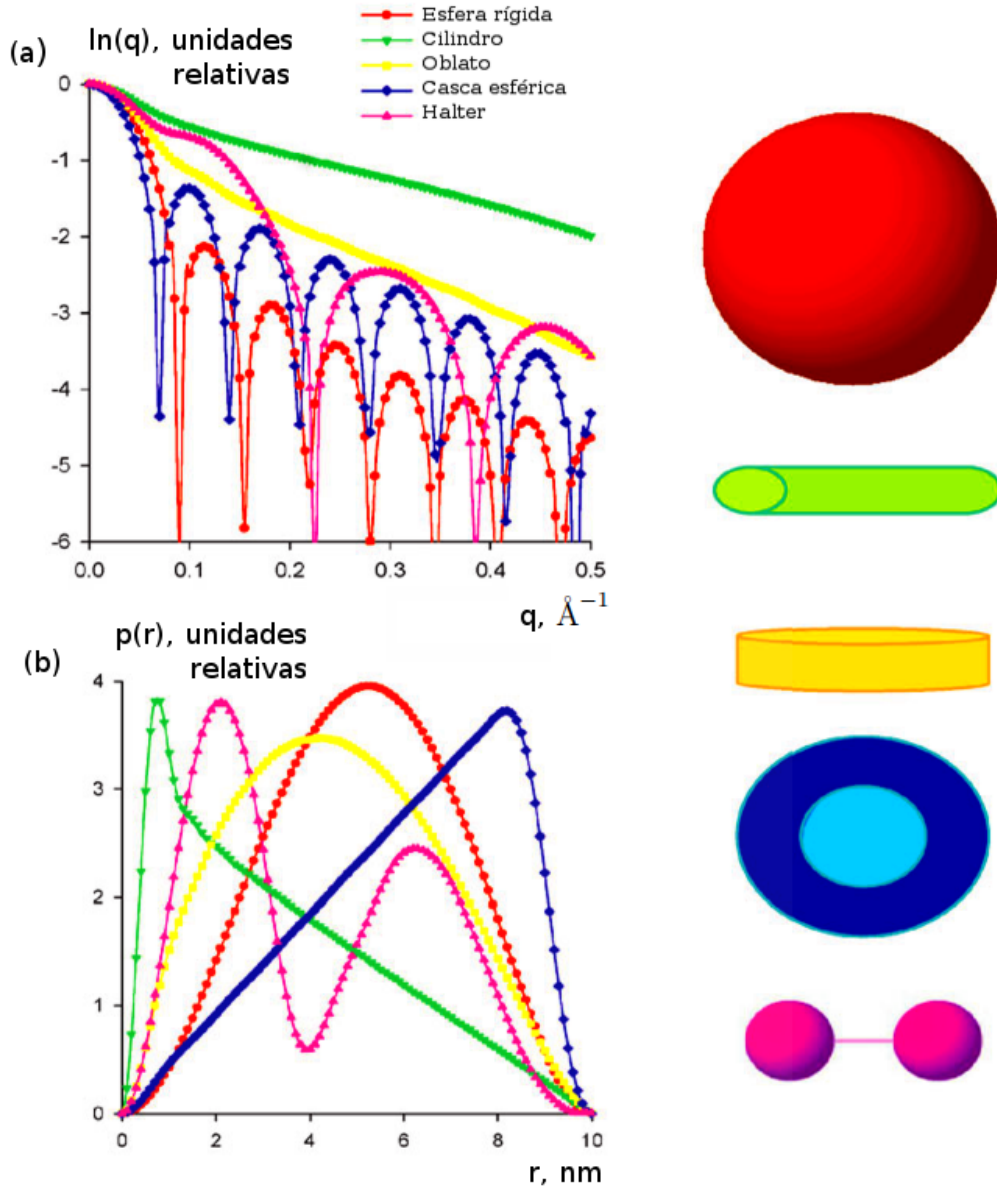


Figura 2.5: Na figura (a) observa-se o perfil de espalhamento devido à diferentes formas geométricas. E (b) está a distribuição de distância de pares para estas mesmas figuras.

Fonte: adaptada de Svergun e Koch[25].

$$V\gamma(0) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 dq \cdot I(q) = V\overline{\eta^2}, \quad (2.24)$$

onde $\overline{\eta^2}$ é a média do quadrado da flutuação e, portanto $V\overline{\eta^2}$ é constante.

Esta equação indica a conexão da intensidade com a flutuação de elétrons da partícula e não apenas com sua forma. Assim, se a partícula sofrer algum tipo de deformação estrutural sem que haja rupturas, mesmo que o padrão de espalhamento seja alterado, o valor Q na equação 2.25 deve se manter a mesma.

$$Q = \int_0^\infty q^2 dq \cdot I(q) \quad (2.25)$$

Por ser um valor constante pode ser escrita como na equação 2.25 ao considerar a intensidade calculada na por 2.23.

$$Q = 2\pi^2(\Delta\rho)^2V \quad (2.26)$$

2.8 Análises das curvas experimentais de SAXS.

A curva de espalhamento refere-se a estrutura externa, também chamada de envelope da molécula. É possível determinar algumas outras propriedades ao analisar as três regiões da curva: pequenos ângulos de espalhamento ($q \rightarrow 0$), para determinação do raio de giro (R_g), maiores ângulos de espalhamento ($q \rightarrow \infty$) e também convém estudar a região central para informações sobre estrutura interna, para a estrutura mais superficial.

Considerar a equação de Debye 2.15 para valores pequenos de q , ou seja, para a região de Guinier, possibilita o uso de uma expansão em série de potências 19 em série de McLaurin como apresentada na equação 2.27. Geralmente, usa-se os primeiros termos desta série na equação 2.16 para $q = 0$, obtendo assim a equação 2.28 que relaciona a intensidade e a distância quadrática média dos elétrons até o centro de massa da molécula, chamado de raio de giro, R_g .

$$\frac{\sin qr}{qr} = 1 - \frac{q^2 r^2}{6} + \frac{q^4 r^4}{120} + \dots \quad (2.27)$$

$$I(q) = I(0) \left[1 - \left(\frac{q^2 R_g^2}{6} \right) \right]. \quad (2.28)$$

A região de Guinier é delimitada pela regra:

$$q \cdot R_g < 1,3. \quad (2.29)$$

Em 1955, Guinier e Fournet [33] observam que a intensidade pode ser escrita como uma função exponencial 2.30, pois o fator de expansão $1 - \frac{q^2 R_g^2}{6}$ também pode ser considerado como os primeiros termos de uma expansão da exponencial $\exp \frac{-q^2 R_g^2}{3}$.

$$I(q) = I(0) e^{\frac{-q^2 R_g^2}{3}} \quad (2.30)$$

Assim, o gráfico de Guinier, dado por $\ln I(q) \times q^2$ e demonstrado na figura 2.6 e segue a equação 2.30 linearizada,

$$\ln I(q) = \ln I(0) - \frac{q^2 R_g^2}{6}. \quad (2.31)$$

Dessa forma, o gráfico de Guinier será uma reta com coeficiente linear igual à $\ln I(0)$ e coeficiente angular proporcional ao raio de giro.

A área central da curva $I(q)$ está ligada com a estrutura e dimensões gerais da partícula. O volume excluído, também chamado de volume de Porod, é definido como o volume da intersecção entre uma partícula e o seu “fantasma” após um deslocamento de r , onde r é menor que o tamanho da partícula. A construção é representada na figura 2.7.

O volume de Porod é, portanto, uma dimensão importante que pode ser calculada pela equação 2.32 e está diretamente ligada ao valor γ_0 , de forma que os pontos contidos neste espaço são apenas àqueles que contribuem efetivamente para o cálculo da mesma.

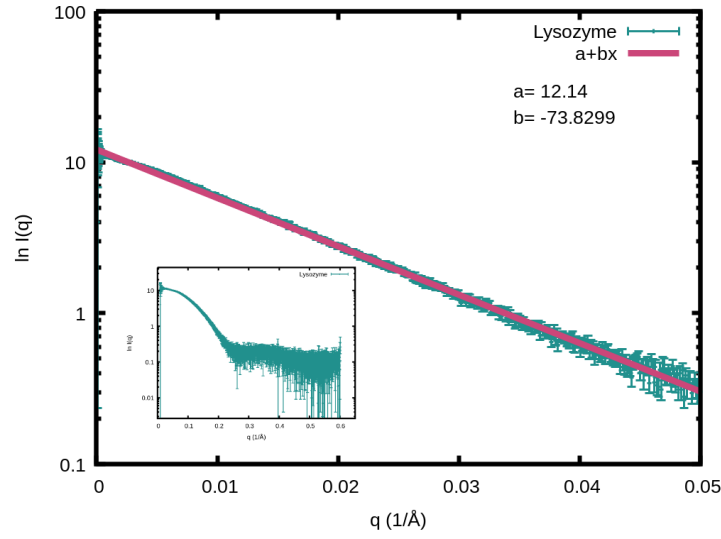


Figura 2.6: Gráfico de Guinier para a lisozima. Usado para o cálculo do raio de giro R_g da proteína e de $I(0)$ a partir da eq. 2.31. Fonte: gráfico plotado a partir de dados extraídos do BIOISIS 34.

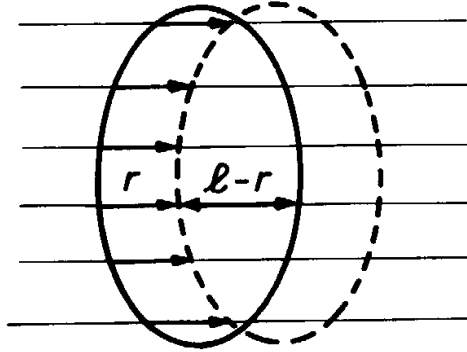


Figura 2.7: Representação de uma partícula e seu “fantasma”, formado pelo deslocamento. Fonte: Glatter e Kratky 18.

$$V = 4\pi \int_0^D r^2 dr \cdot \gamma_0(r). \quad (2.32)$$

A intensidade em $q = 0$ dada pela equação 2.23 dividida pela invariante de Porod da equação 2.26 leva à uma relação direta entre o volume excluído e a invariante de Porod. Essa relação permite que o volume não possua unidades destoantes dos resultados experimentais.

$$V = 2\pi^2 \frac{I(0)}{Q}, \quad (2.33)$$

sendo que $I(0)$ deve ser extrapolado usando a aproximação de Guinier, discutida anteriormente.

A análise da região de grandes q , ou seja, com $q \rightarrow \infty$ é válida devido à sua dependência com a estrutura mais próxima da superfície da partícula e não deve ser influenciada por suas propriedades gerais.

A relação entre q^{-4} e a intensidade, dada em 2.34 foi obtida por Debye 31 e Porod 32 independentemente. Esta relação é bem representada no gráfico de Porod, mostrado na figura 2.8 dado por uma curva de $q^4 I(q) \times q$ do qual é possível obter informações de volume excluído V e deste com a superfície total da partícula S .

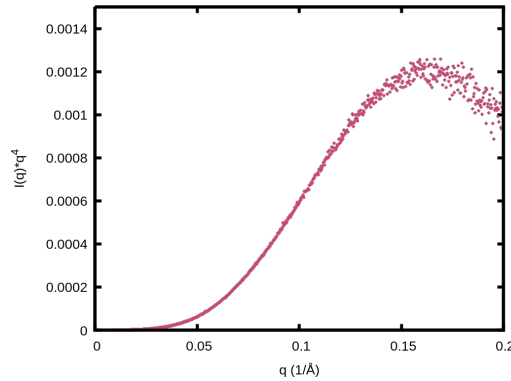


Figura 2.8: Gráfico de Porod para a lisozima. Usado para o cálculo do volume excluído da proteína e da superfície total a partir das relações 2.34 e 2.35. Fonte: gráfico plotado a partir de dados extraídos do BIOISIS 34

$$I_1(q) \rightarrow (\Delta\rho)^2 \frac{2\pi}{q^4} \cdot S, \quad (2.34)$$

Considerando que as medidas experimentais exigem valores absolutos de intensidade, o uso da "invariante" se faz necessária de forma que relação entre S e V pode ser calculada por 2.35

$$\frac{S}{V} = \frac{\pi}{Q} \lim_{q \rightarrow \infty} I(q)q^4. \quad (2.35)$$

Uma outra análise que pode ser feita é o chamado gráfico de Kratky, sendo importante para a análise de estados conformacionais da molécula. Ele é dado por um gráfico de $q^2 I(q) \times q$ e utilizado para a avaliação da flexibilidade de macromoléculas e do estado de enovelamento das proteínas. A figura 2.9 ilustra as diferentes formas que o gráfico pode assumir dependendo das condições de enovelamento da proteína.

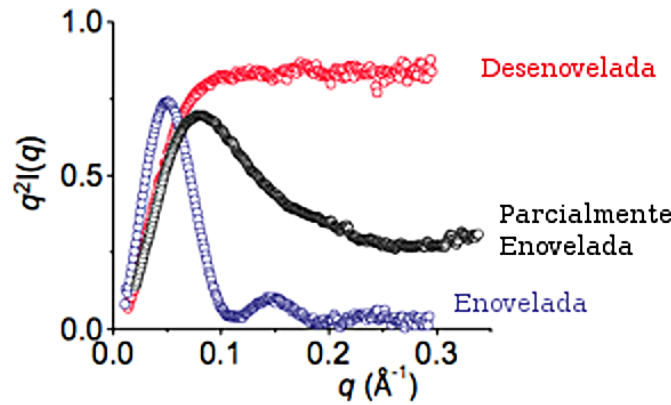


Figura 2.9: Diferentes curvas de espalhamento analisadas pelo gráfico de Kratky com diferentes estados de enovelamento da proteína.
 Fonte: adaptada do site BIOISIS[34].

2.9 Análise computacional dos dados de SAXS.

O espalhamento de raios-X a baixo ângulo permite a caracterização estrutural de proteínas e a avaliação de mudanças conformacionais de proteínas em solução. A técnica possibilita a construção de um modelo tridimensional por meio da curva de espalhamento. Porém, esta construção é dificultada pelo problema de fase discutido na seção 2.4 e seguintes.

O problema da fase provocou o meio científico ao desenvolvimento de modelos teóricos, obtidos à partir de formas geométricas simples, para o

cálculo do envelope. Posteriormente, desenvolveram-se métodos para calcular a intensidade destes modelos e comparar com resultados experimentais.

Em 1970, Stuhrmann^[21] usou esféricos harmônicos e polinômios de Laguerre para descrever matematicamente o envelope angular formado por uma proteína, a partir da curva de espalhamento. O software Crysol utiliza esta abordagem para fazer o processo inverso, ou seja, calcular uma curva de espalhamento teórica a partir do envelope. O sistema está suficientemente diluído para que seja considerada apenas uma partícula espalhadora. O conjunto está esquematizado na figura 2.10 e consiste em uma partícula com densidade de espalhamento $\rho_a(r)$ envolvida por uma camada de hidratação de espessura Δ e densidade ρ_b em um solvente de densidade ρ_0 .

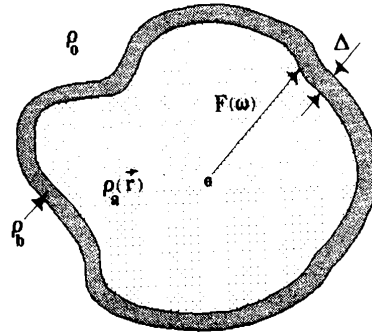


Figura 2.10: Macromolécula envolta por uma camada de hidratação de espessura Δ .

Fonte: Svergun, Barberato e Koch^[35].

Com esta conformação a intensidade de SAXS pode ser calculada pela equação 2.36, em que $\delta\rho = \rho_b - \rho_0$ e $A_a(\vec{q})$, $A_c(\vec{q})$ e $A_b(\vec{q})$ são a amplitude de espalhamento da partícula no vácuo, do volume excluído e dos átomos de borda, respectivamente.

$$I(q) = \langle |A_a(q) - \rho_0 A_c(q) + \delta\rho(q)|^2 \rangle_{\Omega} \quad (2.36)$$

Ao ser fornecido um perfil de espalhamento como arquivo de entrada calcula-se um valor de discrepância (χ^2) pela equação 2.37

$$\chi^2(r_0, \delta\rho) = \frac{1}{N_p} \sum_{i=1}^{N_p} \left[\frac{I_{exp}(q_i) - cI(q_i, r_0, \delta\rho)}{\sigma(q_i)} \right]^2, \quad (2.37)$$

onde N_p e $\sigma(q_i)$ são a quantidade de pontos coletados e o erro da intensidade experimental $I_{exp}(q_i)$ de cada ponto, respectivamente, e c é um fator de escala entre os dados de alta resolução e os dados experimentais.

Posteriormente, DAMMIN[22] e DAMMIF[36] e GASBOR[24] foram desenvolvidos para modelar os envelopes e analisar cavidades da moléculas.

Estes programas utilizam pequenas esferas chamadas dummy gerando modelagens DAM - do inglês dummy atoms model. Estas esferas são utilizadas para preencher uma esfera de volume maior e podem ou não ser diferentes entre si, dependendo do sistema estudado. DAMMIN e DAMMIF usam simulated annealing para deformar a "esfera maior" e minimizar a função χ^2 na equação 2.38 para a análise da superfície da molécula. O programa GASBOR gera uma cadeia "proteica" formada por átomos dummy, que passa pelo processo de simulated annealing M vezes para minimizar χ^2 , possibilitando estudos sobre a camada de hidratação e cavidades da macromolécula.

$$\chi^2 = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{N(i)} \left(\frac{I_{exp}^{(i)}(q_j) - I^{(i)}(q_j)}{\sigma(q_j)} \right)^2 \quad (2.38)$$

Na mesma época, Chacón et al.[37, 38] desenvolveram um software combinando algoritmos genéticos e simulações de Monte Carlo, aplicado a um modelo de átomos dummy para comparar as curvas geradas por estes sistemas com as curvas experimentais.

Mais recentemente, Schneidman-Duhovny, Hammel e Sali[23] utilizaram uma forma mais direta para o cálculo da intensidade baseado na aplicação da fórmula de Debye[39] para a intensidade de espalhamento apresentada na equação 2.39.

$$I(q) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N f_i(q) f_j(q) \frac{\sin(qd_{ij})}{qd_{ij}}, \quad (2.39)$$

onde d_{ij} é a distância entre os átomos i e j e o fator de forma, ou fator de espalhamento atômico, f_i já considera a camada de hidratação e o solvente deslocado para o cálculo.

$$f_i(q) = f_v(q) - c_1 f_s(q) + c_2 s_i f_w(q), \quad (2.40)$$

onde $f_v(q)$ e $f_s(q)$ são o fator de espalhamento do átomo no vácuo e do átomo dummy que representa o solvente deslocado, respectivamente, s_i é a fração de superfície acessível ao solvente do átomo i , f_w é o fator de forma da água, c_1 é usado para ajustes no volume excluído total e c_2 é usado para ajustes na densidade de espalhamento da camada de hidratação, geralmente usa-se $c_1 = 1$ e $c_2 = 0$ como valores padrão. Quando um perfil de SAXS é fornecido ao software o cálculo de χ^2 é feito usando a equação [2.37](#).

O cálculo de um envelope diretamente da curva de espalhamento é um problema mal-posto que não possui uma solução única [\[26\]](#), entretanto esta abordagem permite o uso de vínculos impostos pela estrutura da molécula, proporcionando, especialmente pela geometria da ligações de carbonos e a formação de estruturas secundárias, uma redução do problema.

3. SAXS-Factor

3.1 Introdução ao SAXS-factor

Espalhamento de raios-X de baixo ângulo é uma técnica bem estabelecida na comunidade acadêmica. Isso propiciou o desenvolvimento de ferramentas para serem usadas em conjunto com o perfil de espalhamento, a fim de aumentar a resolução da técnica e/ou auxiliar na resolução do problema mal posto, conforme explicado no Capítulo 2.

Por décadas, as ferramentas computacionais se concentraram em duas vertentes: o cálculo de um envelope a partir do perfil de espalhamento experimentalmente obtido [37, 38, 36] e o cálculo de um perfil de espalhamento teórico a partir das coordenadas espaciais obtidas por outras técnicas experimentais [35]. programa, SAXS-factor, foi desenvolvido durante este trabalho, em FORTRAN 90, com o objetivo de ser uma ferramenta simples e eficiente, com algoritmo claro e apresentação didática, e se enquadra na última categoria.

O cálculo do perfil de espalhamento teórico é obtido por meio da Equação 2.39. Cada ferramenta tem uma maneira própria de aplicar essa equação, dependendo do modelo do sistema proteína + camada de hidratação. Portanto, o SAXS-factor propõe uma abordagem rápida e simples para alcançar esse objetivo, usando a proteína e o solvente modelados em CA e os fatores de forma calculados para os aminoácidos [40, 41]. Cada uma dessas escolhas será descrita e desenvolvida detalhadamente neste capítulo.

SAXS-factor utiliza dois arquivos de entrada: um arquivo PDB [11] e um perfil de intensidade experimental. Ele realiza a modelagem atomística em CA para a macromolécula em estudo e camada de hidratação explícita,

que será abordada na seção 3.2. O programa produz como resultado a curva de espalhamento teórica para a molécula informada, o fator de discrepância χ^2 entre a curva calculada e o dado experimental, e o raio de giro calculado a partir da relação 2.28.

3.2 Camada de hidratação

A partir do arquivo PDB, é possível obter as posições atômicas da proteína e calcular o tamanho que a molécula ocupa no espaço. Para isso, é calculada uma caixa que sobreponha as coordenadas espaciais da molécula e uma caixa de água predefinida. Essa caixa é calculada utilizando a equação 3.1, na qual x^i representa uma das três coordenadas cartesianas e $d(x^i)$ é a maior distância interna da molécula na coordenada x^i . A caixa de água utilizada no cálculo tem seu tamanho inicial por $Size_{wb}$, mas a nova caixa terá o tamanho reduzida para uma fração, de modo a garantir que o tempo computacional seja utilizado apenas para as dimensões da molécula em estudo. Esse processo torna-se mais eficiente e preciso, pois concentra-se especificamente na molécula em questão.

A equação 3.1 é utilizada para calcular o tamanho da caixa que será utilizada para o processo. Para isso, é feita a divisão da maior distância interna da molécula em relação à coordenada x^i pelo tamanho inicial da caixa de água $Size_{wb}$. O resultado dessa divisão é somado a 1, gerando assim o tamanho final da caixa $Size_{box}(x^i)$.

$$Size_{box}(x^i) = \left(\frac{d(x^i)}{Size_{wb}} \right) + 1, \quad (3.1)$$

O arquivo de coordenadas para a caixa de água foi obtido por meio de uma simulação de dinâmica molecular de 1 nanossegundo com modelo

SPC/E[42] sob constante NPT, que representa o número de partículas, pressão e temperatura do sistema (100 kPa e 300K, respectivamente). Para modelar a proteína em solução aquosa, as coordenadas atômicas da proteína e das moléculas de água são sobrepostas e as distâncias internas de todo o sistema são calculadas para determinar a camada de hidratação, a qual influencia o perfil de espalhamento no espalhamento de raios-X. A camada de hidratação tem cerca de 3,5Å de espessura, correspondendo a aproximadamente 1,5 partículas de água, sendo consideradas apenas as partículas dentro do intervalo de 3-6,5Å de distância de qualquer átomo da proteína durante o cálculo de intensidade. Essa restrição ajuda a economizar poder computacional. Após a modelagem da proteína e da camada de hidratação, gerando um novo arquivo PDB com as coordenadas resultantes, é possível dar início ao cálculo da intensidade de espalhamento do sistema.

3.3 Cálculo do fator de espalhamento.

Após modelar a proteína e sua camada de hidratação, gera-se um novo arquivo PDB que contém as coordenadas atômicas de todas as partículas representativas do sistema. Nesse arquivo, as partículas são classificadas em 21 tipos, sendo 20 aminoácidos regulares e o solvente. Essa classificação é usada para calcular o fator de espalhamento específico para cada tipo de partícula, conforme a equação 3.2. É importante mencionar que as posições atômicas obtidas do arquivo PDB correspondem aos átomos de carbono alfa de cada aminoácido que forma a macromolécula, ou seja, é feita uma modelagem coarse-grained.

Os fatores de espalhamento (F^{CG}) são calculados somando-se os fatores de forma de todos os N átomos presentes no resíduo. O cálculo é realizado por meio da equação 3.2, como já mencionado anteriormente. É importante ressaltar que tanto os resíduos quanto as moléculas de água se-

guem esse procedimento [40].

A equação 3.3 é usada para calcular f_i^{excl} , o qual é obtido subtraindo o volume excluído do átomo do seu fator de espalhamento no vácuo (f_i). Nessa equação, ν_i representa o raio de van der Waals do átomo i , enquanto $\rho_0 = 334e\text{\AA}^{-3}$ é a densidade do solvente. A equação para o cálculo de $f_i(q)$ pode ser encontrada no apêndice A.

$$f^{CG}(q) = \left\langle \left[\sum_{i,j}^N f_i^{excl}(q) f_j^{excl}(q) \frac{\sin(qr)}{qr} \right]^{1/2} \right\rangle_{PDB}, \quad (3.2)$$

$$f_i^{excl}(q) = f_i(q) - \nu_i \rho_0 \exp\left(-\pi \nu_i^{2/3} q^2\right), \quad (3.3)$$

3.4 Cálculos Possíveis

Após o cálculo dos fatores de espalhamento para todas as partículas do sistema, a intensidade do sistema é obtida através da equação (3.4), utilizando também as posições das partículas. Em seguida, o perfil de espalhamento teórico é sobreposto ao dado experimental, com foco na região de $q < q_b = 0,03$, sendo possível alterar esse valor para $q_b = \frac{1}{3}R_g$ caso o raio de giro seja fornecido pelo usuário.

$$I(\vec{q}) = \sum_{i,j}^N f_i^{CG} f_j^{CG} \left(\frac{\sin(\vec{q} \cdot \vec{r})}{\vec{q} \cdot \vec{r}} \right) \quad (3.4)$$

A comparação entre o perfil teórico e o dado experimental é reali-

zada para obter o valor do χ^2 pela equação (3.5) e determinar o raio de giro teórico a partir da equação (2.31). A constante de proporcionalidade c é utilizada para tornar os valores de intensidade comparáveis, permitindo que ambos os perfis sejam referentes a moléculas com mesma distância interna máxima. No entanto, no software, a constante c já está inclusa nas intensidades calculadas e, portanto, é considerada como igual a um no cálculo do χ^2 e o erro experimental *sigma* é considerado como 10% da intensidade experimental em casos que este dado não é fornecido.

$$\chi^2 = \sum_{i_q=1}^{N_q} \left(\frac{I_{exp}(\vec{q}) - cI_{teo}(\vec{q})}{\sigma^2} \right) \quad (3.5)$$

A partir da equação (2.31) é possível obter o valor do raio de giro teórico através da comparação com uma equação de reta $y = a + bx$. Para isso, são utilizados os valores de $I(q)$ para q menores que o limite escolhido (q_b), que pode ser definido pelo usuário ou ser o padrão igual a 0,03. Então, os valores a e b se relacionam com o perfil de espalhamento e nos fornecem os valores para $I(0)$ e R_g como apresentados na equação (3.6).

$$\ln I(q) = \ln I(0) - \frac{R_g^2}{3} q^2 \quad (3.6)$$

$$a = I(0) \quad b = -3R_g$$

3.5 Resultados

A construção do algoritmo se baseou em métodos matemáticos semelhantes aos utilizados por Ravikumar, Huang e Yang [43]. Para validar o algoritmo, foram escolhidos dois programas amplamente utilizados na comu-

nidade, o FoXS[23] e o Crysol[35], que também utilizam diferentes modelagens matemáticas. A partir de buscas em bancos de dados de SAXS, como o BIOISIS[34] e o SASBDB[44], foi possível encontrar dados experimentais com modelos atômicos correspondentes. Em seguida, o conjunto de 42 proteínas foi submetido aos três programas e o valor de discrepância χ^2 calculado pelo SAXS-factor foi comparado com os obtidos pelo Crysol e pelo FoXS. Os resultados foram apresentados na tabela 3.1 e a figura 3.1 mostra a correlação do SAXS-factor com cada um dos programas utilizados.

Tabela 3.1: Os valores de χ^2 calculados pelos programas SAXS-factor, FoXS, Crysol e Fast-SAXS-pro para o conjunto de 35 proteínas de validação. O valor de discrepância χ^2 calculado pelo SAXS-factor foi comparado com os obtidos pelos outros para cada conjunto de dados. As proteínas marcadas com os símbolos † e ★ foram retiradas dos bancos de dados BIOISIS[34] e SASBDB[44], respectivamente.

Proteínas	SAXS-Factor	FoXS	Crysol	Fast-SAXS-pro
1HYPHP†	1,01	34,30	35,03	308,75
1RECBP†	126,35	137,52	113,62	1.543,32
1XYNTP†	1,76	4,30	0,95	1,74
2HYPHP†	0,49	9,96	5,48	12,32
APSODP†	489,09	96,76	3,23	799,19
AT5GHP†	8,89	15,56	4,65	19,97
C3bEfP†	47,40	32,25	5,70	57,01
LAR12P†	11,26	14,83	2,23	13,68
MnmG2X†	2.039,01	544,61	285,68	2.667,71
MRERAP†	4.283,58	1.612,00	1.396,97	1.569,81
SASDA32★	17,93	43,00	9,92	45,83
SASDA62★	694,42	157,97	134,52	1.165,61
SASDA78★	105,68	66,31	38,40	436,92
SASDAA2★	48,49	10,62	4,51	136,50

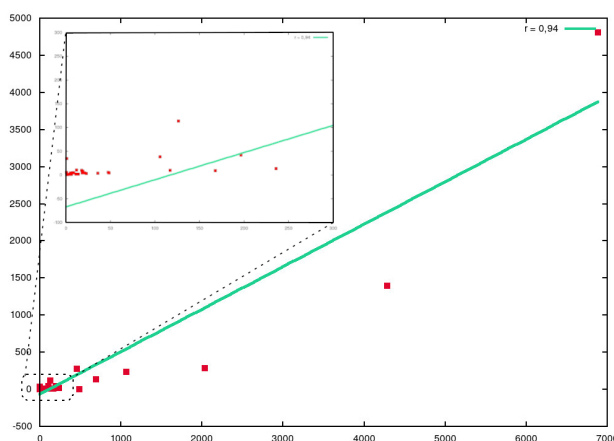
Continuação da tabela 3.1 da página anterior

Proteínas	SAXS-Factor	FoXS	Crysol	Fast-SAXS-pro
SASDAB2*	6,10	4,12	1,23	0,00
SASDAC2*	4,08	2,10	1,92	14,74
SASDAH2*	7,65	11,17	5,01	34,49
SASDAJ5*	19,00	31,86	8,12	67,76
SASDAK2*	4,26	6,79	1,36	14,88
SASDAK6*	18,47	25,70	4,14	37,51
SASDAL2*	117,17	125,98	9,76	219,99
SASDAN2*	21,09	47,97	4,25	113,43
SASDAQ2*	12,10	12,69	10,27	45,73
SASDAX6*	6,15	4,88	1,27	15,19
SASDB52*	13,76	7,77	2,25	0,00
SASDB76*	23,09	17,39	3,44	47,69
SASDBT4*	6.887,82	5.212,39	4.803,92	26.931,58
SASDCD6*	196,61	69,79	41,95	436,16
SASDCJ6*	167,70	125,53	9,42	355,64
SASDDH9*	1.068,35	518,37	235,21	1.406,38
SASDDL3*	0,87	1,17	0,81	0,00
SASDDL6*	35,95	25,12	3,78	49,41
SASDEL6*	235,83	396,31	13,41	356,15
SASDEV5*	457,10	456,51	278,13	171,69
SASDEY3*	5,25	4,69	4,18	9,28

Fonte: Autoria própria.

Ao comparar os gráficos de correlação das figuras 3.1a, 3.1b e 3.1c, é possível notar que mesmo com diferentes modelagens e abordagens matemáticas, as correlações obtidas com os softwares Crysol e FoXS foram bastante

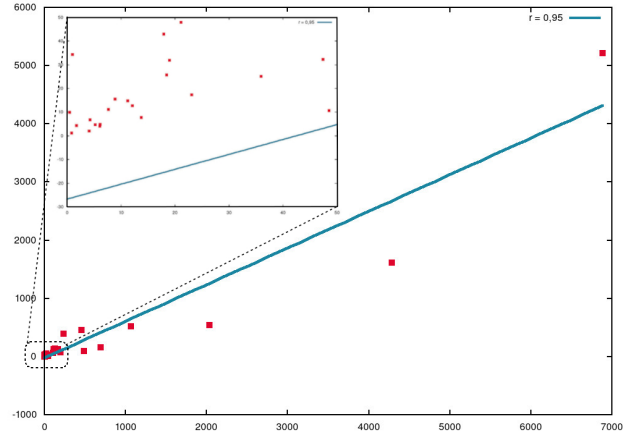
altas, com valores de $r_{Crysol} = 0,94$ e $r_{FoXS} = 0,95$, respectivamente. Porém, a correlação com o software Fast-SAXS-pro, que compartilha a modelagem com o SAXS-factor, foi um pouco mais baixa, com valor de $r_{FSp} = 0,86$. Essa diferença de correlação pode ser explicada pelas diferenças durante a sobreposição das curvas na região de guinier. Enquanto o software Pivot-SAXS utiliza valores da intensidade multiplicados pela constante de proporcionalidade c , o Fast-SAXS-pro faz o overlap e o cálculo de χ^2 considerando o logaritmo da intensidade. Portanto, essas diferenças na abordagem matemática podem ter impactado na correlação obtida com o Fast-SAXS-pro em comparação com Crysol e FoXS.



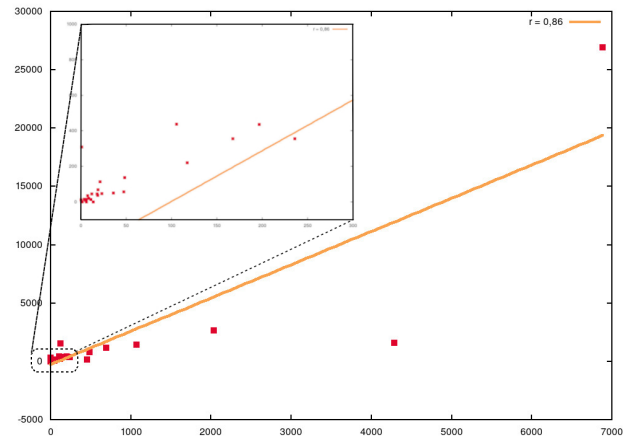
(a) Crysol x Pivot-SAXS

Figura 3.1: Gráficos de correlação entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS.

Ao comparar as curvas obtidas pelo SAXS-factor diretamente com os dados experimentais, como mostrado na figura 3.2 e no apêndice C, é possível notar que as curvas apresentam desvios, especialmente na região de alto ângulo. Essa região é responsável pelos detalhes estruturais da camada mais externa da molécula e pela interação com o solvente, sendo também a região com maior erro experimental associado. No entanto, é importante destacar que o SAXS-factor foi desenvolvido como uma ferramenta para ser incorporada em um software maior, o Pivot-SAXS, cujo objetivo principal é



(b) FoXS x Pivot-SAXS



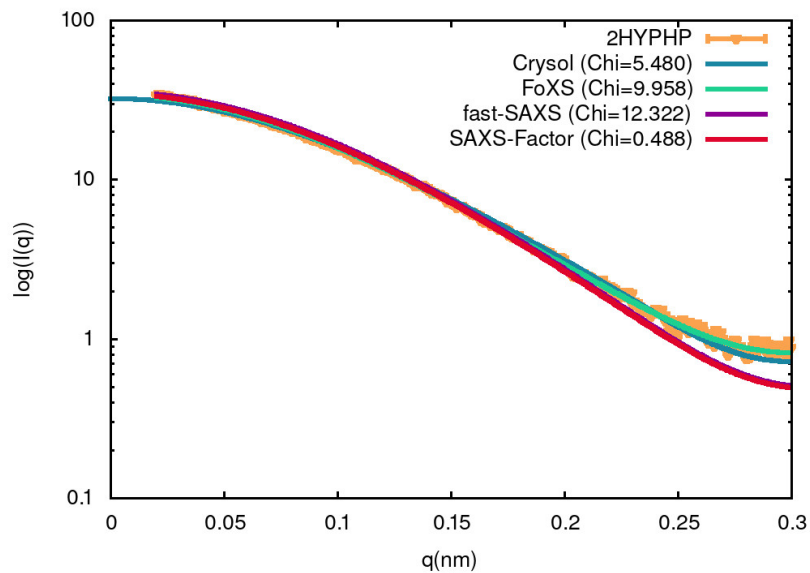
(c) Fast-SAXS-pro x Pivot-SAXS

Figura 3.1: Gráficos de correlação entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS. A figura apresenta os gráficos de correlação entre os softwares SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS. O gráfico (a) apresenta a correlação entre os dados obtidos pelo SAXS-factor e o Crysol, resultando em um coeficiente $r = 0,94$. No gráfico (b), tem-se a correlação $r = 0,95$ entre o SAXS-factor e o FoXS. Já no gráfico (c), correlaciona-se o SAXS-factor e o Fast-SAXS-pro, obtendo um coeficiente de correlação de $r = 0,86$. Todos os gráficos possuem um zoom na região de baixos valores para χ , o que possibilita uma melhor visualização da correlação entre os programas.

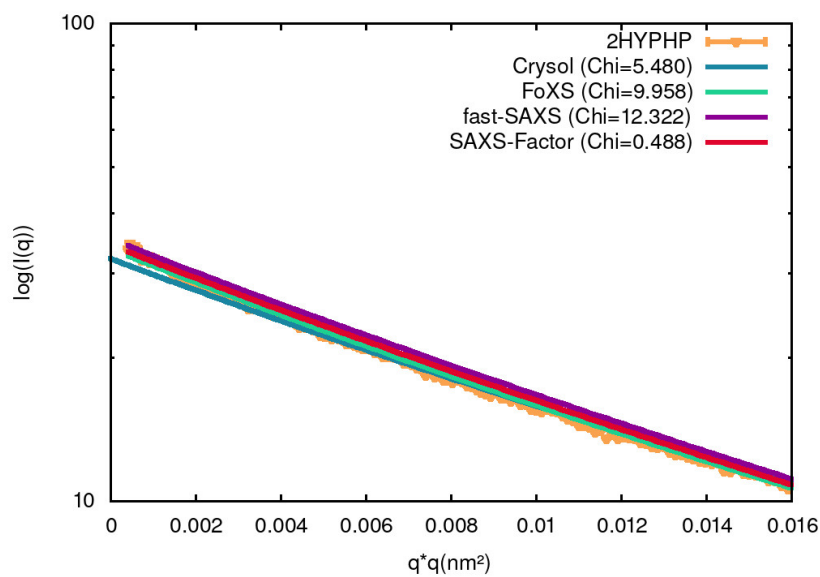
Fonte: Autoria própria.

a determinação de estruturas internas. Dessa forma, apesar das limitações na região de alto ângulo, isso não impede que o SAXS-factor cumpra seu papel no contexto geral do trabalho, que será discutido em maior profundidade no

próximo capítulo.

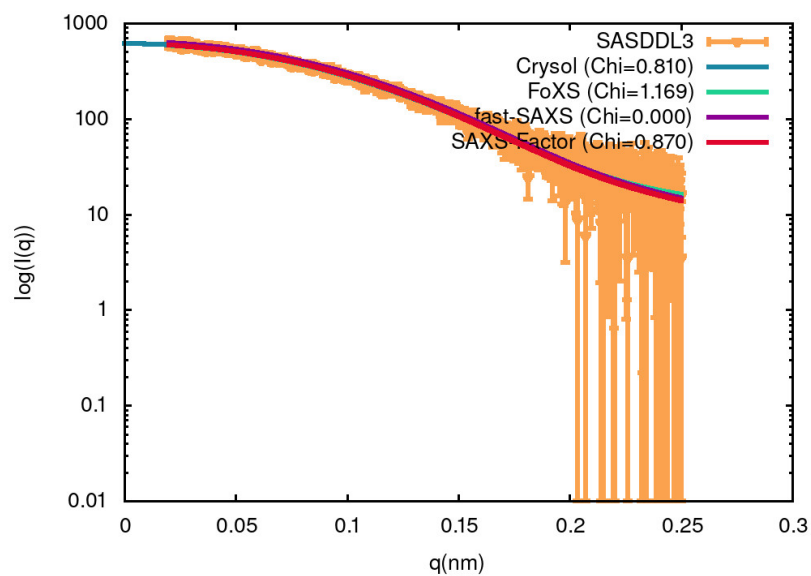


(a) 2HYPHP

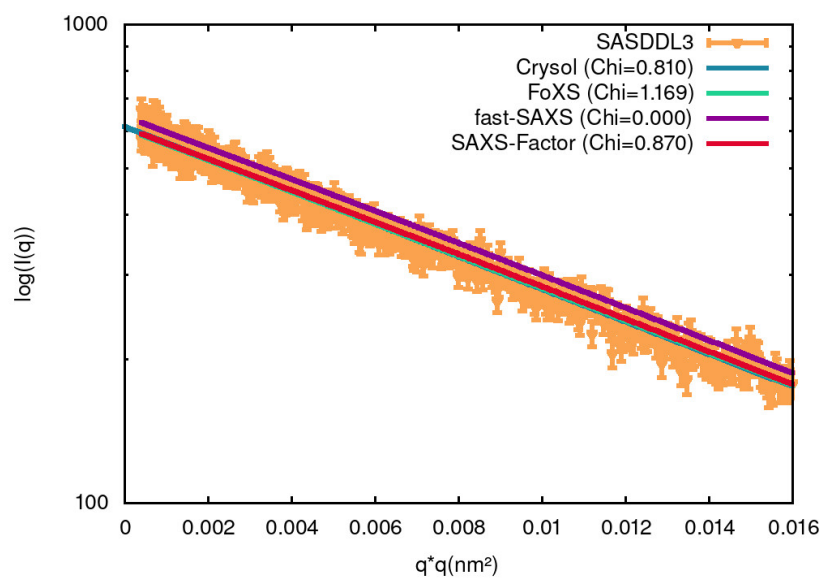


(b) 2HYPHP Guinier

Figura 3.2: Comparativo entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS.

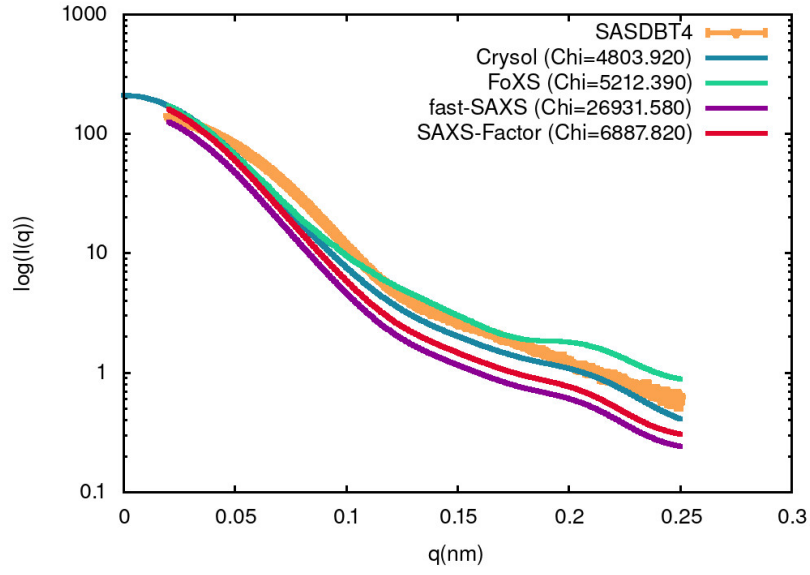


(c) SASDDL3

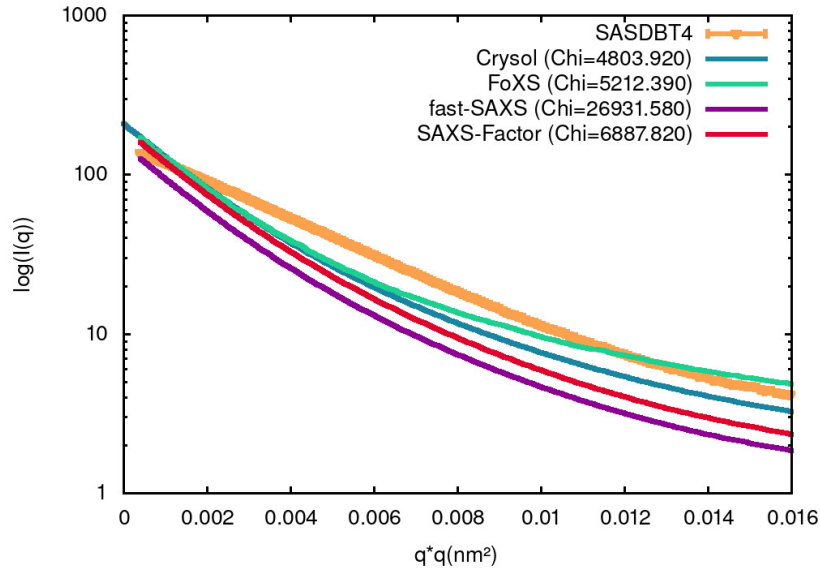


(d) SASDDL3 Guinier

Figura 3.2: Comparativo entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS.(cont.)



(e) SASDBT4



(f) SASDBT4 Guinier

Figura 3.2: Comparativo entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS.(cont.)A figura exibe informações experimentais e teóricas comparativas para 3 das 35 proteínas testadas por 4 diferentes softwares. As figuras (a), (c) e (e), mostram um comparativo para as proteínas explicitadas no título, sendo a representação em amarelo indica o perfil experimental, enquanto que as curvas teóricas dos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor são representadas em azul, verde, roxo e rosa, respectivamente. Nas figuras (b), (d) e (e), os gráficos de Guinier correspondentes a cada uma das proteínas são apresentados.

Fonte: Autoria própria.

4. Pivot-SAXS

4.1 Introdução ao Pivot-SAXS

As técnicas espectroscópicas atuais, incluindo SAXS, permitem o estudo da superfície das moléculas. No entanto, ainda há desafios em relação ao conhecimento da organização das estruturas secundárias no interior da molécula quando colocadas em solução. A compreensão da estrutura interna permite estudos mais detalhados, como a análise eletrostática dos resíduos em locais específicos de interesse. Essa foi a motivação para o presente trabalho, que utilizou informações sobre estruturas secundárias e o perfil de espalhamento da molécula para alcançar uma conformação semelhante à estrutura em solução representada pelo perfil de espalhamento.

Este capítulo aborda não apenas o desenvolvimento do software, mas também algumas das diversas possibilidades de utilização do Pivot-SAXS em conjunto com técnicas experimentais. Será analisado o desempenho da utilização do software em três casos diferentes: na predição estrutural, na detecção de mudanças conformacionais causadas por alterações físico-químicas no ambiente e na readequação de domínios de uma quimera.

O software é programado em FORTRAN 90 e contém duas partes principais: um gerador de novas estruturas e o SAXS-factor. A o algoritmo analisa cada nova conformação gerada com relação à realidade física da estrutura e usa o SAXS-factor para comparar com o perfil experimental. O código completo está disponível no [Github](#) e especificidades dos arquivos de entrada e do desenvolvimento do código estão nas seções [4.2](#), [4.3](#) e [4.4](#).

4.2 Dados de entrada

O programa Pivot-SAXS tem como objetivo principal a obtenção de uma estrutura molecular mais precisa e próxima da estrutura real, utilizando como base um perfil de espalhamento experimental, uma estrutura inicial e uma lista com informações de estrutura secundária da molécula. O programa utiliza esses dados para gerar uma nova estrutura molecular que seja fisicamente possível e mais próxima da estrutura representada pelo perfil de espalhamento experimental.

Para alcançar o objetivo de obter uma nova estrutura molecular que se aproxime mais do perfil de espalhamento experimental, é necessário fornecer ao programa Pivot-SAXS alguns elementos essenciais. O primeiro desses elementos é um arquivo de coordenadas no formato PDB, contendo a sequência numérica dos resíduos a partir de um. Com este arquivo, o programa pode utilizar a estrutura inicial para calcular a posição atômica das novas estruturas.

O usuário precisa fornecer um perfil de espalhamento de SAXS com colunas para vetor de espalhamento em $\text{\AA}^{-1}$, intensidade de espalhamento e erro experimental (se não fornecido, será calculado um valor para 10% da intensidade). Os valores do vetor de espalhamento são usados para calcular o perfil teórico pelo SAXS-factor e as intensidades são usadas para calcular χ^2 pelas equações [3.4](#) e [3.5](#), respectivamente.

Por fim, o usuário também precisa fornecer um arquivo com as informações estruturais da molécula. Tal lista é montada baseada nos conhecimentos do usuário sobre quais resíduos não estão estruturados em hélices- α ou folhas- β , mas essa informação também pode ser obtida a partir de preditores de estrutura secundária como PSIPRED[\[45\]](#). A eficiência destes preditores aumenta proporcionalmente ao tamanho do banco de dados de proteínas, e tem uma taxa de acerto acima de 85% [\[16\]](#). Chamados de pivotáveis, esses

resíduos flexíveis são essenciais para permitir que o programa Pivot-SAXS calcule as novas estruturas durante a simulação, mantendo estruturada as regiões mais rígidas da estrutura, as hélices e folhas- β .

4.3 Matrizes de rotação

Para garantir a fidelidade das restrições estéricas durante a geração de novas conformações, é possível utilizar o gráfico de Ramachandran[46]. Isso ajuda a avaliar o tamanho dos átomos para a modelagem e a amplitude máxima de rotação. Os aminoácidos têm uma estrutura básica chamada backbone, que consiste em um carbono-alfa (C_α) ligado a um radical amina e um radical carboxila, conforme ilustrado na Figura 4.1. Embora os 20 aminoácidos sejam bastante diferentes entre si, todos possuem essa mesma estrutura básica e se diferenciam por suas cadeias laterais (R), como mostrado na Figura 4.2.

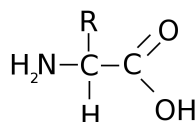


Figura 4.1: Representação da estrutura geral de um aminoácido.
Fonte: Autoria própria.

O backbone dos aminoácidos apresenta diferentes ângulos, como os de ligação e os diedrais. Enquanto os ângulos de ligação permanecem constantes, os ângulos diedrais podem variar e afetar a conformação molecular, como demonstrado na figura 4.3. O ângulo ω refere-se à rotação em torno da ligação C_i-N_{i+1} e possui apenas os valores cis e trans. Já os ângulos φ e ψ são importantes para mudanças conformacionais que afetam a cadeia lateral e a estrutura de proteínas. O ângulo φ refere-se à ligação $N-C_\alpha$ e tem valor de 0° quando C_i e C_{i+1} estão na posição trans. O ângulo ψ refere-se à ligação $C_\alpha-C$ e tem valor de 0 quando N_i e N_{i+1} estão na posição trans em relação

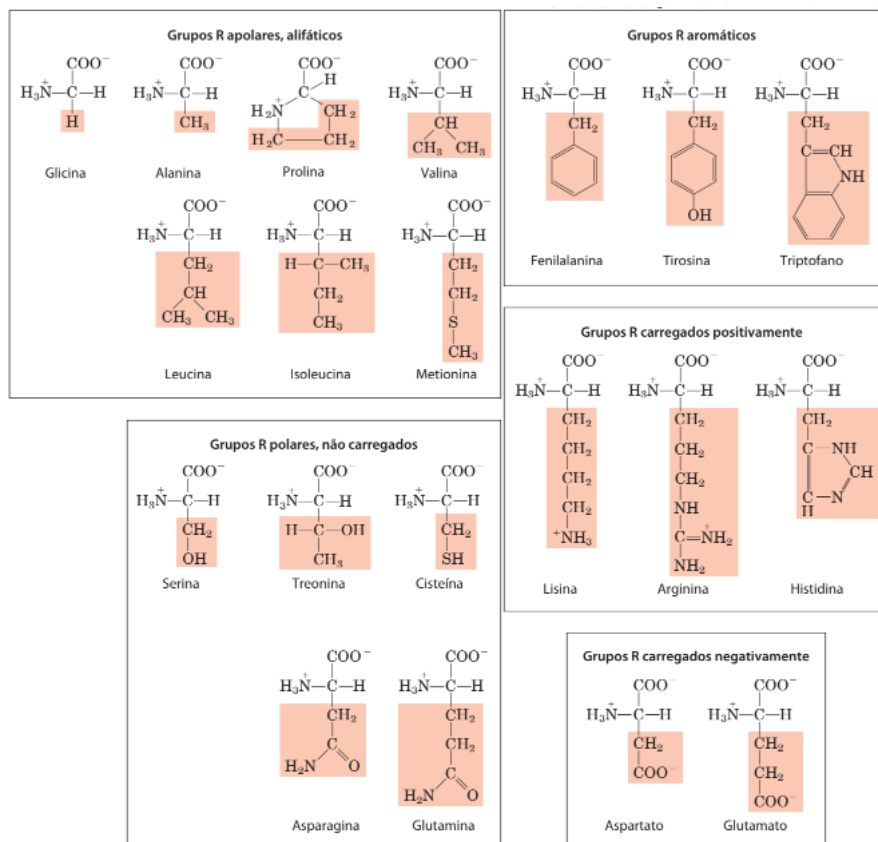


Figura 4.2: Representação das cadeias laterais de todos os aminoácidos essenciais.

Fonte: Nelson e Cox [1].

à ligação $C_\alpha-C$ [46]. Ambos aumentam no sentido horário. A Figura 4.4 ilustra dois aminoácidos ligados e totalmente estendidos com ângulos φ e ψ em posição de 180 [47].

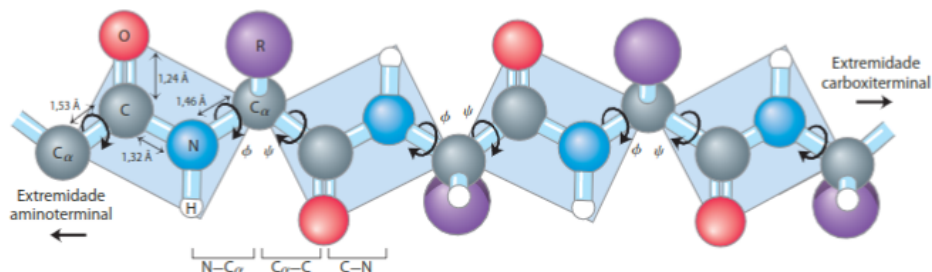


Figura 4.3: Representação dos ângulos em um aminoácido.

Fonte: Nelson e Cox [1].

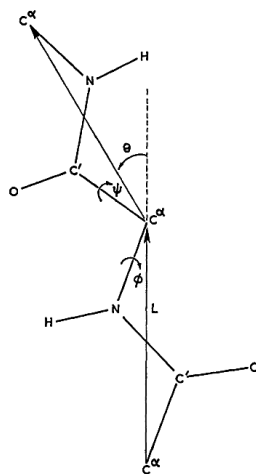
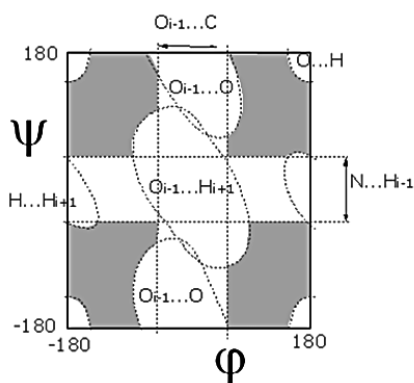


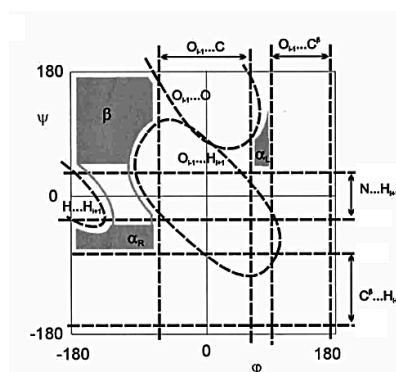
Figura 4.4: Conformação totalmente planar de uma ligação peptídica. Os ângulos φ e ψ estão em posição de 180° .

Fonte: Autoria própria.

Peptídeos podem ser descritos por meio das variáveis φ e ψ , mas nem todas as combinações dessas variáveis são possíveis ou prováveis de ocorrer na prática, devido a impedimentos estéricos. O gráfico que representa a distribuição de φ e ψ é chamado de Ramachandran plot, cujo exemplo é apresentado na figura 4.5.



(a) Glicina.



(b) Alanina.

Figura 4.5: Ramachandran plot para a Glicina e a Alanina.

Fonte: Ho, Thomas e Brasseur [48] e Ho e Brasseur [49].

O modelo atômico usado no Pivot-SAXS foi calibrado utilizando por base os dados experimentais obtidos por Batsanov [50] e o Ramachandran

plot[49, 48]. Os raios $r_C = 1,7\text{\AA}$, $r_N = 1,37$, $r_O = 1,16$ e $r_H = 1,0\text{\AA}$, para carbonos, nitrogênios, oxigênios e hidrogênios, respectivamente[51].

Ao calibrar o tamanho dos átomos, é possível realizar rotações dos ângulos pivotáveis com um modelo que leva em conta as cadeias laterais. Nessa etapa da simulação, todas as estruturas são modeladas com todos os átomos para garantir maior realismo.

Durante cada passo da simulação, um resíduo pivotável e um ângulo (φ ou ψ) são selecionados aleatoriamente para sofrer uma rotação de -30° a 30° . Esta imposição reduz a quantidade de aminoácidos com ângulos que podem ser rotacionados e número de configurações possíveis de serem acessadas pelo sistema, diminuindo, assim, o espaço conformacional a ser varrido e evitando parcialmente os tempos astronômicos previstos pelo paradoxo de Levinthal[52] para o enovelamento de uma proteína sem restrições. Esse intervalo de valores foi escolhido para equilibrar o tempo necessário para alcançar conformações distintas e a minimização de choques estéricos. Por vezes, os resíduos escolhidos ficam no meio da estrutura, isso significa que mesmo rotações de baixa amplitude podem movimentar grande pedaços da proteína e fazê-la dobrar-se sobre si mesma.

Os ângulos de Euler são definidos como o resultado da rotação em torno de um eixo específico[53], e, aqui, estão sendo utilizadas para mudar o sistema de coordenadas sem alterar a ortonormalidade do sistema cartesiano, ou seja, alterando apenas as coordenadas, mantendo o tamanho e as distâncias das partículas representadas. Para garantir que a ligação que será rotacionada esteja alinhada com o eixo cartesiano x , a proteína é transladada e rotacionada utilizando um vetor com o mesmo módulo, direção e sentido da ligação relativa à rotação. Esse vetor é movido para o ponto $(0, 0, 0)$ e, em seguida, ocorrem duas rotações em torno dos eixos y e z para zerar as coordenadas z e y , respectivamente. Depois, do ajuste, o sistema é rotacionado em torno do eixo x no valor sorteado.

Ao realizar uma rotação em torno de um eixo, é gerado um novo sistema de eixos cartesianos, e, conseqüentemente, um novo conjunto de coordenadas para cada átomo da proteína a partir do resíduo rotacionado. Para obter essas novas coordenadas, é utilizada a equação 4.1, na qual x, y e z representam as coordenadas originais, e x', y' e z' representam as novas posições. Na figura 4.6 é apresentada uma rotação em torno do eixo z por um ângulo ω .

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \\ z' \end{pmatrix} = \lambda \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \quad (4.1)$$

Matematicamente, todas as rotações são em torno de eixos, ou seja, a matriz λ utilizada será λ_x, λ_y ou λ_z , para as rotações em torno dos eixos x, y e z , respectivamente, cada uma delas está apresentada na equação 4.2.

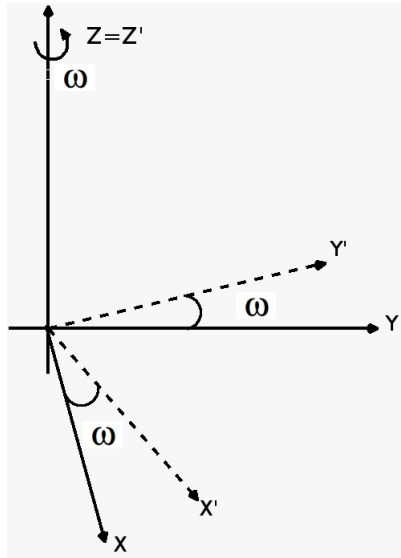


Figura 4.6: Representação do sistema de coordenadas 'linha' formado a partir da rotação de ω em torno de Z .

Fonte: Autoria própria.

$$\begin{aligned}
 \lambda_x &= \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \psi & \sin \psi \\ 0 & -\sin \psi & \cos \psi \end{pmatrix} \\
 \lambda_y &= \begin{pmatrix} \cos \varphi & \sin \varphi & 0 \\ -\sin \varphi & \cos \varphi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \\
 \lambda_z &= \begin{pmatrix} \cos \omega & 0 & \sin \omega \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \omega & 1 & \cos \omega \end{pmatrix}
 \end{aligned} \tag{4.2}$$

4.4 Potencial do Pivot-SAXS

Pivotando os ângulos φ e ψ de aminoácidos não estruturados, é possível gerar novas conformações que podem ser comparadas com a estrutura em solução usando o χ^2 , calculado pelo SAXS-factor. Para guiar a estrutura inicial até o perfil alvo, é possível definir um potencial energético (E) composto pelo χ^2 e um potencial de esfera rígida(E_{HS}). Esse potencial evita a sobreposição de átomos, estabelecendo que $E_{HS} = 0$ quando a distância entre os átomos é maior que a soma dos raios de Van de Waals dos átomos envolvidos, e igual a um quando a distância é menor. Essa energia é minimizada pelo método de Monte Carlo com o critério de Metropolis, descrito no apêndice [B](#). As configurações aceitas têm um perfil de espalhamento cada vez mais próximo do comparativo, tornando-as fisicamente plausíveis. O potencial é descrito pela equação [4.3](#) e considera os raios de van de Waals, explicados na seção [4.3](#).

$$E = \eta_{HS}E_{HS} + \eta_{\chi}\chi^2, \quad (4.3)$$

onde η_{HS} e η_{χ} são parâmetros de ajuste da energia de esfera rígida E_{HS} e de χ^2 , respectivamente.

Para melhor direcionar a simulação e reduzir o espaço conformacional, é importante impor restrições aos tipos de resíduos que podem ser pivotáveis e ao intervalo de rotação máxima. No entanto, também é necessário permitir que a molécula escape de possíveis armadilhas do potencial. Para isso, o sistema é submetido a ciclos alternados de simulated annealing dentro de um intervalo determinado pelo usuário. Isso significa que o sistema é lentamente resfriado e aquecido durante a simulação. Devido ao fator de Boltzmann [54], essa mudança de temperatura permite que o sistema escape de armadilhas estéricas e obtenha diversas conformações possíveis para o mesmo perfil de espalhamento.

O número total de passos (N_{passos}) da simulação depende do número de temperaturas acessadas (N_{temp}), da quantidade de passos em cada temperatura (bin), da quantidade desses ciclos de aquecimento e resfriamento (N_{ciclos}) e do número de resíduos pivotáveis no sistema (N_{pivot}), de modo que a probabilidade de escolha de cada um desses resíduos seja a mesma. O usuário deve fornecer essas informações durante a submissão.

$$N_{passos} = (2N_{ciclos} + 1)N_{pivot}N_{temp}bin \quad (4.4)$$

A simulação inicia na temperatura mais alta, para que o sistema assuma conformações mais abertas e flexíveis, ou seja, é feita uma minimização do sistema para que não se inicie com estruturas sobrepostas. A simulação

segue resfriando à cada (*bin*) passos, ao chegar na temperatura mínima o sistema inicia um reaquecimento, e segue até completar a quantidade ($2N_{ciclos}$) fornecida pelo usuário.

4.5 Resultados

Para que ficasse validada a eficácia do potencial da equação 4.3, foram feitas simulações com a proteína engrailed homeodomain de *Drosophila melanogaster* [55] (PDB: 1ENH) utilizando $\eta_{chi} = 0$, $\eta_{chi} = 1$ e $\eta_{chi} = 2$ na equação 4.3. Esta proteína foi escolhida por ser pequena e de fácil manipulação pelo programa, o que torna a visualização das diferentes conformações mais fácil. Foram feitas simulações curtas, com minimização de 500 passos e 4000 passos no total divididos em um ciclo de annealing no intervalo de 373K à 273K e, em todos os casos, $\eta_{HS} = 1$. A conformação inicial foi gerada a partir da estrutura primária e da predição de estrutura secundária pelo PSIPRED [56]. Inicialmente, a sequência de resíduos foi montada em sua forma aberta e, em seguida, os resíduos que estavam em regiões de hélice ou beta foram ajustados em relação aos ângulos phi e psi para se adequarem às respectivas estruturas.

A figura 4.7 ilustra as três situações e suas respectivas retas representativas. A curva rosa corresponde à situação em que $\eta_{chi} = 0$, enquanto as curvas azul e verde correspondem a $\eta_{chi} = 1$ e $\eta_{chi} = 2$, respectivamente.

Ao comparar as inclinações das retas obtidas a partir dos ajustes lineares de cada conjunto de dados, é possível analisar a velocidade com que o valor de χ é minimizado em cada versão do potencial. Isso permite identificar qual contribuição é responsável por levar a molécula para sua estrutura mais próxima daquela representada pelos dados experimentais de entrada. As inclinações das retas, representadas por $a_1 = -2,17$, $a_2 = 2,71$ e $a_3 = -7,25$ para valores de χ igual a zero, um e dois, respectivamente,

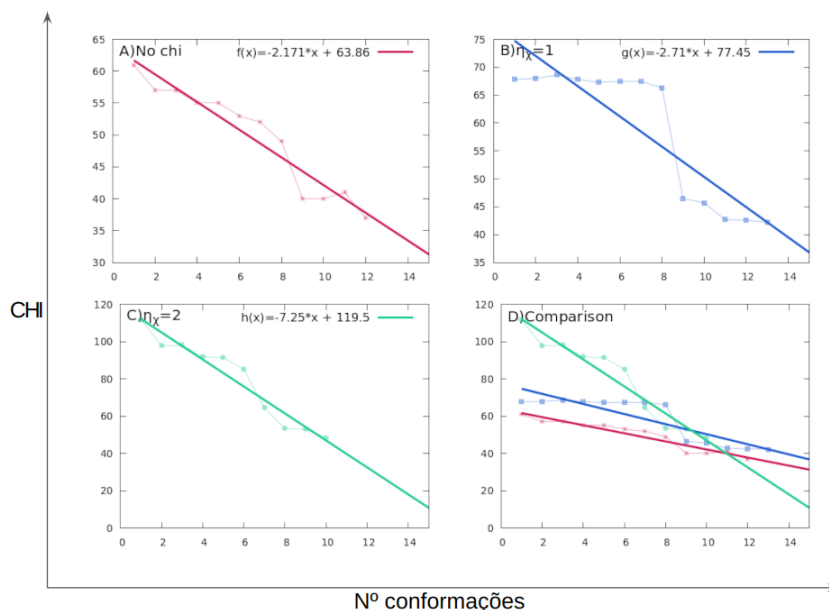


Figura 4.7: As curvas apresentam os valores de chi entre as conformações aceitas para cada uma das três situações consideradas. A curva em rosa representa a situação em que $\eta_{chi} = 0$, enquanto as curvas em azul e verde correspondem a $\eta_{chi} = 1$ e $\eta_{chi} = 2$, respectivamente. Na figura D, é possível comparar as três situações e suas respectivas retas representativas.

Fonte: Autoria própria

indicam que quanto maior a contribuição de χ para o potencial, mais rápida é a minimização do valor de χ , o que está de acordo com as expectativas.

Para testar a capacidade preditiva do potencial Pivot-SAXS em relação à estrutura de proteínas, foram selecionadas três proteínas pequenas que podem ser completamente estendidas. No entanto, não há dados de SAXS disponíveis para essas proteínas na literatura. Portanto, dados teóricos gerados pelo software Crysol a partir de estruturas cristalográficas foram utilizados como dados-alvo para os testes iniciais do Pivot-SAXS. Para modelar a estrutura inicial, foram utilizadas informações de sequência primária e de quais resíduos estavam em conformação de α -hélice ou em folhas- β , obtidas do PDB. Em seguida, as cadeias foram modeladas de acordo com o padrão do software Chimera para gerar a estrutura secundária inicial. As informações fornecidas foram utilizadas como entrada para o programa Pivot-SAXS, com

os seguintes parâmetros: $\eta_{chi} = 1, \eta_j = 0.2, T_{mx} = 373K$ e $T_{min} = 273K$, executando 1000 passos. Ao final do processo, foram geradas diversas conformações com valores de chi distintos. A realização desses testes iniciais permite avaliar a capacidade do potencial em prever corretamente a estrutura dessas proteínas, o que pode ser útil para estudos futuros.

Na figura 4.8, é possível observar as sobreposições de conformações de 3 proteínas modelo, representadas em rosa as com os menores valores de chi, em azul as iniciais e em amarelo as cristalográficas. Os valores de χ^2 e RMSD, tanto entre as estruturas iniciais e cristalográfica quanto entre as de menor chi e cristalográfica, podem ser encontrados na tabela 4.1.

Proteína	$\chi_{inicial}$	$RMSD_{inicial}$	χ_{final}	$RMSD_{final}$
1NIZ	2,80	11,43	0,003	10,51
1VII	10,8	14,57	0,72	11,57
1YPA	8,99	38,71	243,92	15,71

Tabela 4.1: Valores de χ^2 e RMSD entre a conformação com menor χ^2 e a estrutura cristalográfica.

Durante a simulação, as regiões estruturadas são consideradas rígidas, resultando em uma conformação final que pode não ter as mesmas torções em suas fitas β e hélices α como a estrutura-alvo. Se o usuário tiver uma estrutura terciária inicial, a simulação começará em alta temperatura, permitindo a aceitação de estruturas mais abertas. À medida que o sistema esfria, estruturas mais prováveis com base em dados experimentais serão aceitas e as torções das estruturas secundárias permanecerão as mesmas da estrutura original. Note que para a 1YPA, o movimento de pivot desestruturou. Esse método pode ser usado para estudar o arranjo conformacional de subunidades de quimeras e polímeros.

O exemplo para rearranjo conformacional escolhido foi a quimera XylLich, composta por uma unidade de endo-xilanase (PDB: 1XXN) e outra de endo- β -1,3-1,4-glucanase (PDB: 3O5S), conectadas por quatro glicinas.

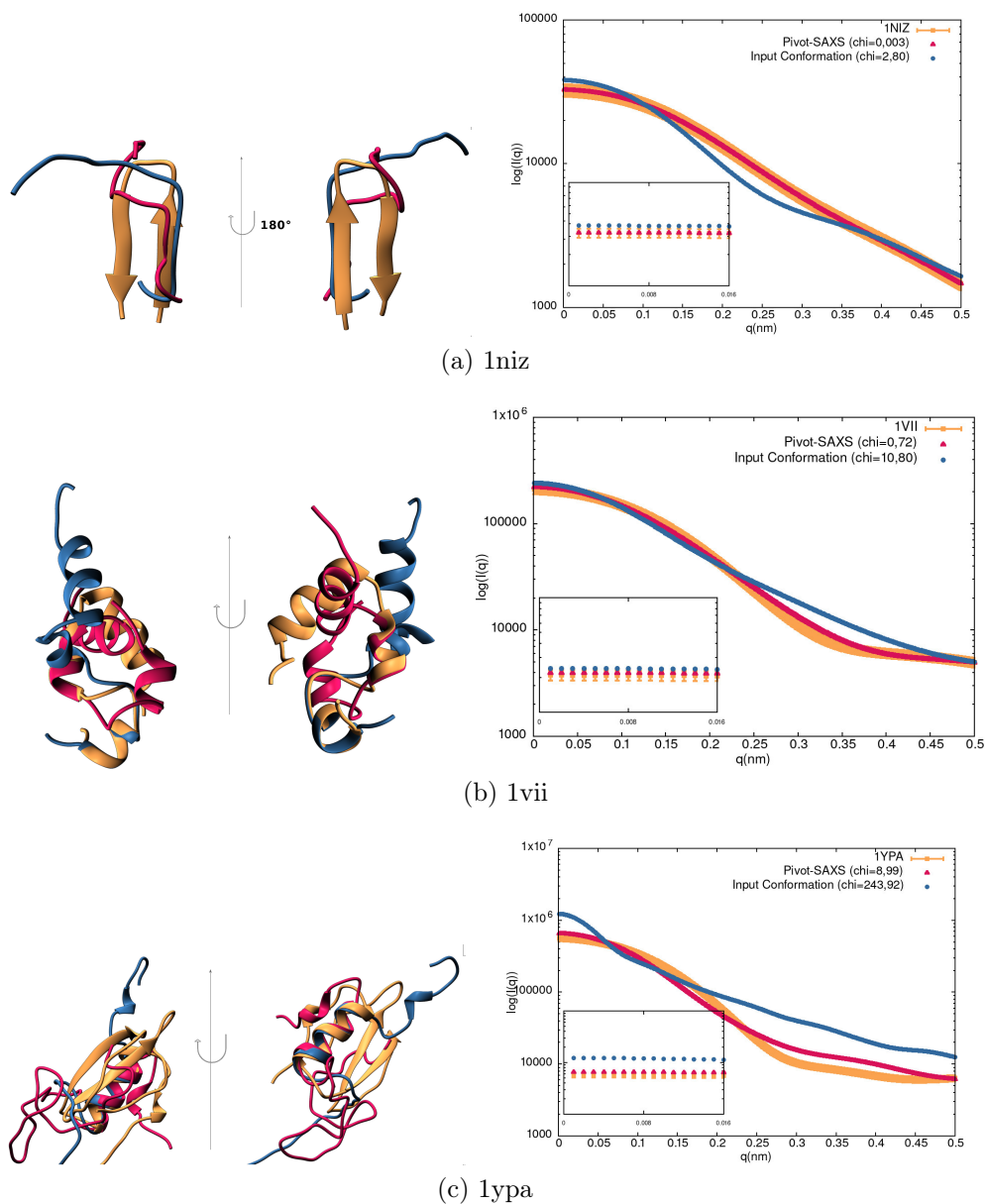


Figura 4.8: A figura mostra a sobreposição da conformação com o menor valor de chi gerada pelo programa Pivot-SAXS com a estrutura cristalográfica e a estrutura inicial das proteínas. As proteínas são representadas em amarelo na estrutura cristalográfica, enquanto as estruturas iniciais e com o menor valor de chi são representadas em azul e rosa, respectivamente.

Fonte: Autoria própria

A estrutura inicial utilizada é a estrutura representativa do ensemble final obtido nos estudos de [Cota et al. \[57\]](#), e o objetivo da simulação foi ajustar

o perfil de espalhamento experimental, tendo as glicinas como os únicos resíduos não restritos. A simulação começou com $\chi^2 = 60.3$, foi relaxada em 5000 passos e passou por cinco ciclos de annealing com um *bin* de 100. Vale lembrar que cada ciclo equivale uma nova simulação com estrutura inicial diferente, ampliando o espaço conformacional varrido.

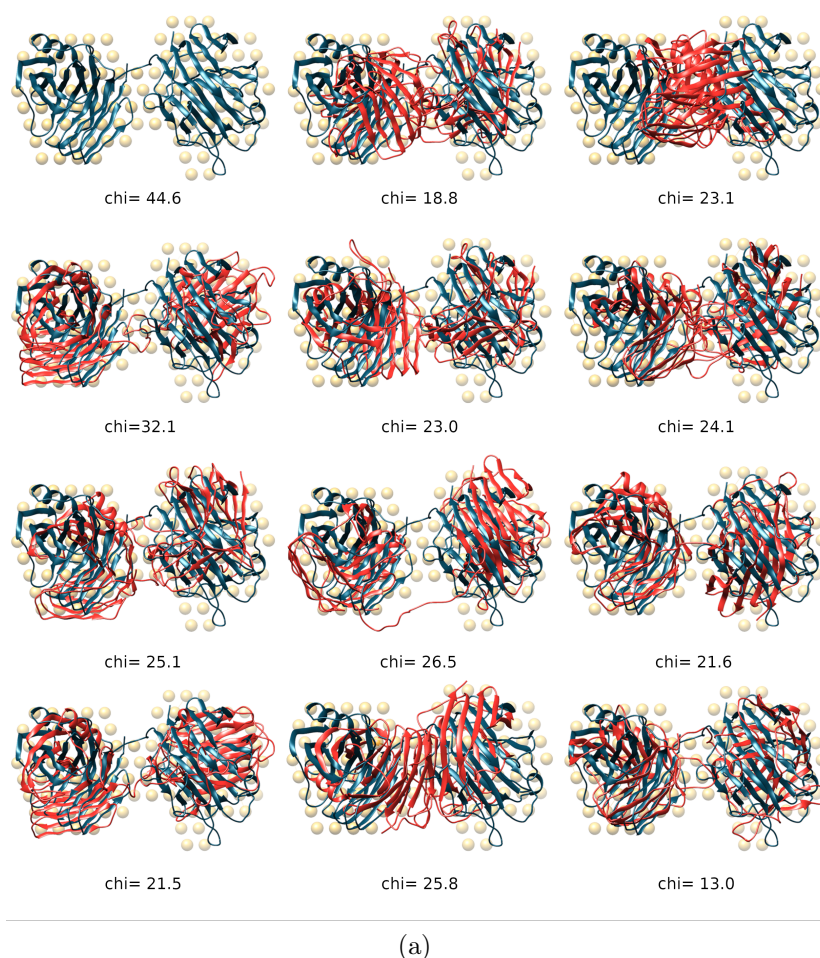


Figura 4.9: Demonstração das várias conformações com diferentes posições relativas entre os dois domínios, encontradas durante a simulação. O envelope calculado pelo DAMMIN[25] para perfil experimental está em amarelo claro ao fundo, a estrutura inicial está em azul e as várias estruturas do Pivot-SAXS estão em rosa, cada uma com o valor de Chi correspondente abaixo dela.

Fonte: Autoria própria

A figura 4.9 exibe várias estruturas obtidas em uma simulação com

chi menor que o inicial. Cada estrutura apresenta seu valor de chi abaixo, evidenciando que mesmo com um pequeno conjunto de resíduos pivotáveis, o espaço conformacional percorrido é vasto, com várias distâncias inter-domínios e rotações relativas. A estrutura alvo é representada pelo envelope calculado pelo programa DAMMIN[25] a partir dos dados experimentais (em azul). A estrutura inicial está em rosa, e outras estruturas obtidas pelo Pivot-SAXS durante o estudo também estão em rosa.

A figura 4.10 ilustra a conformação de menor chi em rosa, comparada à estrutura inicial em azul e ao perfil experimental em amarelo. Na figura a), ambas as estruturas atômicas são apresentadas, com um $RMSD = 7,6$ entre elas, enquanto a figura b) exibe os perfis de espalhamento das conformações inicial ($\chi = 11,56$) e final ($\chi = 60,25$).

A simulação foi extensa para permitir que o programa capturasse diversas possibilidades conformacionais. Apesar de ter encontrado várias estruturas fisicamente possíveis, a minimização de chi continuou até que a estrutura final ficasse próxima à estrutura inicial. Isso valida a eficiência da busca realizada pelo Pivot-SAXS, pois a estrutura inicial já era uma minimizada e com um bom fit, conforme demonstrado em Cota et al.[57]. É importante notar que o Pivot-SAXS é ainda mais eficiente em casos em que a estrutura inicial é muito diferente daquela representada pelos dados experimentais, já que faz uma busca mais ampla.

De acordo com estudos realizados por Oliveira et al.[58], a proteína GH5 endo-1,4-beta-D-mannanase (PDB: 3PZ9) pode apresentar diferentes conformações em função de mudanças no pH e temperatura. Mesmo com a estrutura cristalográfica já resolvida, é possível que o perfil de espalhamento observado seja diferente, sendo necessário o uso do SAXS-factor para estimar qual conjunto de condições produz um perfil mais próximo ou distante da estrutura cristalográfica. O estudo comparou os perfis experimentais da enzima GH5 com o perfil teórico calculado pelo SAXS-factor para a estrutura

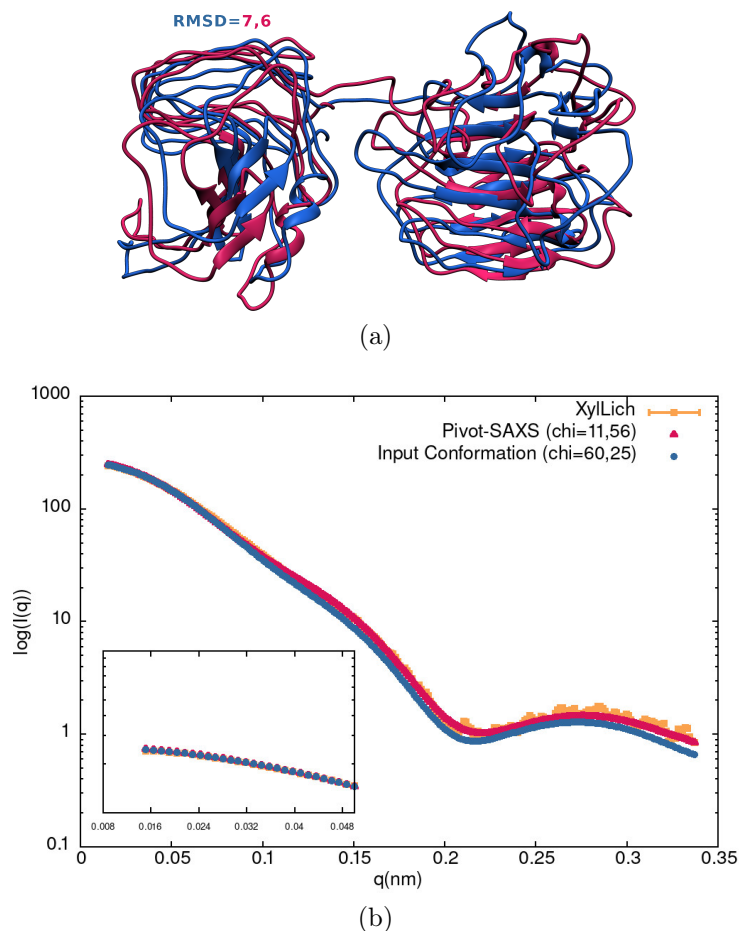


Figura 4.10: A figura apresenta a conformação de menor chi (representada em rosa) em comparação à estrutura inicial (em azul) e ao perfil experimental (em amarelo). Na figura *a*), é possível observar as duas estruturas atômicas com um $RMSD = 7,6$ entre elas. Já a figura *b*) exibe os perfis de espalhamento das conformações inicial ($\chi = 11,56$) e final ($\chi = 60,25$).

Fonte: Autoria própria

cristalográfica PDB: 3PZ9 em quatro condições diferentes de pH e temperatura. Na figura [4.11](#), as cores verde, amarelo, azul e vinho representam as condições de pH 4 e 293K, pH 6 e 293K, pH 6 e 338K, e pH 8 e 293K, respectivamente. Os valores de chi obtidos para cada uma das condições foram $\chi_a = 2,3$, $\chi_b = 3,7$, $\chi_c = 1,6$, $\chi_d = 2,4$.

Observou-se que a curva que apresentou a maior discrepância em relação à estrutura cristalográfica foi obtida na condição b). Por esse motivo,

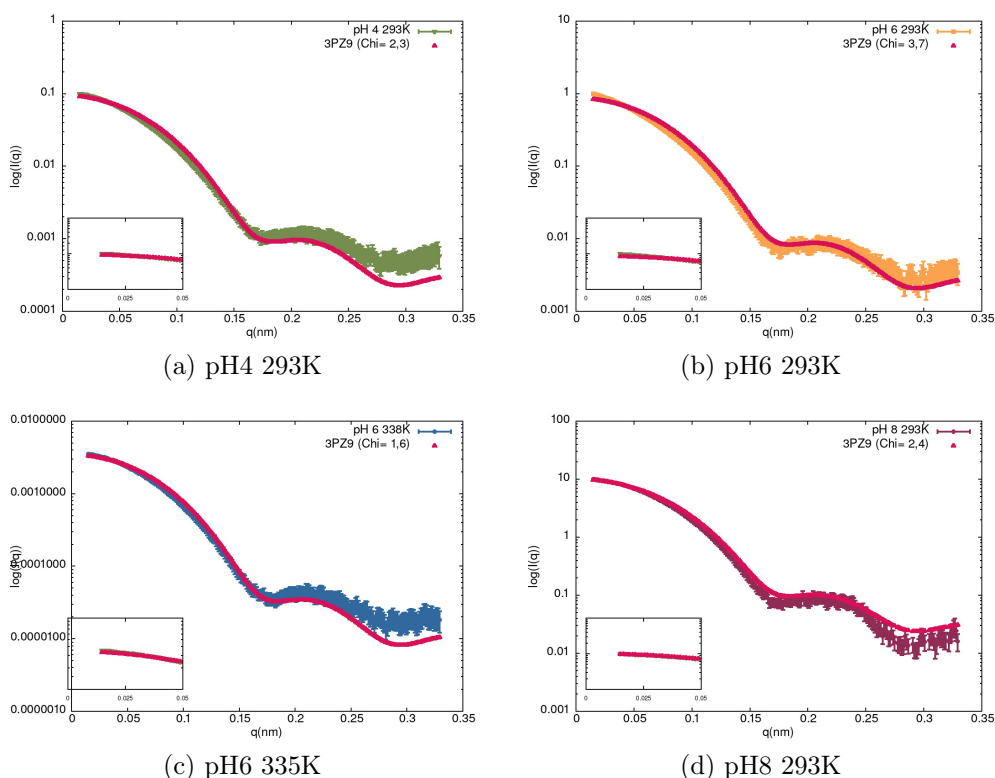


Figura 4.11: Comparação entre os perfis experimentais da GH5 e o perfil teórico calculado pelo SAXS-factor para a estrutura cristalográfica PDB: 3PZ9.. Em cada figura, é possível visualizar uma condição específica de pH e temperatura: pH 4 e 293K (representado pela cor verde), pH 6 e 293K (em amarelo), pH 6 e 338K (em azul) e pH 8 e 293K (em vinho). Além disso, cada imagem também exibe os valores de chi para a respectiva condição. Fonte: Autoria própria.

essa curva foi selecionada, neste trabalho, como alvo para as simulações, enquanto a estrutura cristalográfica foi utilizada como ponto de partida. Nesse contexto, é importante destacar o papel do raio de giro, já que a estrutura inicial apresenta um valor de 21,6, enquanto o valor calculado na condição c) é de 24,1, indicando um aumento no comprimento da estrutura. Em um estudo anterior, foram identificados quatro loops com maior probabilidade de movimento para promover esse alongamento, que estão ilustrados na figura [4.12](#). Para realizar as simulações, os resíduos dessas regiões foram utilizados como pivot em cinco simulações distintas: uma para cada loop e uma com

todos esses resíduos.

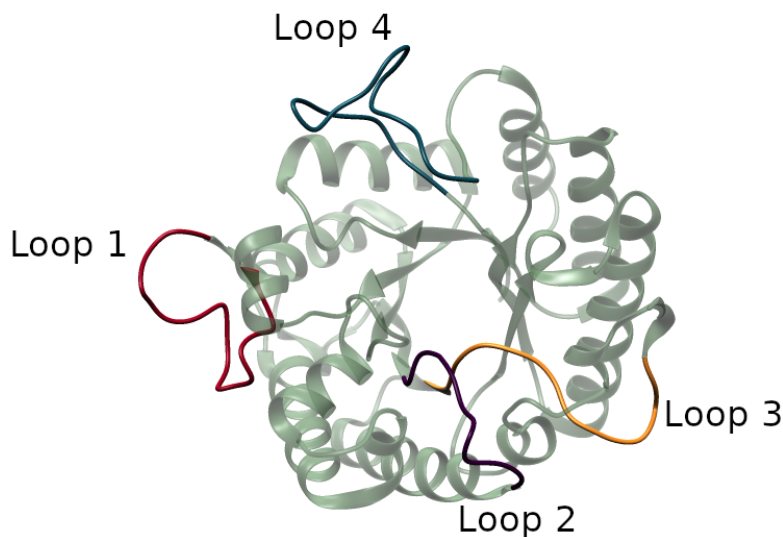
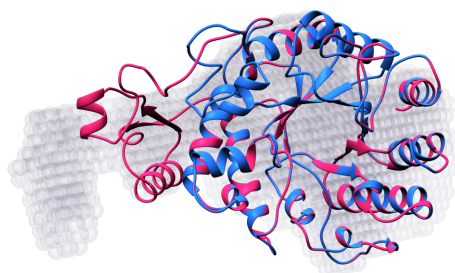


Figura 4.12: Representação das quatro regiões utilizadas como pivot nas simulações.

Fonte: Autoria própria.

Existem quatro loops, sendo que os loops um e quatro localizam-se nas extremidades C e N terminal, o que permite maior mobilidade. A figura [4.13](#) apresenta a comparação entre o envelope calculado por [58](#) em amarelo, a estrutura inicial em azul e a conformação com o menor chi em rosa, para o Loop 1, que obteve o menor valor de chi entre todas as simulações, com $\chi = 1,25$. É possível notar, também, que a estrutura encontrada é muito semelhante ao envelope calculado, concordando com os resultados obtidos por [Oliveira et al.](#)



(a)

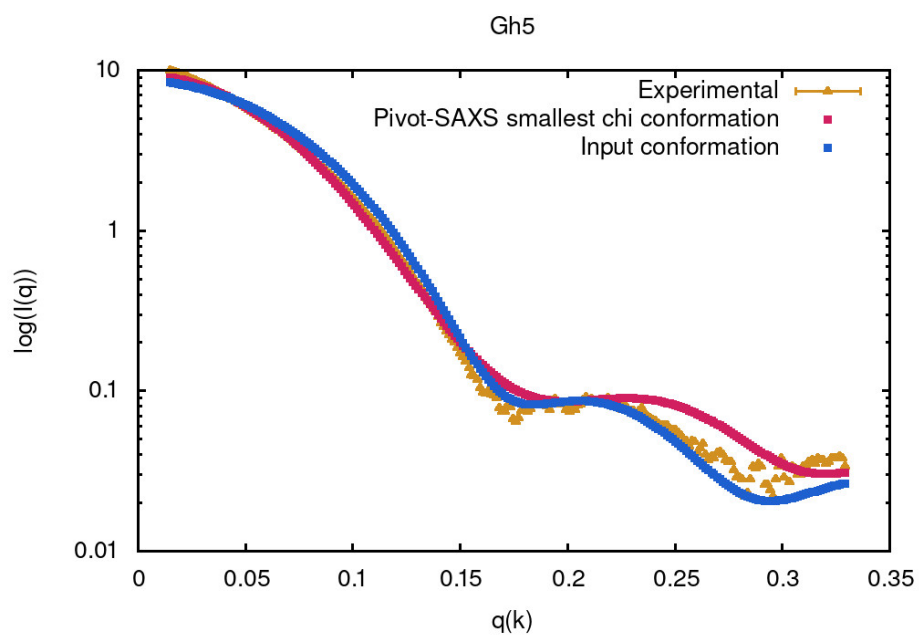


Figura 4.13: Comparação entre as conformações inicial (azul), final (rosa) e do envelope calculado da GH5, em amarelo.

Fonte: Autoria própria.

5. Conclusão.

O objetivo do trabalho consistiu em utilizar somente movimentos de pivot para transformar uma estrutura inicial em uma estrutura alvo representativa em solução. A fim de alcançar tal objetivo, utilizou-se um potencial que consistiu em um potencial de esfera rígida e o fator de discrepância entre as curvas de espalhamento experimentais e da conformação gerada pelo programa. Além da minimização do potencial, o programa teve que gerar uma nova conformação por meio da rotação de um dos ângulos diedrais, calcular a curva de espalhamento desta configuração e o χ . O programa SAXS-factor foi desenvolvido para essa finalidade e comparado com programas já utilizados pela comunidade científica, a fim de validar a sua eficiência.

No capítulo 3 pode-se notar a alta correlação entre o programa desenvolvido e outros amplamente utilizados pela comunidade científica. Por ter sido criado com o objetivo de integrar o Pivot-SAXS, a validação do SAXS-factor é importante para consolidar a originalidade e eficácia do Pivot-SAXS como um software capaz de avaliar estruturas de acordo com os dados experimentais de SAXS.

Para realizar os primeiros testes com Pivot-SAXS, foi necessário utilizar estruturas abertas geradas pelo software Chimera. Os resultados comparativos do capítulo 4, juntamente com os valores de RMSD da tabela 3.1, demonstram que o potencial formado pelas energias de esfera rígida e χ é altamente eficiente no tratamento de proteínas pequenas. A estruturação de folhas- β é mais complexa devido ao direcionamento necessário das cadeias laterais para formar interações de hidrogênio. Implementar um potencial que leve em consideração tais interações é bastante complicado, sendo necessário analisar se o ganho real de acurácia é maior do que o custo em tempo

computacional para obter tais resultados.

O software Pivot-SAXS é uma ferramenta versátil que se mostrou eficiente na caracterização de macromoléculas em solução, sendo capaz de prever a estrutura de proteínas e avaliar alterações conformacionais. A seção 4.5 apresenta uma análise que comprova a funcionalidade do Pivot-SAXS não apenas para quimeras, mas também para outras macromoléculas que possuem subunidades bem estruturadas.

O método Pivot-SAXS se mostrou capaz de detectar mudanças conformacionais em proteínas, utilizando apenas informações estruturais. Isso o torna útil em circunstâncias em que a resolução dos dados experimentais é baixa e não é possível obter uma estrutura final. Em tais casos, o Pivot-SAXS pode procurar a estrutura ótima e encontrar várias estruturas possíveis que minimizam o fator de discrepância. Ele é capaz de explorar o espaço conformacional e aceitar apenas estruturas fisicamente possíveis. Essas características tornam o Pivot-SAXS uma excelente opção para estudos que envolvem a caracterização de macromoléculas em solução.

Pode-se concluir que o movimento de pivot é eficiente para todos os objetivos propostos. Se mostrando versátil e adaptável à cada um dos problemas propostos.

Referências.

- 1 NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6 ed.. ed. Porto Alegre: Dykinson, 2014. 425 p. ISBN 9781429234146.
- 2 YANG, J. S. et al. All-Atom Ab Initio Folding of a Diverse Set of Proteins. *Structure*, v. 15, n. 1, p. 53–63, 1 2007. ISSN 09692126.
- 3 AHLSTROM, L. S. et al. Multiscale modeling of a conditionally disordered pH-sensing chaperone. *Journal of Molecular Biology*, Elsevier Ltd, v. 427, n. 8, p. 1670–1680, 2015. ISSN 10898638.
- 4 CONTESSOTO, V. d. G. et al. TKSA-MC: A web server for rational mutation through the optimization of protein charge interactions. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, v. 86, n. 11, p. 1184–1188, 11 2018. ISSN 08873585.
- 5 HARAN, G. How, when and why proteins collapse: The relation to folding. *Current Opinion in Structural Biology*, Elsevier Ltd, v. 22, n. 1, p. 14–20, 2012. ISSN 0959440X.
- 6 CONTESSOTO, V. d. G. et al. NTL9 folding at constant pH: The importance of electrostatic interaction and pH dependence. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 12, n. 7, p. 3270–3277, 2016. ISSN 15499626.
- 7 BERTOZO, L. d. C. et al. Oxidative Alteration of Trp-214 and Lys-199 in Human Serum Albumin Increases Binding Affinity with Phenylbutazone: A Combined Experimental and Computational Investigation. *Int. J. Mol. Sci., Int J Mol Sci*, v. 19, n. 10, 2018. ISSN 1422-0067.
- 8 DAMÁSIO, A. R. L. et al. Understanding the function of conserved variations in the catalytic loops of fungal glycoside hydrolase family 12. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 111, n. 8, p. 1494–1505, 2014. ISSN 10970290.
- 9 HAVRANEK, J. J.; DUARTE, C. M.; BAKER, D. A Simple Physical Model for the Prediction and Design of Protein–DNA Interactions. *Journal of Molecular Biology*, Academic Press, v. 344, n. 1, p. 59–70, 11 2004.
- 10 DIAS, R. V. R. et al. Csk α C Helix: A Computational Analysis of an Essential Region for Conformational Transitions. *The journal of physical*

chemistry. B, J Phys Chem B, v. 126, n. 50, p. 10587–10596, 12 2022. ISSN 1520-5207.

11 BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, v. 58, n. 6 I, p. 899–907, 2002. ISSN 09074449.

12 ANFINSEN, C. B. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. Science, v. 181, n. 4096, p. 223–230, 7 1973. ISSN 0036-8075.

13 ROHL, C. A. et al. Modeling structurally variable regions in homologous proteins with rosetta. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, John Wiley & Sons, Ltd, v. 55, n. 3, p. 656–677, 4 2004. ISSN 08873585.

14 ARAÚJO, A. F. Pereira de; ONUCHIC, J. N. A sequence-compatible amount of native burial information is sufficient for determining the structure of small globular proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 45, p. 19001–19004, 11 2009. ISSN 0027-8424.

15 HARDIN, C. et al. Associative memory Hamiltonians for structure prediction without homology: α/β proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, n. 4, p. 1679–1684, 2003. ISSN 00278424.

16 ROST, B. Review: Protein Secondary Structure Prediction Continues to Rise. Journal of Structural Biology, Academic Press Inc., v. 134, n. 2-3, p. 204–218, 5 2001. ISSN 10478477.

17 LNLS. Historia de Pionerismo. Disponível em: <https://lnls.cnpem.br/sobre/historia/>.

18 GLATTER, O.; KRATKY, O. Small Angle X-ray Scattering. 1ª edição. ed. New York, New York: Academic Press, 1982. 515 p. ISSN 1521-4044. ISBN 0-12-286280-5.

19 FEIGN, L. A.; SVERGUN, D. I. Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering. 1ª edição. ed. New York: Plenum Press, 1987. v. 40. 352 p. ISSN 03237648. ISBN 0-306-42629-3.

20 CHEN, P.-c.; HENNIG, J. The role of small-angle scattering in structure-based screening applications. Biophysical Reviews, Biophysical Reviews, v. 10, n. 5, p. 1295–1310, 10 2018. ISSN 1867-2450.

21 STUHRMANN, H. B. Interpretation of small-angle scattering functions of dilute solutions and gases. A representation of the structures related to a one-particle scattering function. Acta Crystallographica Section A:

Foundations of Crystallography, International Union of Crystallography, v. 26, n. 3, p. 297–306, 5 1970. ISSN 0567-7394.

22 SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. Biophysical Journal, v. 76, n. 6, p. 2879–2886, 1999. ISSN 0006-3495.

23 SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; HAMMEL, M.; SALI, A. FoXS: a web server for rapid computation and fitting of SAXS profiles. Nucleic Acids Research, v. 38, n. Web Server, p. W540–W544, 7 2010. ISSN 0305-1048.

24 SVERGUN, D. I.; PETOUKHOV, M. V.; KOCH, M. H. J. Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering. Biophysical Journal, Elsevier, v. 80, n. 6, p. 2946–2953, 6 2001. ISSN 00063495.

25 SVERGUN, D. I.; KOCH, M. H. J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. Reports on Progress in Physics, v. 66, n. 10, p. 1735–1782, 2003. ISSN 0034-4885.

26 VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. Journal of Applied Crystallography, v. 36, n. 3, p. 860–864, 6 2003. ISSN 0021-8898.

27 DONIACH, S. Changes in Biomolecular Conformation Seen by Small Angle X-ray Scattering. Chemical Reviews, American Chemical Society, v. 101, n. 6, p. 1763–1778, 6 2001. ISSN 0009-2665.

28 JAMROS, M. A. et al. Proteins at work: A combined small angle x-ray scattering and theoretical determination of the multiple structures involved on the protein kinase functional landscape. Journal of Biological Chemistry, v. 285, n. 46, p. 36121–36128, 2010. ISSN 00219258.

29 PUTNAM, D. K.; LOWE, E. W.; MEILER, J. Reconstruction of Saxes Profiles From Protein Structures. Computational and Structural Biotechnology Journal, v. 8, n. 11, p. e201308006, 2013. ISSN 20010370.

30 PATTERSON, A. L. A Fourier Series Method for the Determination of the Components of Interatomic Distances in Crystals. Physical Review, v. 46, n. 5, p. 372–376, 9 1934. ISSN 0031-899X.

31 DEBYE, P.; ANDERSON, H. R.; BRUMBERGER, H. Scattering by an Inhomogeneous Solid. II. The Correlation Function and Its Application. Journal of Applied Physics, v. 28, n. 6, p. 679–683, 6 1957. ISSN 0021-8979.

- 32 POROD, G. Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden Systemen. *Kolloid-Zeitschrift*, Springer-Verlag, v. 124, n. 2, p. 83–114, 11 1951. ISSN 0303-402X.
- 33 GUINIER, A.; FOURNET, G. Small-angle scattering of X-rays. 1^a edição. ed. New York, New York: Wiley, 1955. 268 p. ISSN 01463535. ISBN 0146-3535.
- 34 HURA, G. L. et al. Robust, high-throughput solution structural analyses by small angle X-ray scattering (SAXS). *Nature Methods*, v. 6, n. 8, p. 606–612, 8 2009. ISSN 1548-7091.
- 35 SVERGUN, D. I.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography*, International Union of Crystallography, v. 28, n. 6, p. 768–773, 12 1995. ISSN 00218898.
- 36 FRANKE, D.; SVERGUN, D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*, v. 42, n. 2, p. 342–346, 4 2009. ISSN 00218898.
- 37 CHACÓN, P. et al. Low-Resolution Structures of Proteins in Solution Retrieved from X-Ray Scattering with a Genetic Algorithm. *Biophysical Journal*, v. 74, n. 6, p. 2760–2775, 6 1998. ISSN 00063495.
- 38 CHACÓN, P. et al. Reconstruction of protein form with X-ray solution scattering and a genetic algorithm. *Journal of Molecular Biology*, v. 299, n. 5, p. 1289–1302, 6 2000. ISSN 00222836.
- 39 DEBYE, P. Zerstreung von Röntgenstrahlen. *Annalen der Physik*, WILEY-VCH Verlag, v. 351, n. 6, p. 809–823, 1 1915. ISSN 00033804.
- 40 TONG, D.; YANG, S.; LU, L. Accurate optimization of amino acid form factors for computing small-angle X-ray scattering intensity of atomistic protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, v. 49, n. 4, p. 1148–1161, 8 2016. ISSN 16005767.
- 41 TONG, D. Computer modeling of solution X-ray scattering intensity for biomacromolecules. 2016.
- 42 BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The Missing Term in Effective Pair Potentials. *J. Phys. Chem*, v. 91, p. 6269–6271, 1987.
- 43 RAVIKUMAR, K. M.; HUANG, W.; YANG, S. Fast-SAXS-pro: a unified approach to computing SAXS profiles of DNA, RNA, protein, and

their complexes. *The Journal of chemical physics*, v. 138, p. 7, 2013. ISSN 1089-7690.

44 VALENTINI, E. et al. SASBDB, a repository for biological small-angle scattering data. *Nucleic Acids Research*, 2015. ISSN 13624962.

45 JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology*, *J Mol Biol*, v. 292, n. 2, p. 195–202, 9 1999. ISSN 00222836.

46 RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. *Advances in Protein Chemistry*, v. 23, n. C, p. 283–437, 1968. ISSN 00653233.

47 KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. A. Phi/Psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure*, v. 4, n. 12, p. 1395–1400, 12 1996. ISSN 09692126.

48 HO, B. K.; THOMAS, A.; BRASSEUR, R. Revisiting the Ramachandran plot: Hard-sphere repulsion, electrostatics, and H-bonding in the α -helix. *Protein Science*, v. 12, n. 11, p. 2508–2522, 1 2003. ISSN 09618368.

49 HO, B. K.; BRASSEUR, R. The Ramachandran plots of glycine and pre-proline. *BMC structural biology*, v. 5, p. 14, 2005. ISSN 1472-6807.

50 BATSANOV, S. S. Van der Waals Radii of Elements. *Inorganic Materials Translated from Neorganicheskie Materialy Original Russian Text*, v. 37, n. 9, p. 871–885, 2001. ISSN 0020-1685, 1608-3172.

51 TATIANI, C. Desenvolvimento de ferramentas computacionais para o estudo de macromoléculas. [S.l.]: Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2016. 80 p.

52 ZWANZIG, R.; SZABO, A.; BAGCHI, B. Levinthal's paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 1, p. 20–22, 1992. ISSN 0027-8424.

53 THORNTON, S. T.; MARION, J. B. *Classical Dynamics of Particles and Systems*. [S.l.]: Brooks/Cole, 2004. 672 p. ISSN 00160032. ISBN 0-534-40896-6.

54 METROPOLIS, N. et al. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *The Journal of Chemical Physics*, v. 21, n. 6, p. 1087–1092, 6 1953. ISSN 0021-9606.

55 CLARKE, N. D. et al. Structural studies of the engrailed homeodomain. *Protein science : a publication of the Protein Society*, v. 3, n. 10, p. 1779–87, 1994. ISSN 0961-8368.

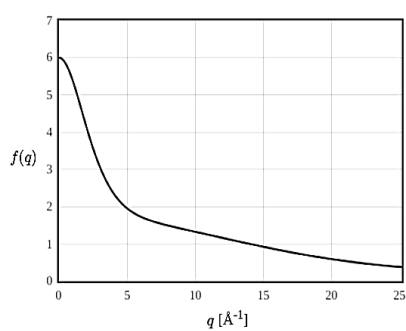
- 56 MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. [S.l.], 2000. v. 16, n. 4, 404–405 p.
- 57 COTA, J. et al. Assembling a xylanase-lichenase chimera through all-atom molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, Elsevier B.V., v. 1834, n. 8, p. 1492–1500, 8 2013. ISSN 18781454.
- 58 OLIVEIRA, L. C. d. et al. Conformational Changes in a Hyperthermostable Glycoside Hydrolase: Enzymatic Activity Is a Consequence of the Loop Dynamics and Protonation Balance. *PLoS ONE*, Public Library of Science, v. 10, n. 2, p. e0118225, 2 2015. ISSN 1932-6203.
- 59 BROWN, P. J. et al. Intensity of diffracted intensities. In: PRINCE, E. (Ed.). *International Tables for Crystallography*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. C, p. 554–595. ISBN 978-1-4020-5408-2.

Anexo A

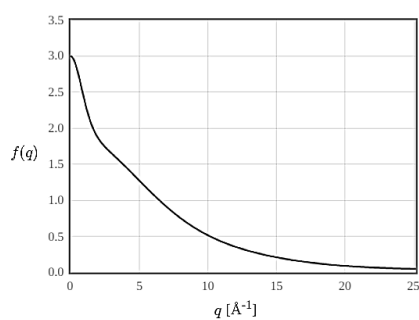
Parâmetros de Cromer-Mann.

Os fatores de espalhamento são calculados utilizando a equação [A.1](#), que possui uma dependência direta com o vetor momento de espalhamento, conforme apresentado na figura [A.1](#). Os coeficientes de Cromer-Mann, representados por a_i , b_i e c , são específicos para cada elemento químico e são apresentados na tabela [A.1](#).

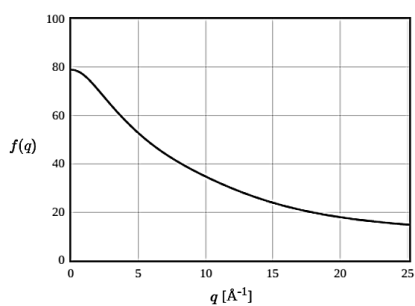
$$f_i(q) = \sum_{k=1}^4 a_k \exp \left[-b_k \left(\frac{q}{4\pi} \right)^2 \right] + c \quad (\text{A.1})$$



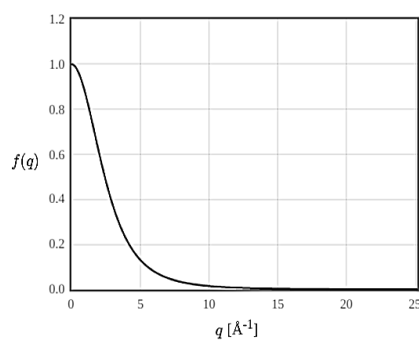
(a) Carbono



(b) Lítio



(c) Ouro



(d) Hidrogênio

Figura A.1: Relação entre $f(q)$ e q para diferentes elementos químicos.
Fonte: autoria própria

Tabela A.1: Valores de a_i , b_i e c para diversos elementos químicos.

Elemento	a_1	b_1	a_2	b_2	a_3	b_3	a_4	b_4	c
H	0.489918	20.6593	0.262003	7.74039	0.196767	49.5519	0.049879	2.20159	0.001305
He	0.8734	9.1037	0.6309	3.3568	0.3112	22.9276	0.178	0.9821	0.0064
C	2.31	20.8439	1.02	10.2075	1.5886	0.5687	0.865	51.6512	0.2156
N	12.2126	0.0057	3.1322	9.8933	2.0125	28.9975	1.1663	0.5826	-11.529
O	3.0485	13.2771	2.2868	5.7011	1.5463	0.3239	0.867	32.9089	0.2508
Ne	3.9553	8.4042	3.1125	3.4262	1.4546	0.2306	1.1251	21.7184	0.3515
Na	4.7626	3.285	3.1736	8.8422	1.2674	0.3136	1.1128	129.424	0.676
Mg	5.4204	2.8275	2.1735	79.2611	1.2269	0.3808	2.3073	7.1937	0.8584
P	6.4345	1.9067	4.1791	27.157	1.78	0.526	1.4908	68.1645	1.1149
S	6.9053	1.4679	5.2034	22.2151	1.4379	0.2536	1.5863	56.172	0.8669
Ca	8.6266	10.4421	7.3873	0.6599	1.5899	85.7484	1.0211	178.437	1.3751
Fe	11.7695	4.7611	7.3573	0.3072	3.5222	15.3535	2.3045	76.8805	1.0369
Zn	14.0743	3.2655	7.0318	0.2333	5.1652	10.3163	2.41	58.7097	1.3041
Se	17.0006	2.4098	5.8196	0.2726	3.9731	15.2372	4.3543	43.8163	2.8409
Au	16.8819	0.4611	18.5913	8.6216	25.5582	1.4826	5.86	36.3956	12.0658

Fonte: International Tables of Crystallography. [\[59\]](#)

Anexo B

Critério de Metropolis.

O critério de Metropolis é utilizado no programa como forma de minimização do potencial construído no capítulo 4. As estruturas geradas, de forma não aleatória, são comparadas com a conformação anterior, então, o sistema de menor energia, ou com flutuações térmicas razoáveis, é selecionado.

O critério de Metropolis foi implementado de acordo com o esquema [B.1](#). A nova estrutura gerada no programa Pivot-SAXS tem sua energia calculada, assim como variação da energia com relação à estrutura anterior. Caso a variação seja negativa a nova conformação é aceita, ou seja, ela assume a posição de conformação antiga. Quando a variação é positiva, um número aleatório, entre 0 e 1, é comparado com o peso de Boltzmann P_b dado pela equação [B.1](#). Se o número aleatório for maior a nova conformação é aceita, se não a antiga se mantém. O ciclo reinicia.

$$P_b = e^{\frac{E_{nova} - E_{old}}{kT}} \quad (B.1)$$

As simulações são feitas fora do equilíbrio térmico e o método minimiza a energia do sistema aceita considerando pequenas flutuações térmicas da ordem de kT , onde T é a temperatura da simulação no momento.

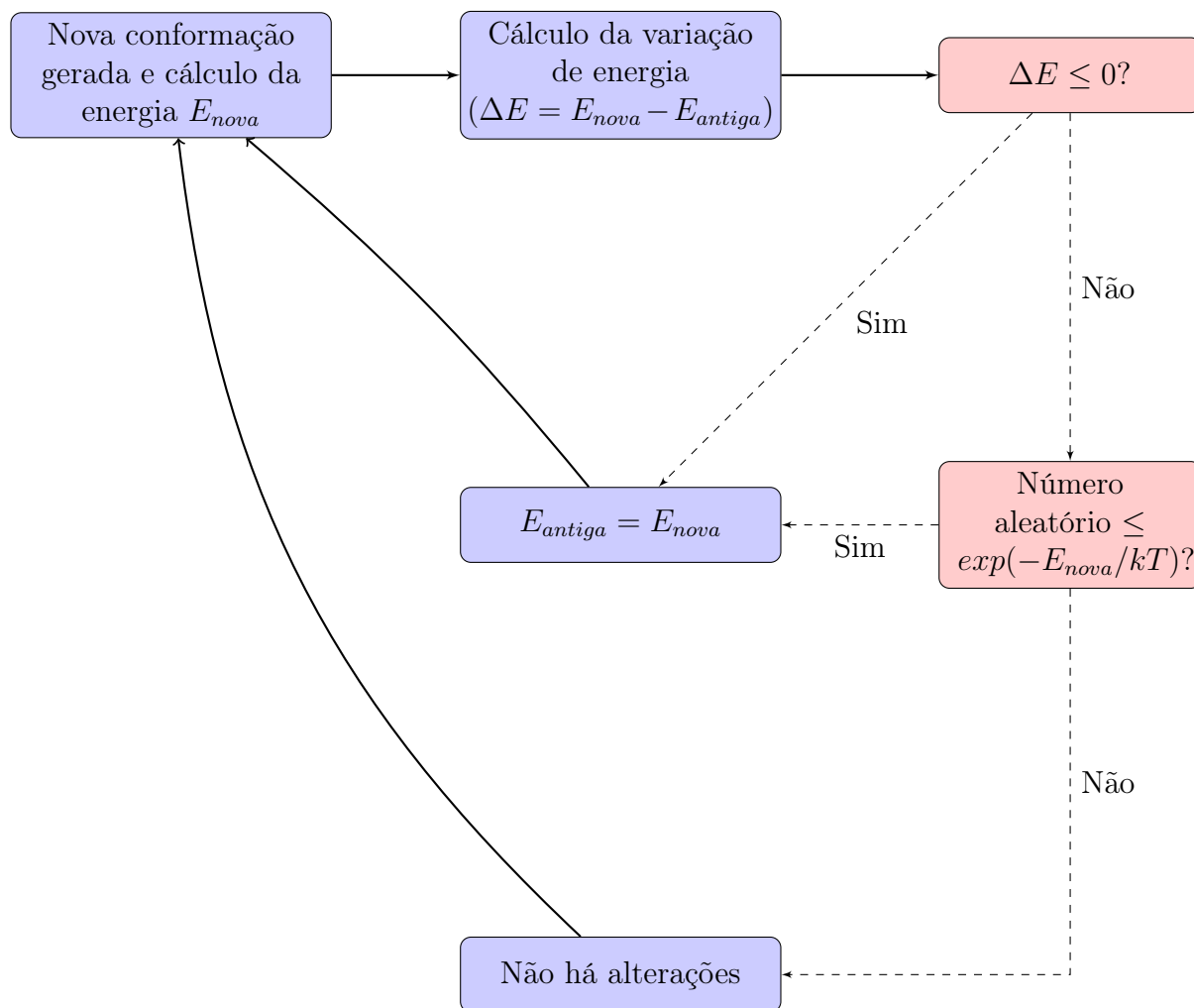
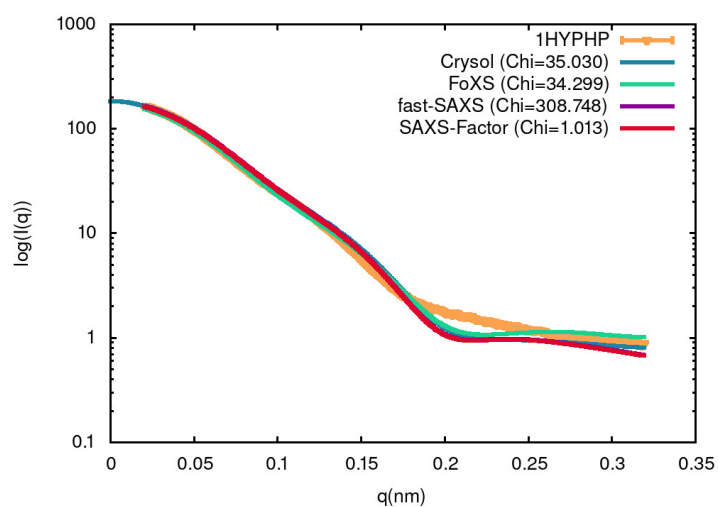


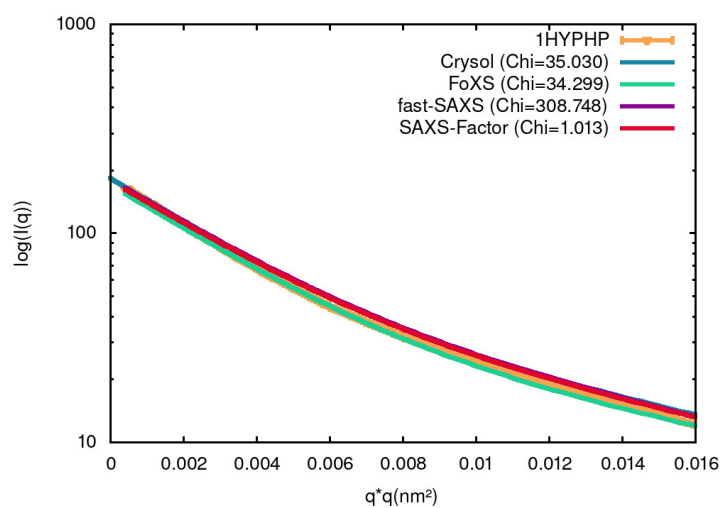
Figura B.1: Fluxograma do critério de Metropolis. A energia de uma conformação é calculada e comparada com a energia de uma conformação anterior. Se a energia diminuir, a conformação é aceita. Se a energia aumentar, um número aleatório é gerado e comparado com o peso de Boltzmann. Se o número for maior, a conformação é aceita, se não a simulação segue a partir da conformação anterior.

Anexo C

Curvas teóricas

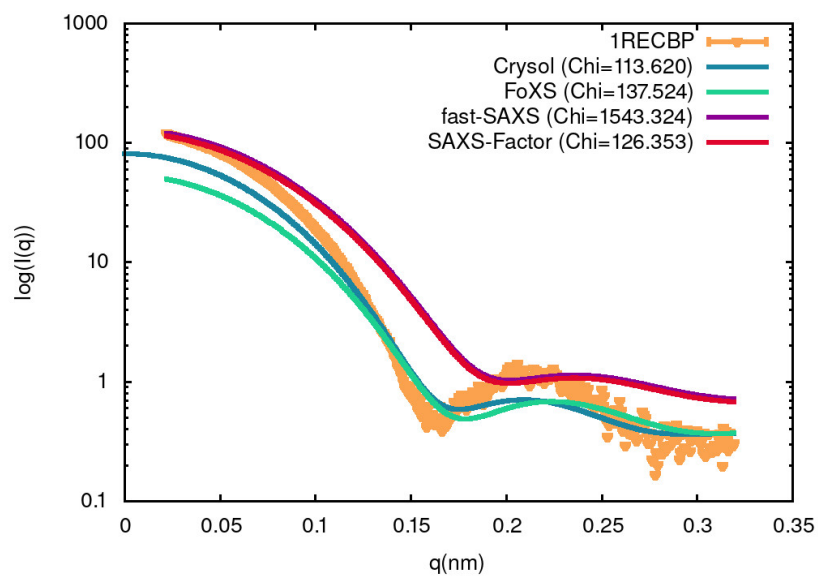


(a) 1HYPHP

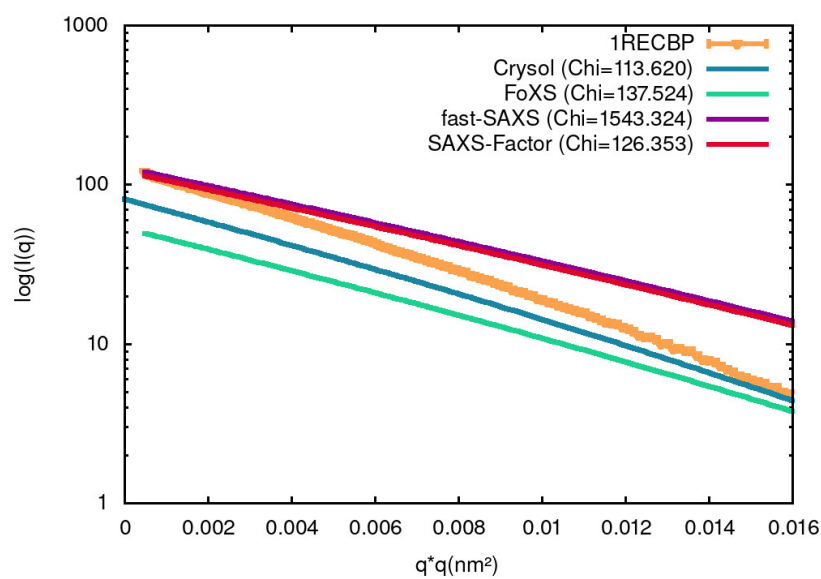


(b) 1HYPHP guinier

Figura C.1: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para 1HYPHP. Fonte: Autoria Própria.

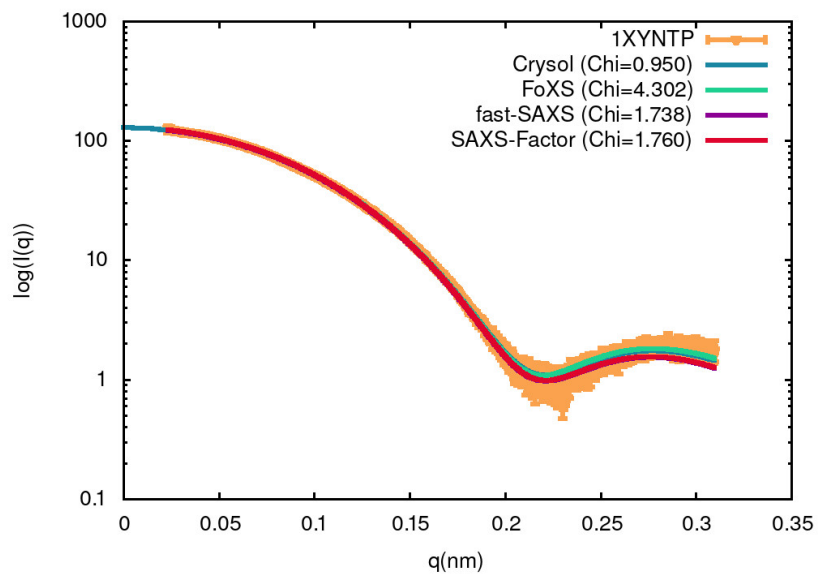


(a) 1RECBP

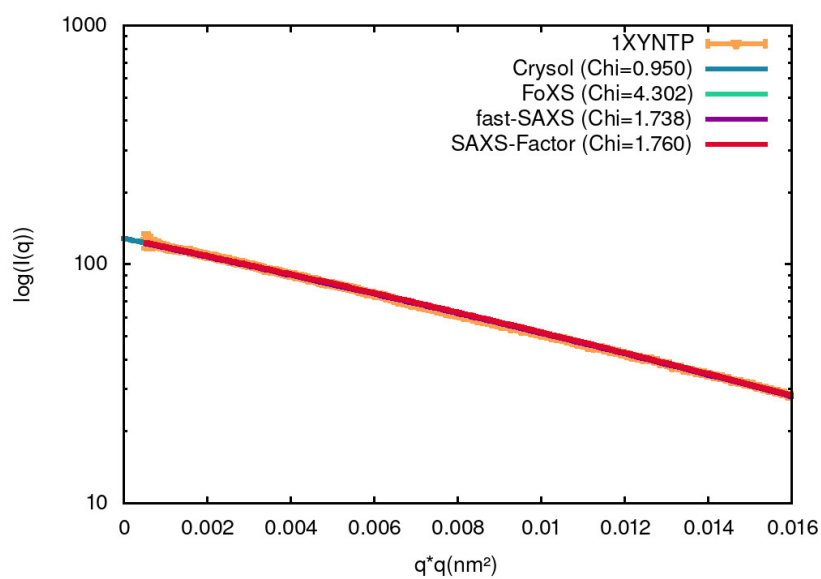


(b) 1RECBP guinier

Figura C.2: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para 1RECBP. Fonte: Autoria Própria.

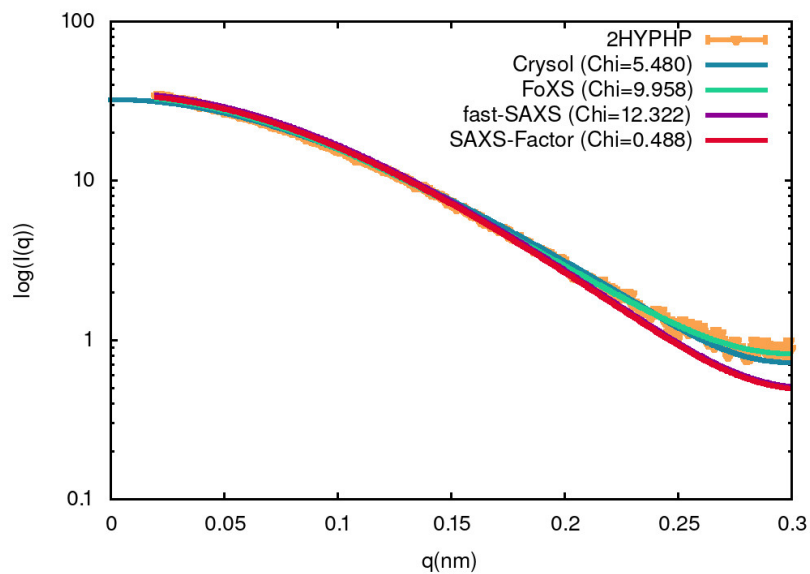


(a) 1XYNTP

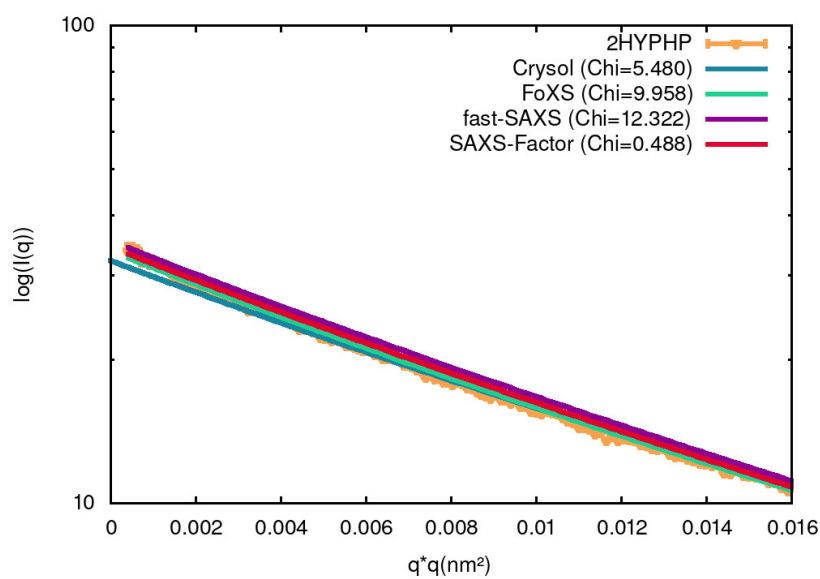


(b) 1XYNTP guinier

Figura C.3: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para 1XYNTP. Fonte: Autoria Própria.

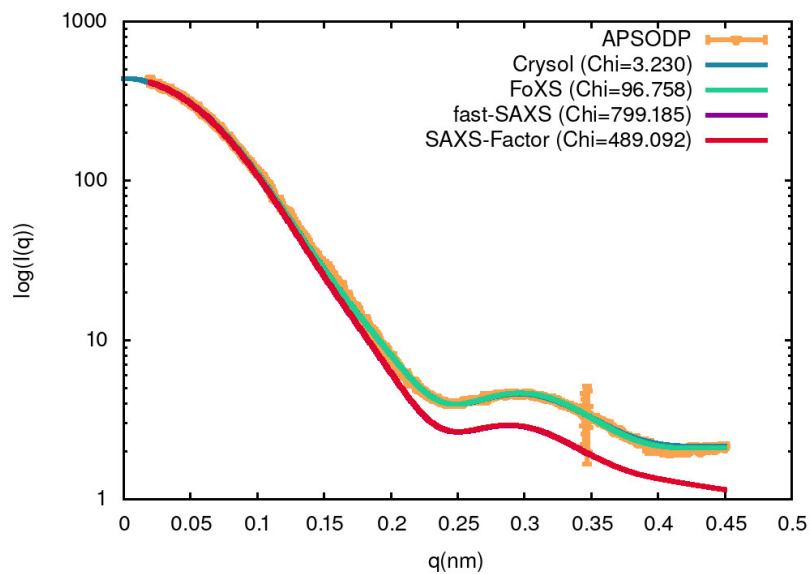


(a) 2HYPHP

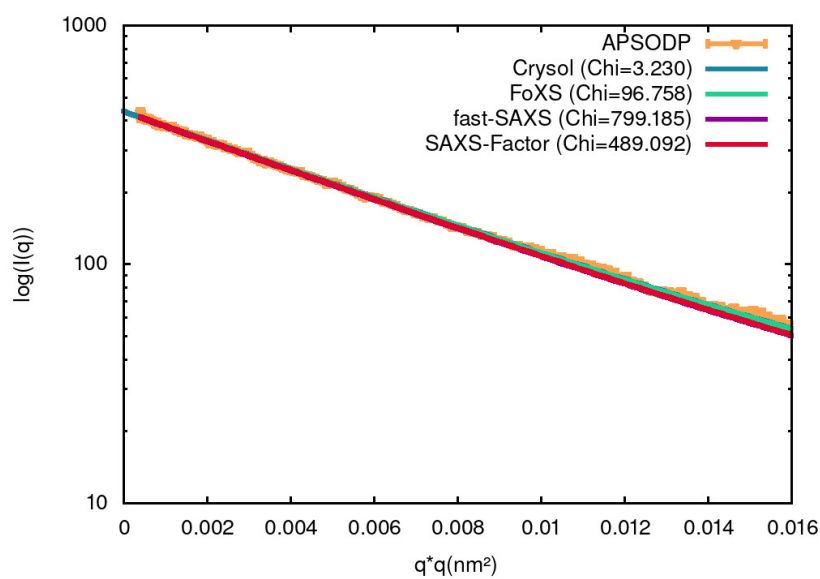


(b) 2HYPHP guinier

Figura C.4: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para 2HYPHP. Fonte: Autoria Própria.

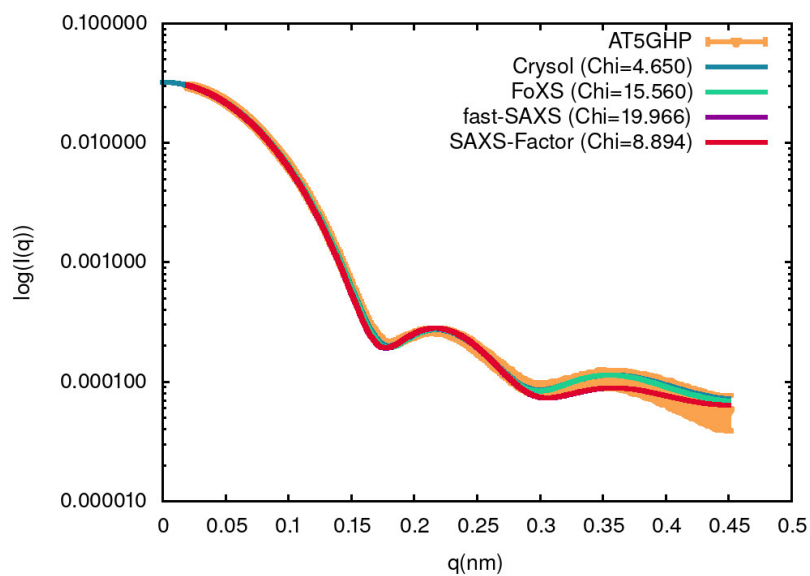


(a) APSODP

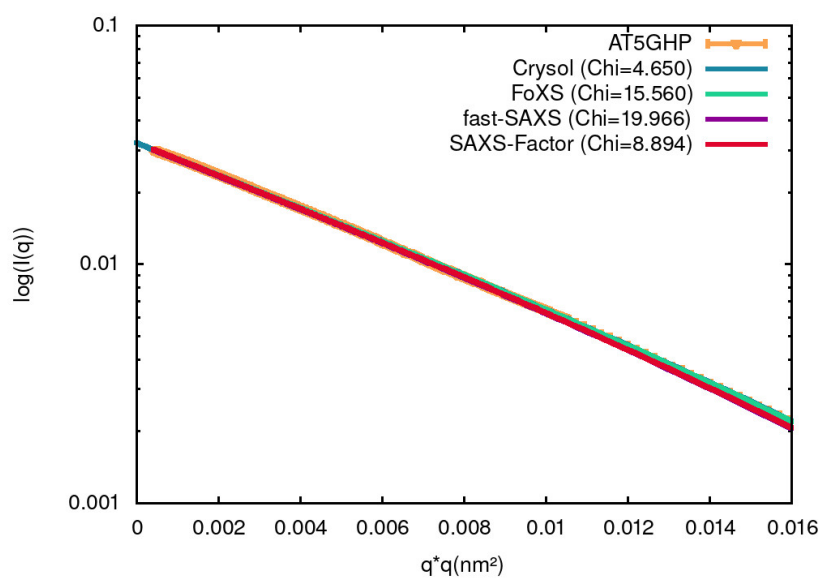


(b) APSODP guinier

Figura C.5: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para APSODP. Fonte: Autoria Própria.

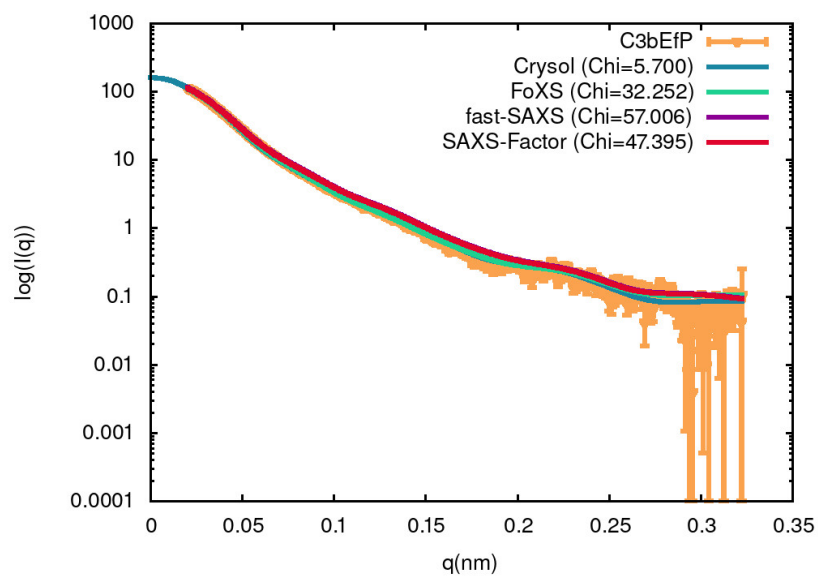


(a) AT5GHP

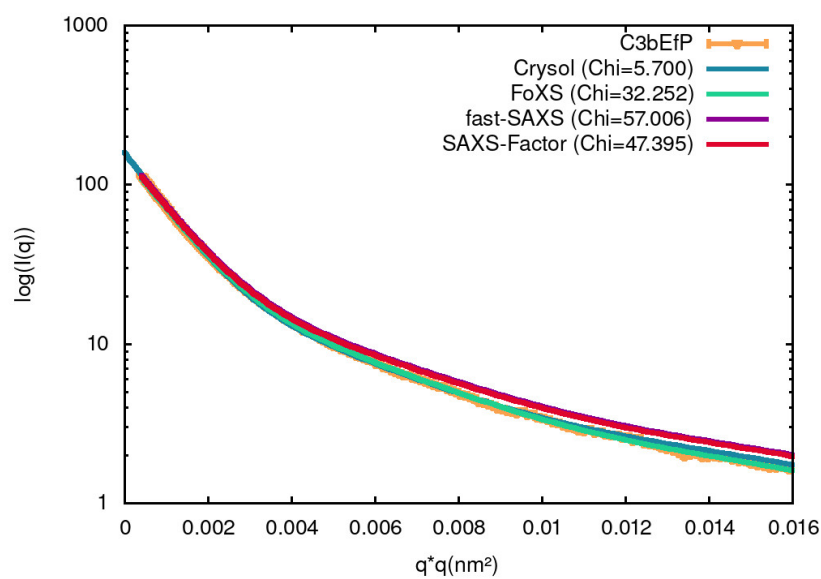


(b) AT5GHP guinier

Figura C.6: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para AT5GHP. Fonte: Autoria Própria.

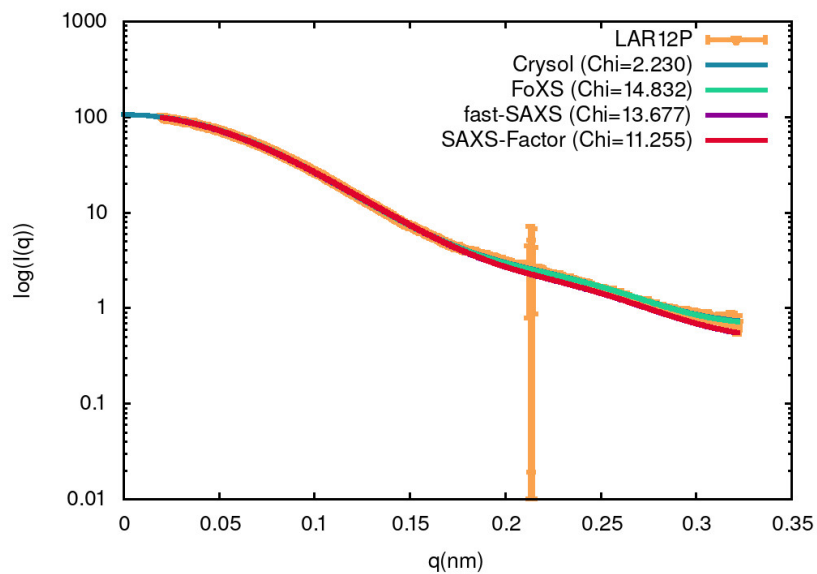


(a) C3bEfP

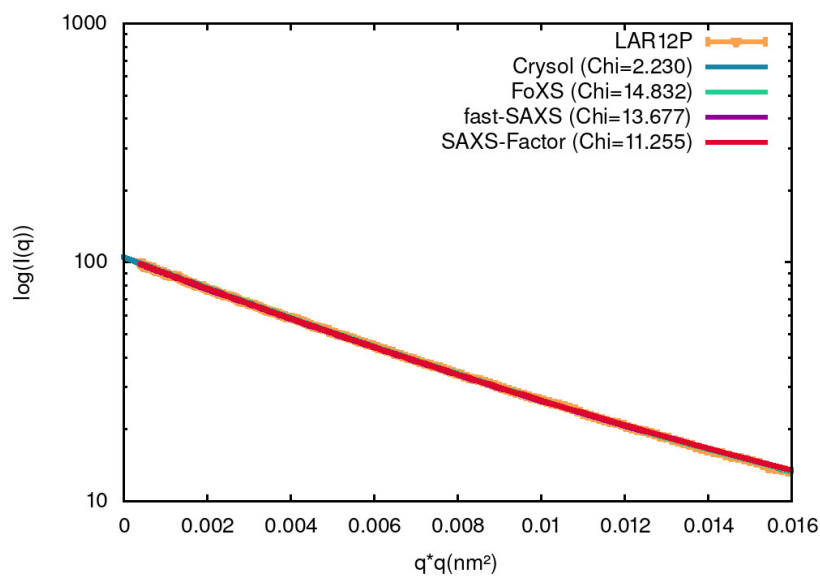


(b) C3bEfP guinier

Figura C.7: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para C3bEfP. Fonte: Autoria Própria.

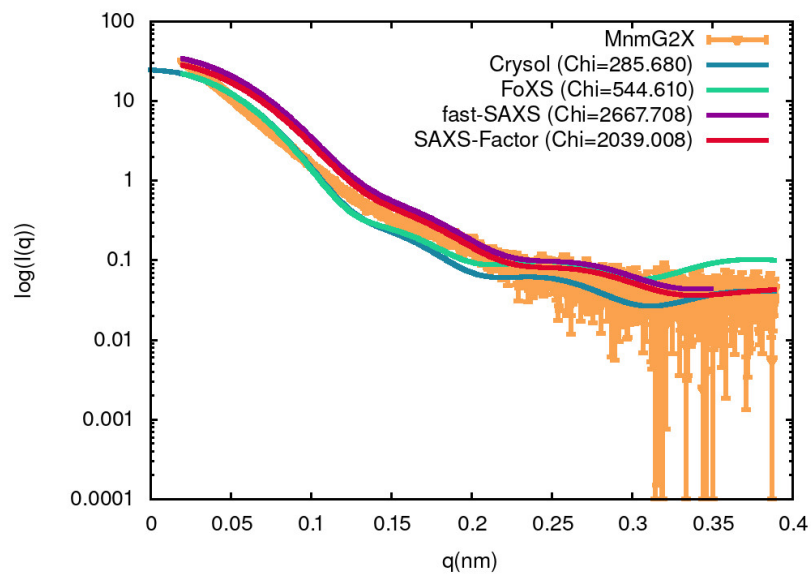


(a) LAR12P

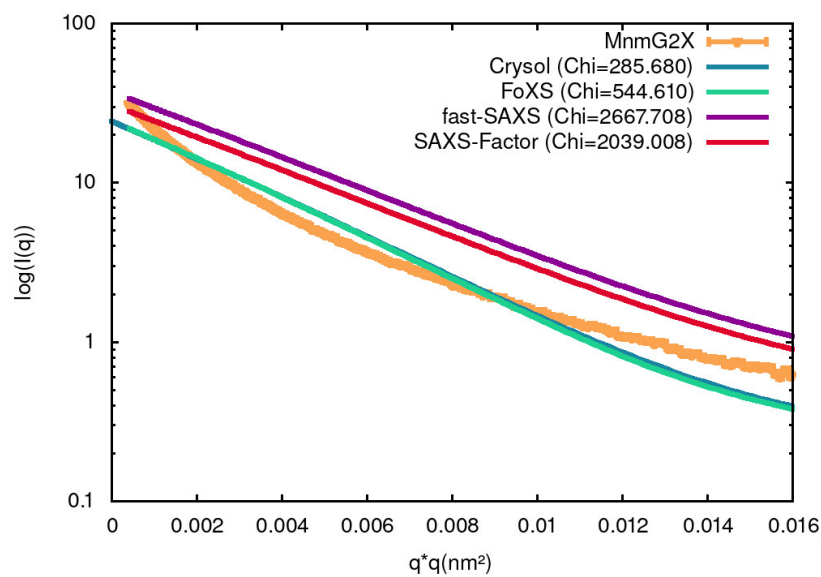


(b) LAR12P guinier

Figura C.8: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para LAR12P. Fonte: Autoria Própria.

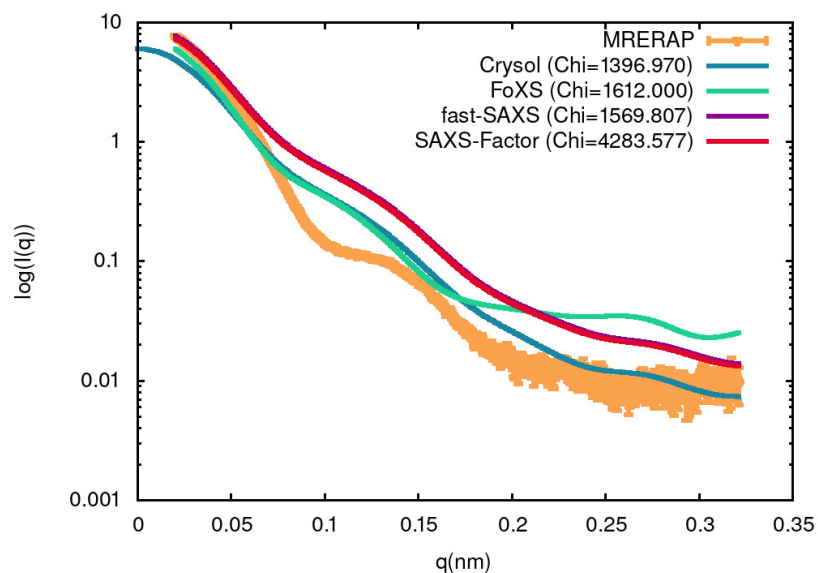


(a) MnmG2X

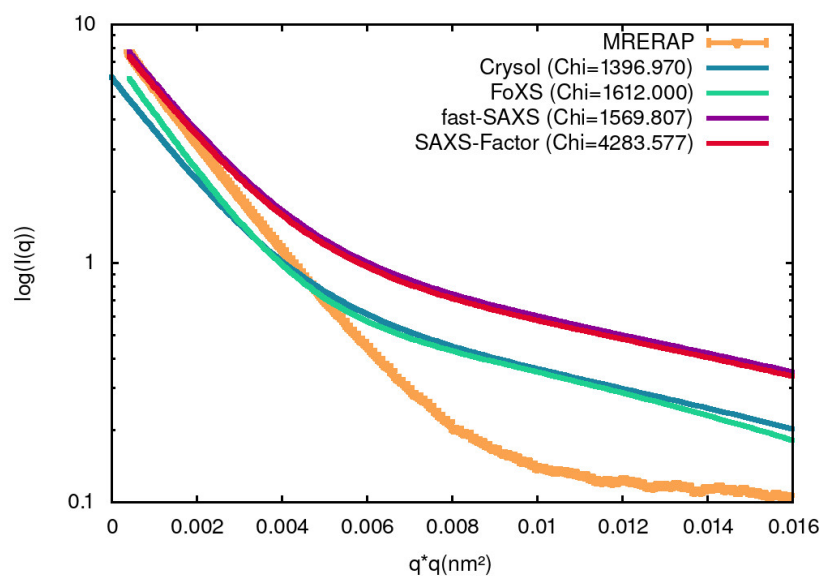


(b) MnmG2X guinier

Figura C.9: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para MnmG2X. Fonte: Autoria Própria.



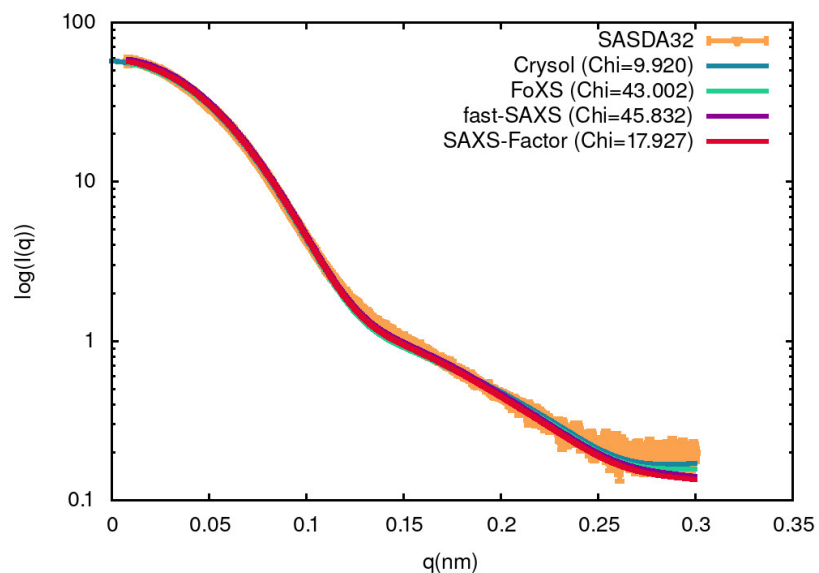
(a) MRERAP



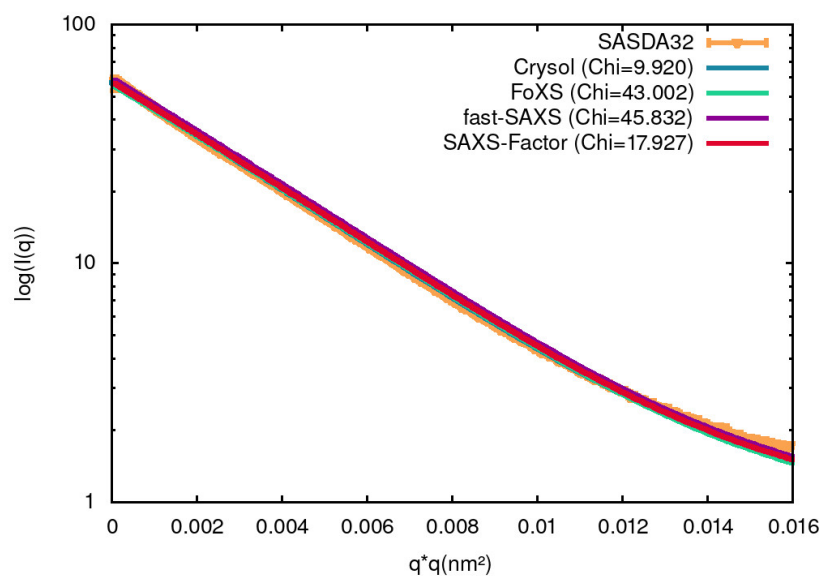
(b) MRERAP guinier

Figura C.10: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para MRE-RAP.

Fonte: Autoria Própria.



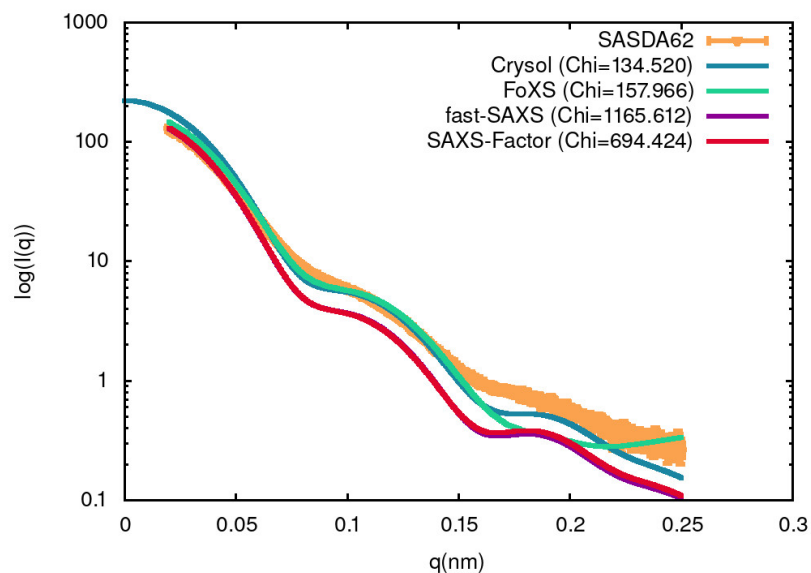
(a) SASDA32



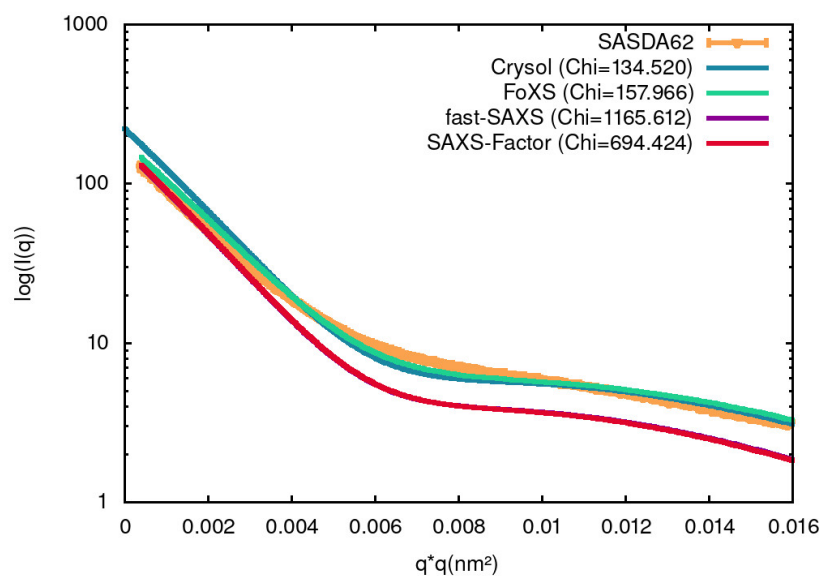
(b) SASDA32 guinier

Figura C.11: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDA32.

Fonte: Autoria Própria.



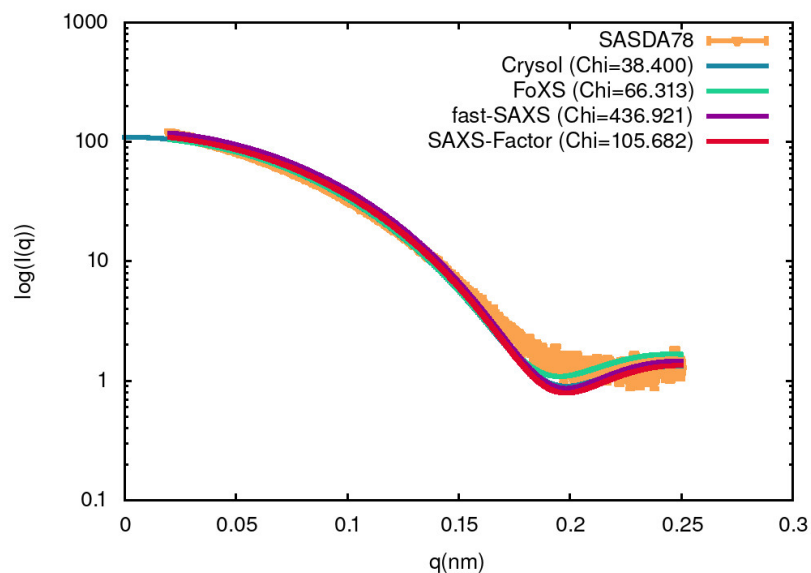
(a) SASDA62



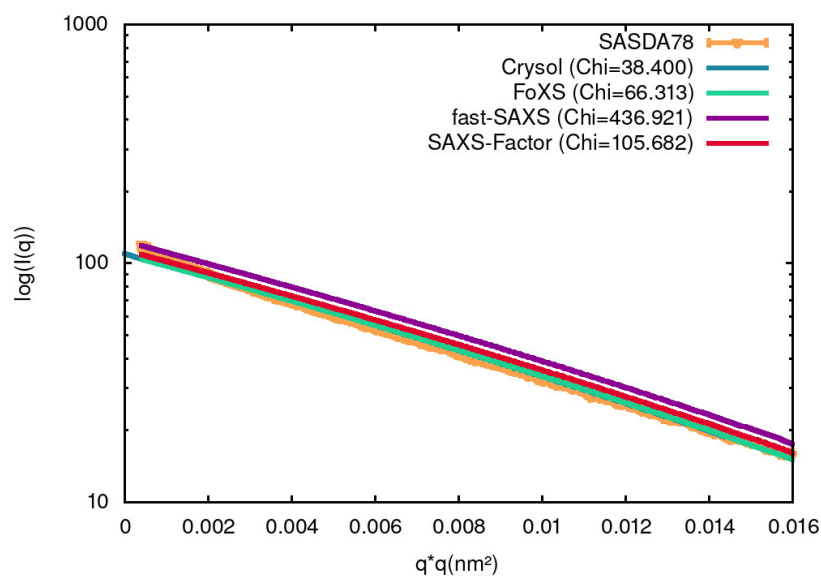
(b) SASDA62 guinier

Figura C.12: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDA62.

Fonte: Autoria Própria.



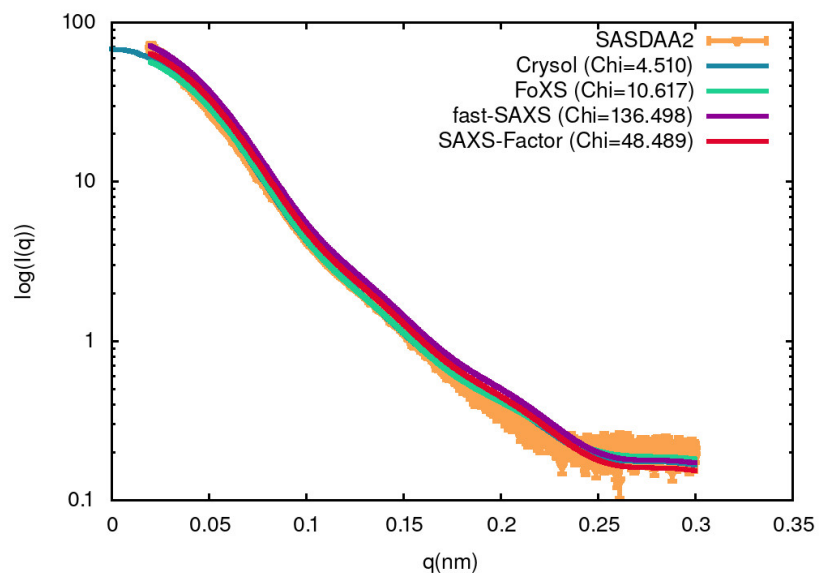
(a) SASDA78



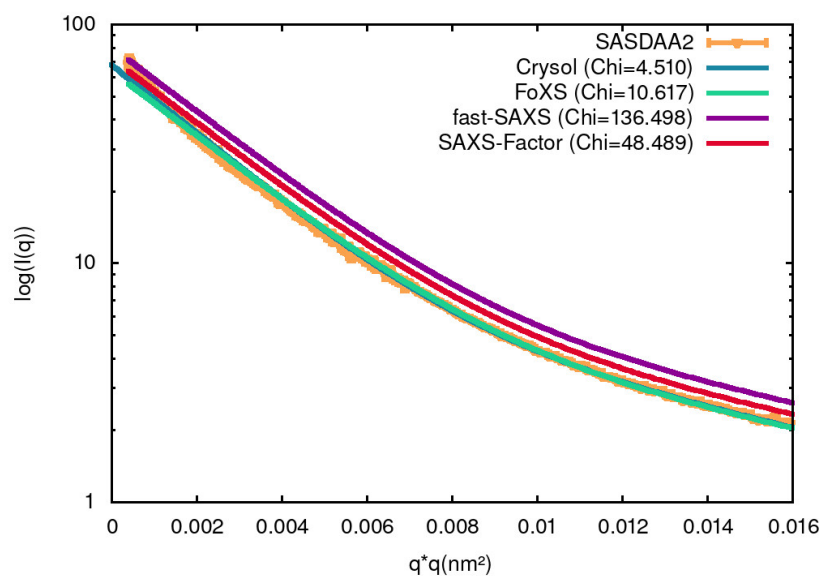
(b) SASDA78 guinier

Figura C.13: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDA78.

Fonte: Autoria Própria.



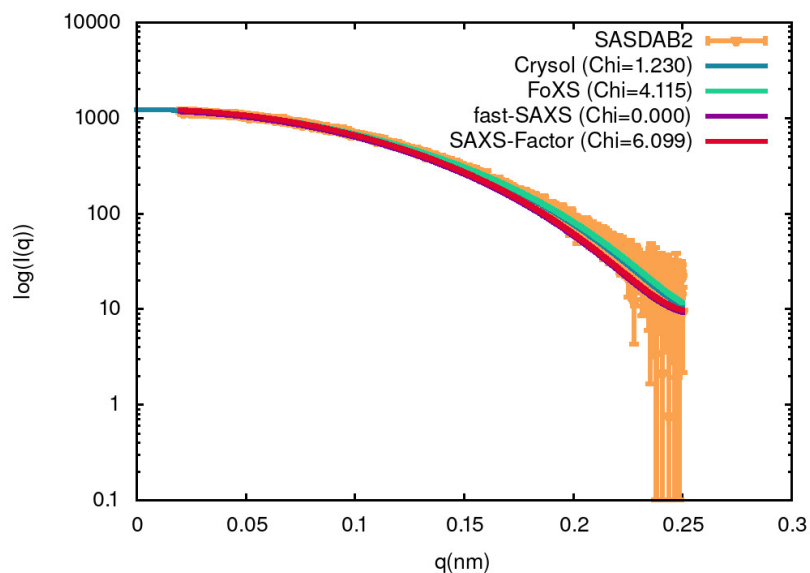
(a) SASDAA2



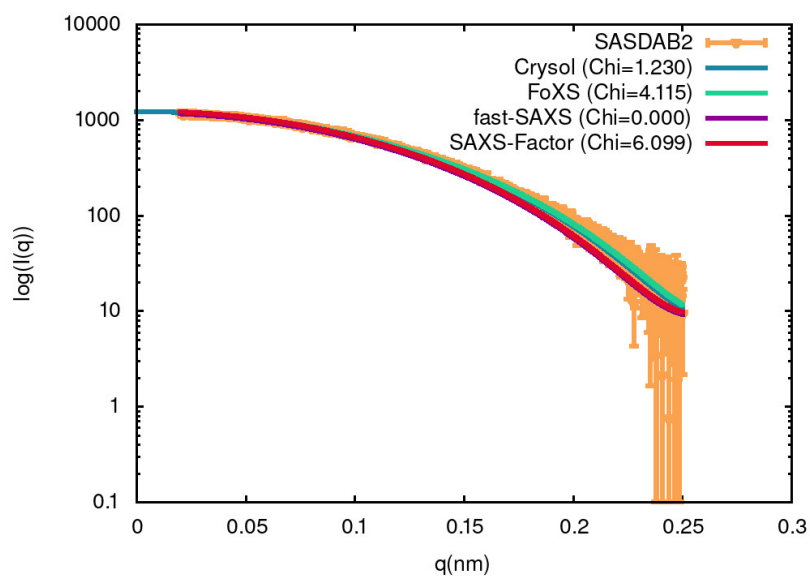
(b) SASDAA2 guinier

Figura C.14: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAA2.

Fonte: Autoria Própria.



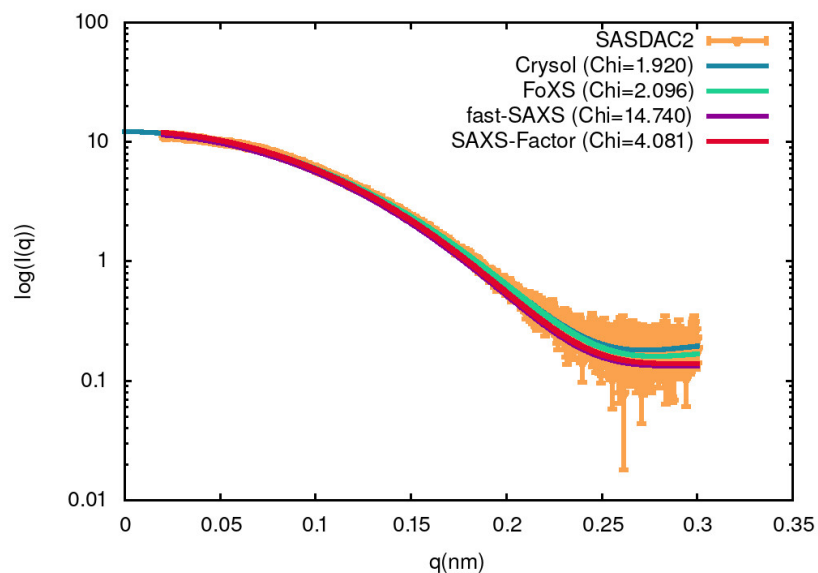
(a) SASDAB2



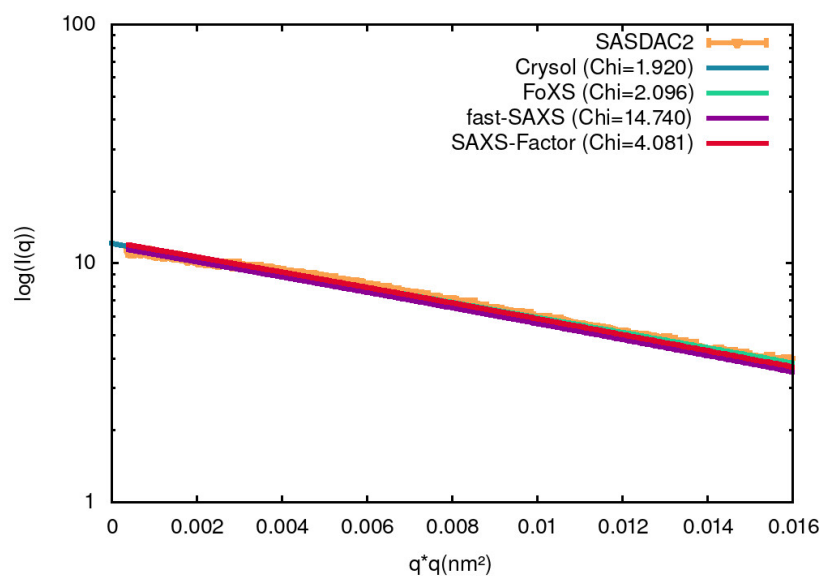
(b) SASDAB2 guinier

Figura C.15: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAB2.

Fonte: Autoria Própria.



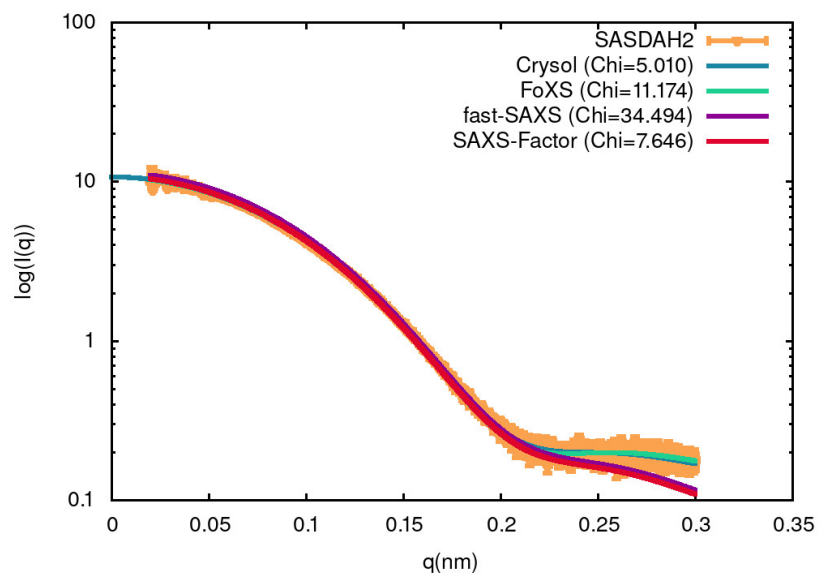
(a) SASDAC2



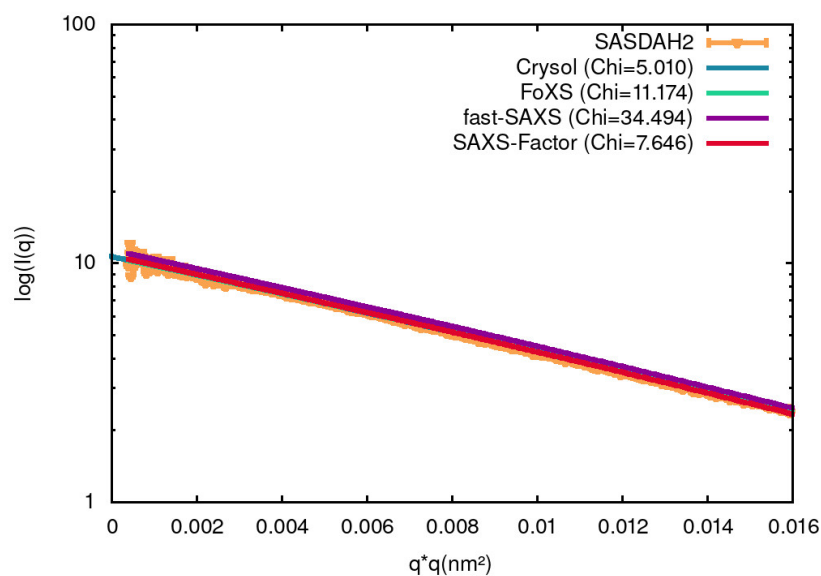
(b) SASDAC2 guinier

Figura C.16: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAC2.

Fonte: Autoria Própria.



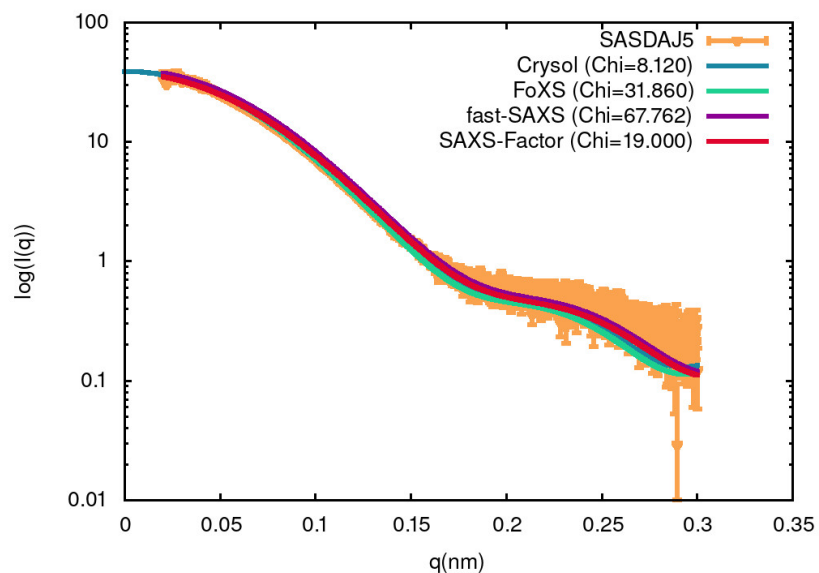
(a) SASDAH2



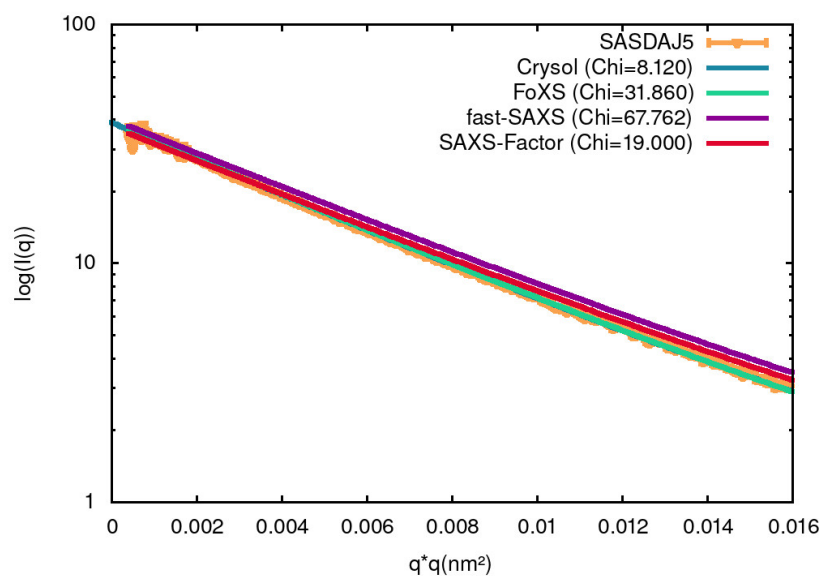
(b) SASDAH2 guinier

Figura C.17: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAH2.

Fonte: Autoria Própria.



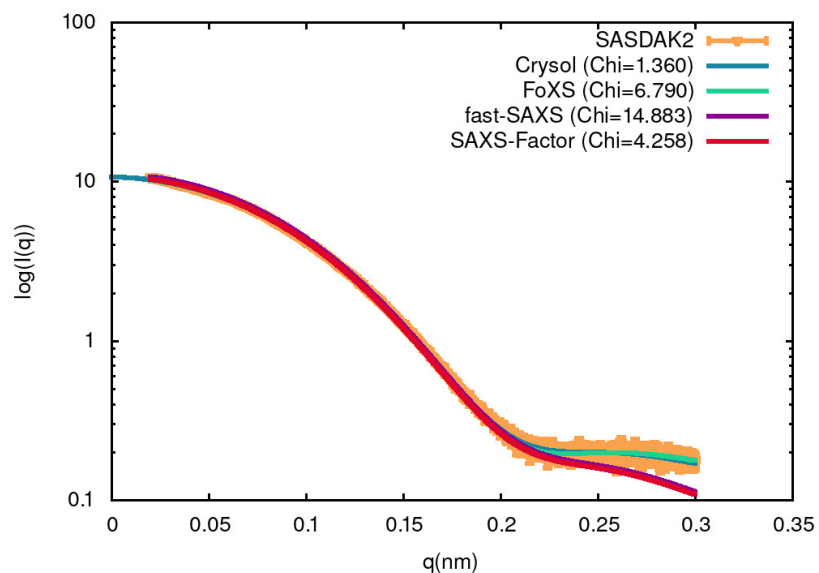
(a) SASDAJ5



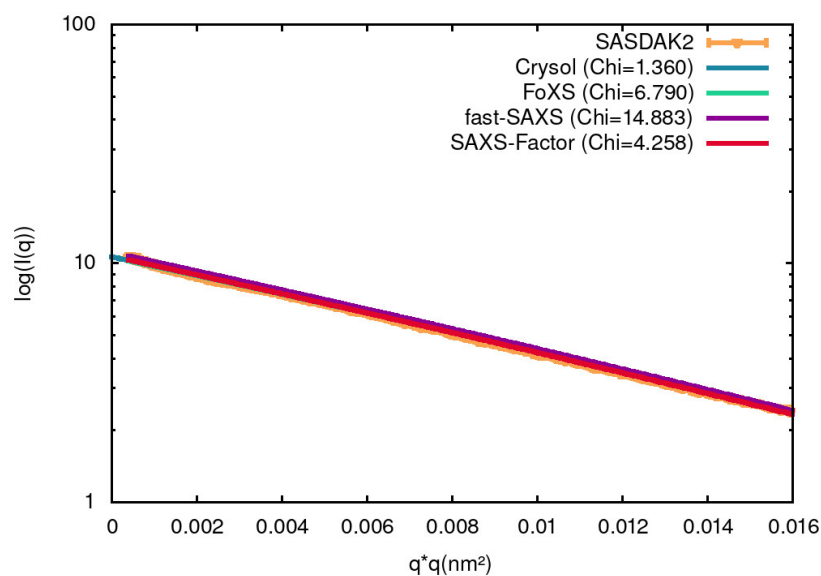
(b) SASDAJ5 guinier

Figura C.18: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAJ5.

Fonte: Autoria Própria.



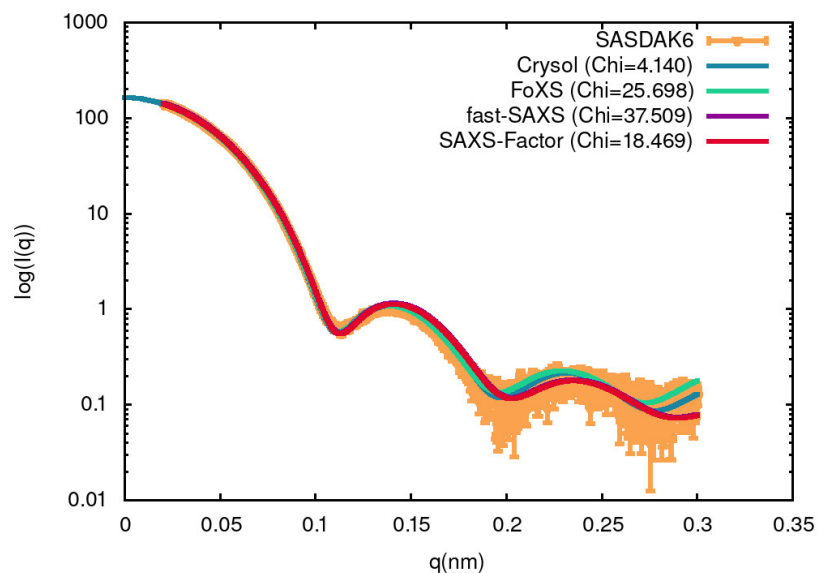
(a) SASDAK2



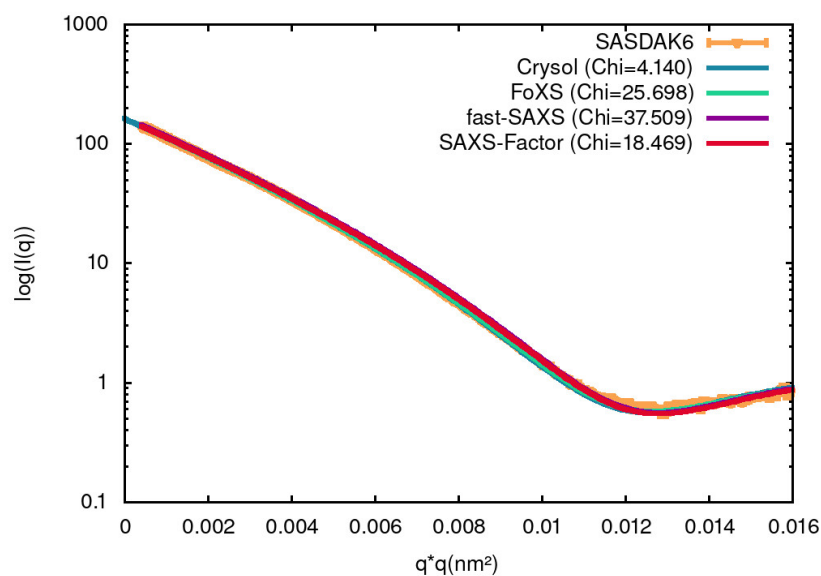
(b) SASDAK2 guinier

Figura C.19: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAK2.

Fonte: Autoria Própria.



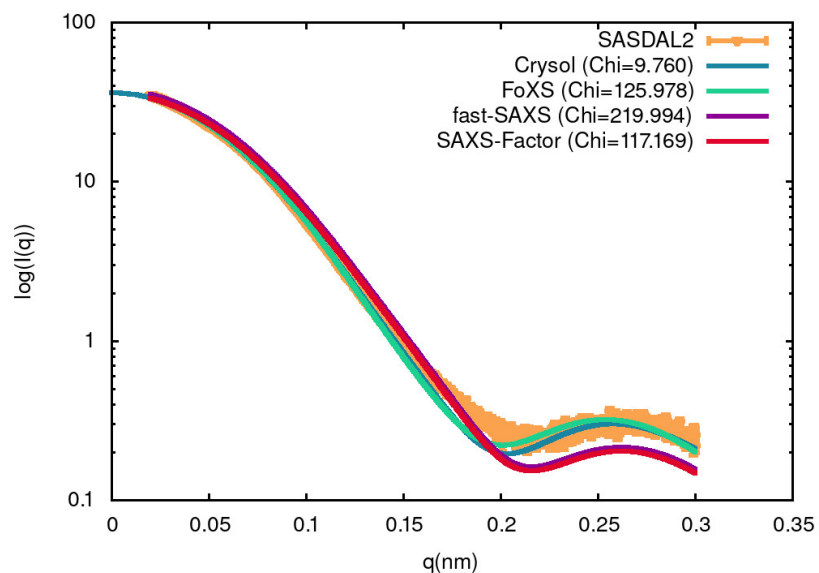
(a) SASDAK6



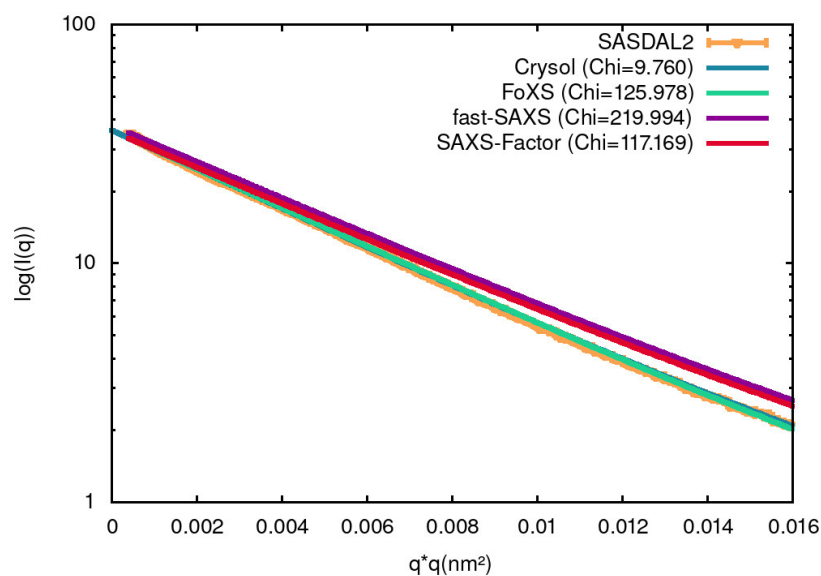
(b) SASDAK6 guinier

Figura C.20: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAK6.

Fonte: Autoria Própria.



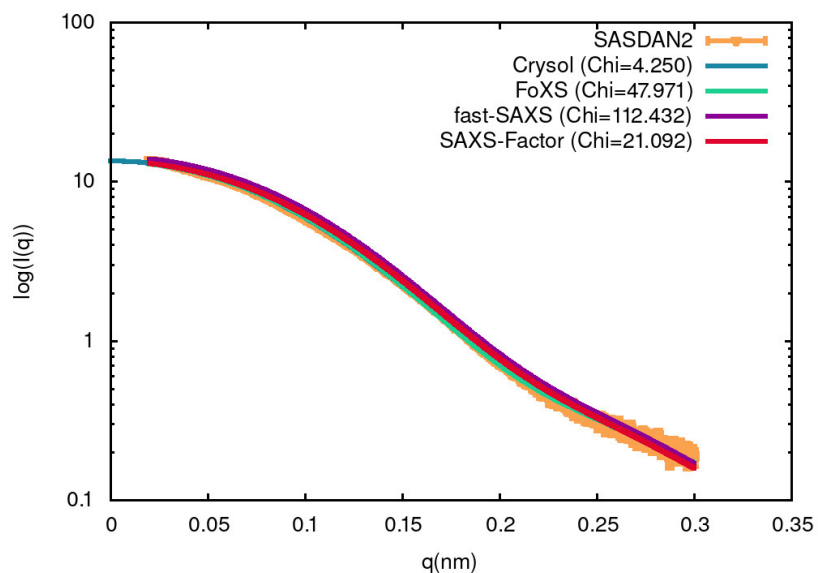
(a) SASDAL2



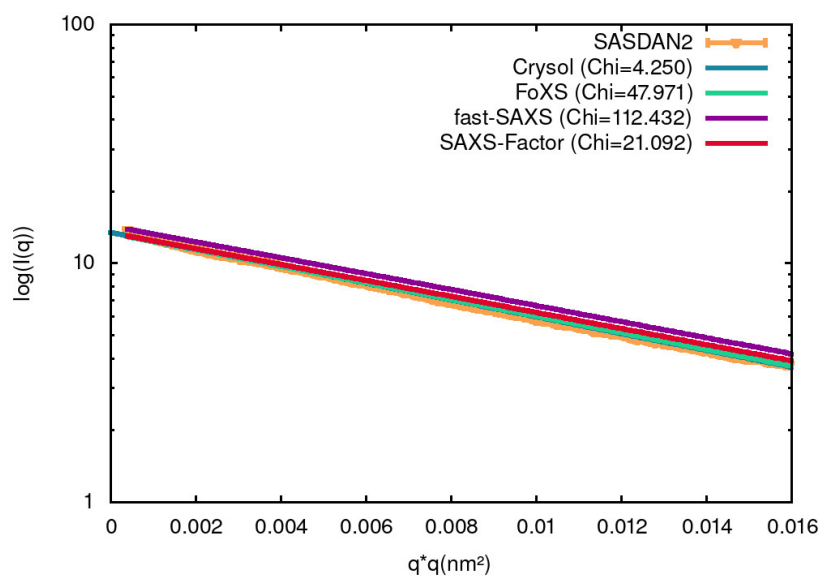
(b) SASDAL2 guinier

Figura C.21: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAL2.

Fonte: Autoria Própria.



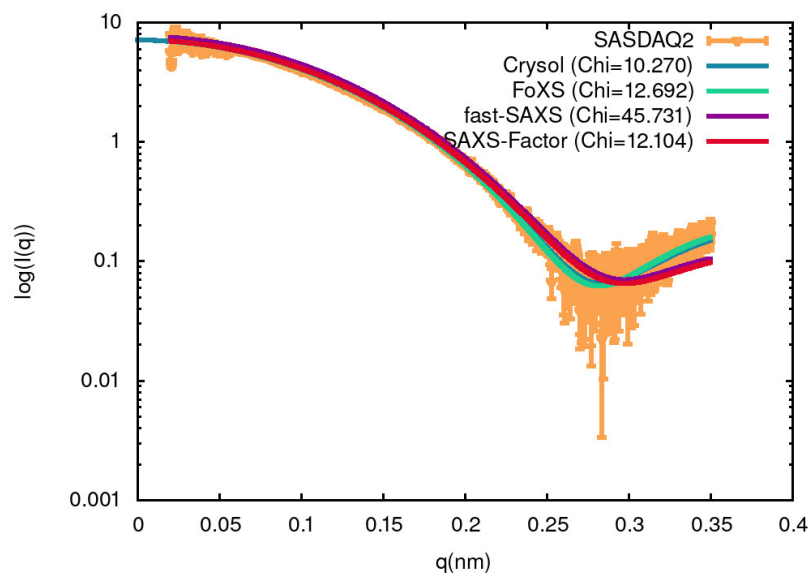
(a) SASDAN2



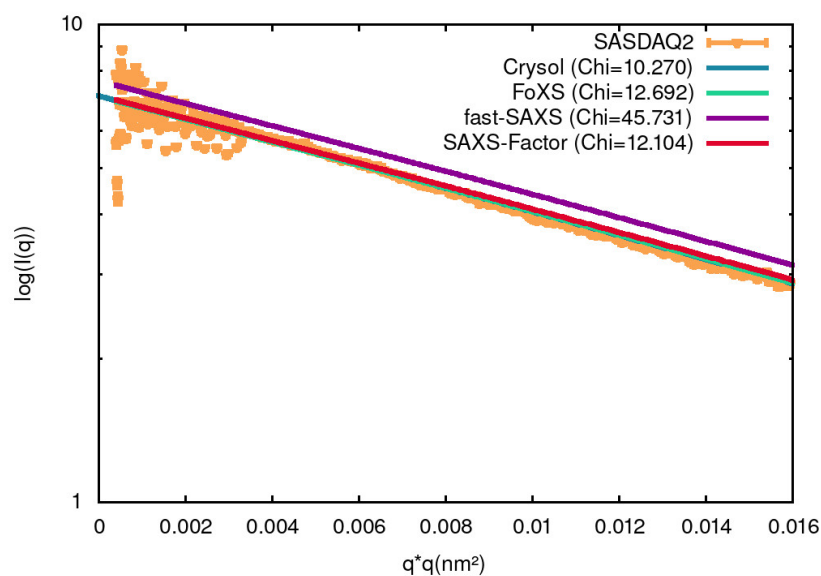
(b) SASDAN2 guinier

Figura C.22: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAN2.

Fonte: Autoria Própria.



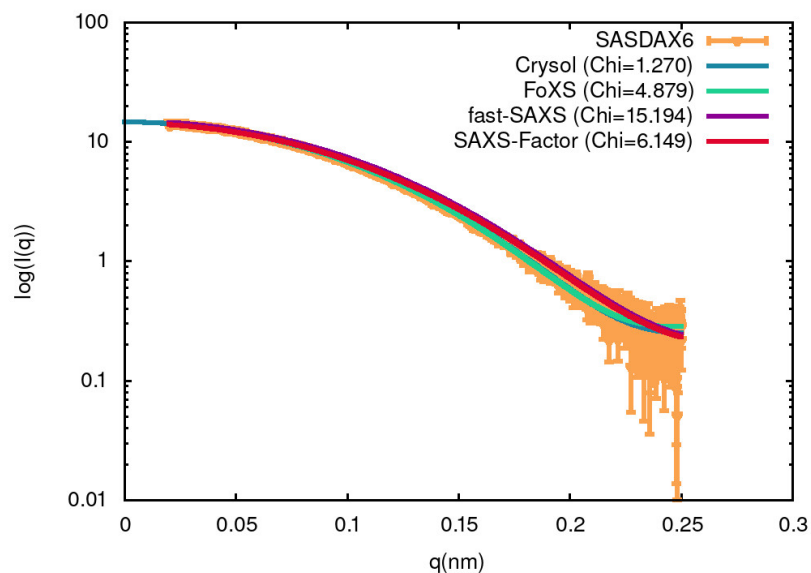
(a) SASDAQ2



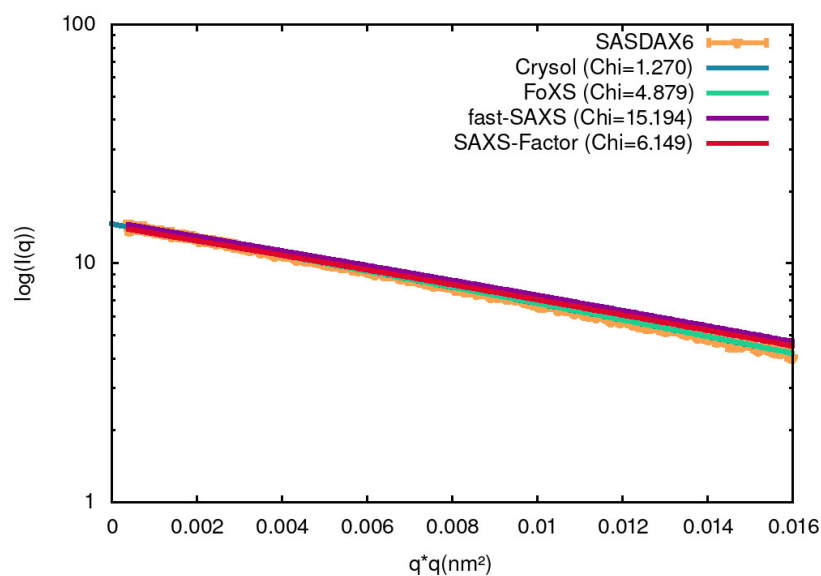
(b) SASDAQ2 guinier

Figura C.23: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAQ2.

Fonte: Autoria Própria.



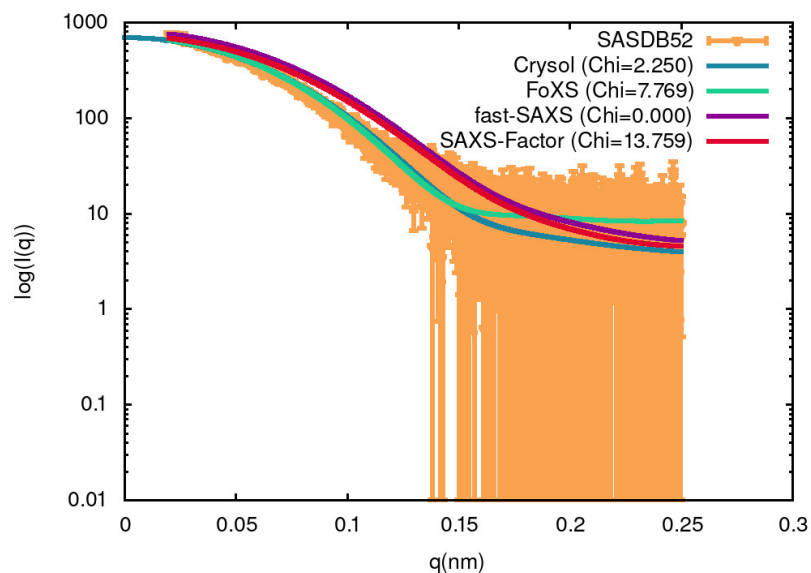
(a) SASDAX6



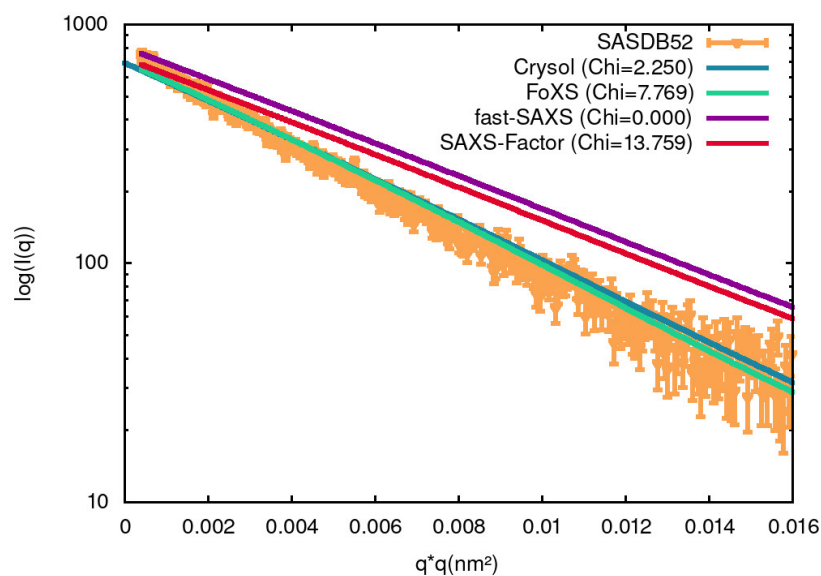
(b) SASDAX6 guinier

Figura C.24: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAX6.

Fonte: Autoria Própria.



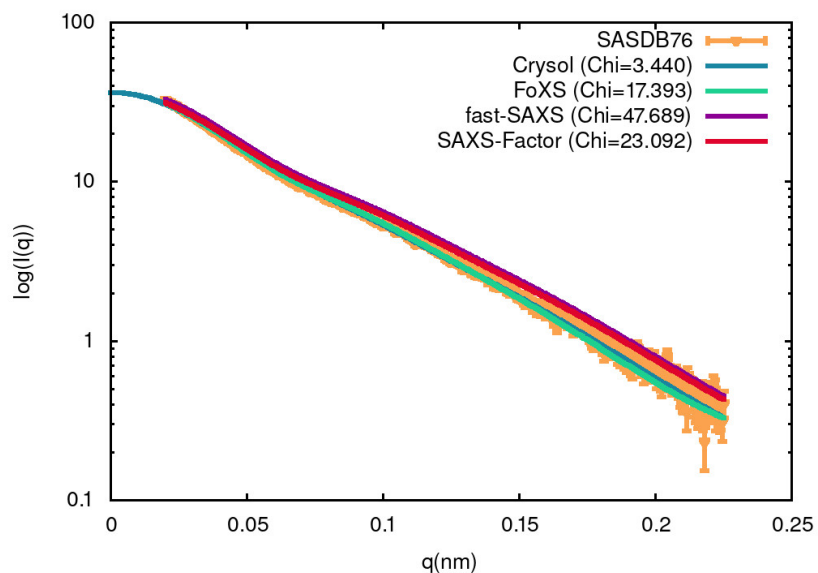
(a) SASDB52



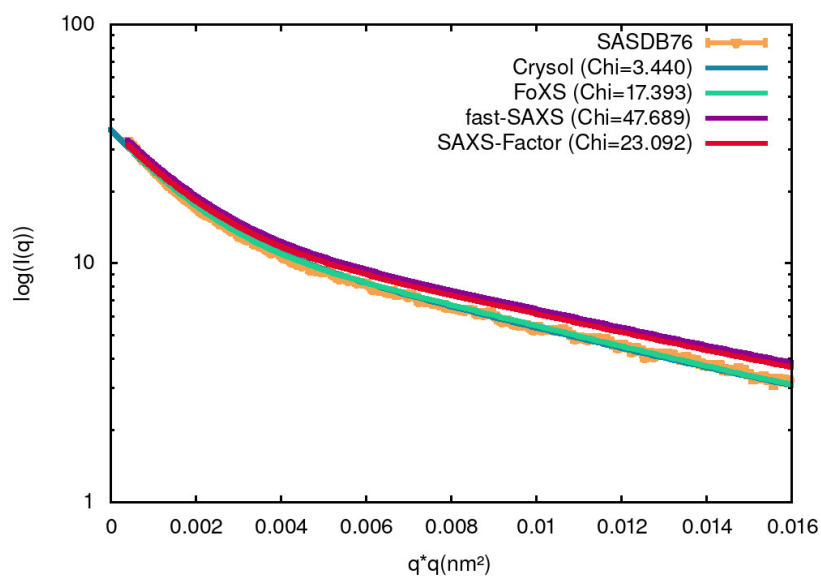
(b) SASDB52 guinier

Figura C.25: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDB52.

Fonte: Autoria Própria.



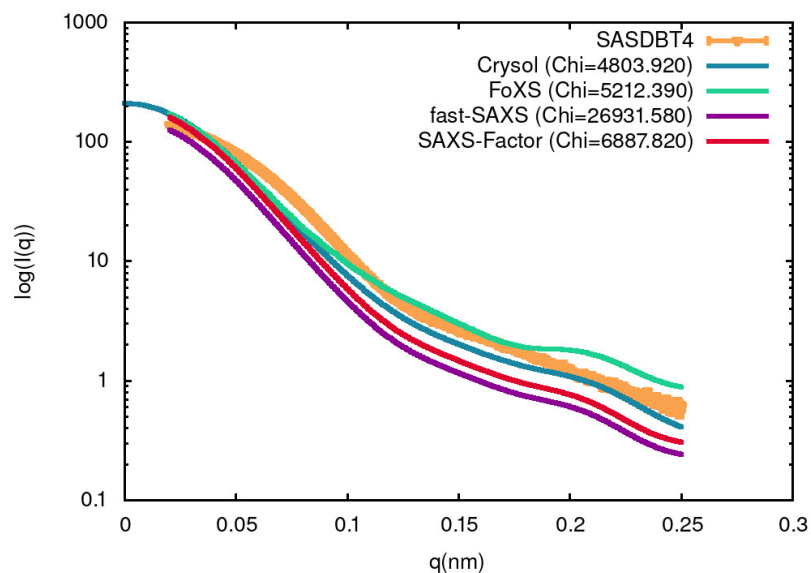
(a) SASDB76



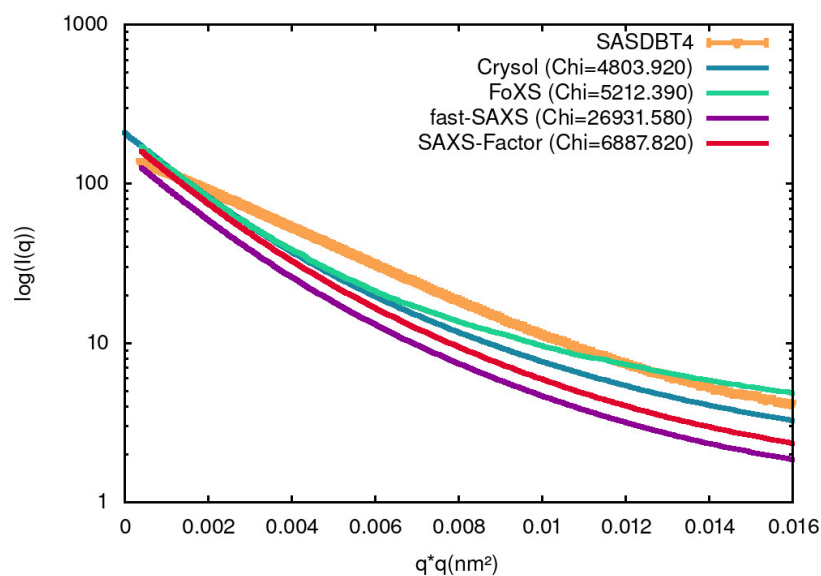
(b) SASDB76 guinier

Figura C.26: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDB76.

Fonte: Autoria Própria.



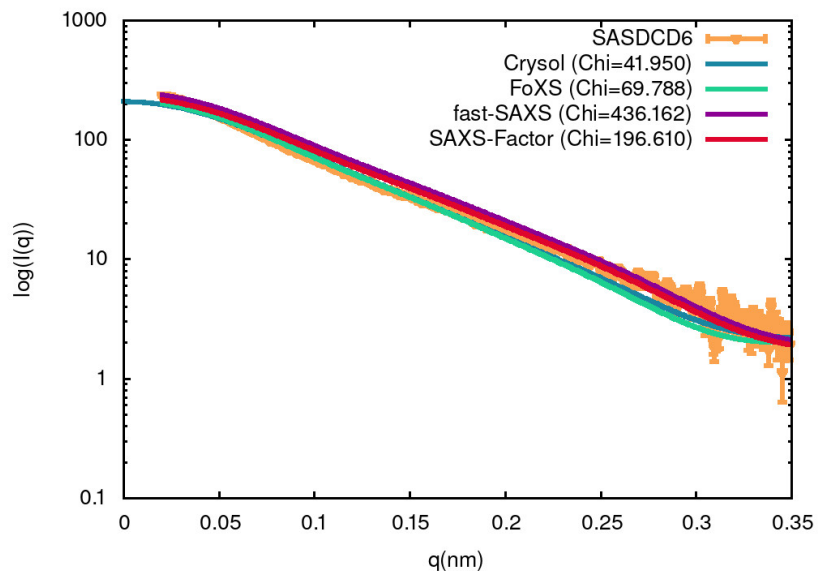
(a) SASDBT4



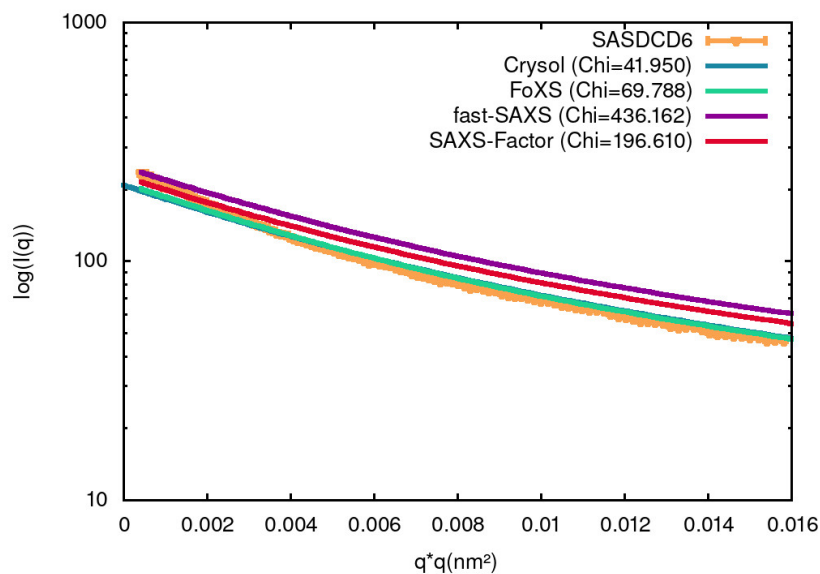
(b) SASDBT4 guinier

Figura C.27: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDBT4.

Fonte: Autoria Própria.



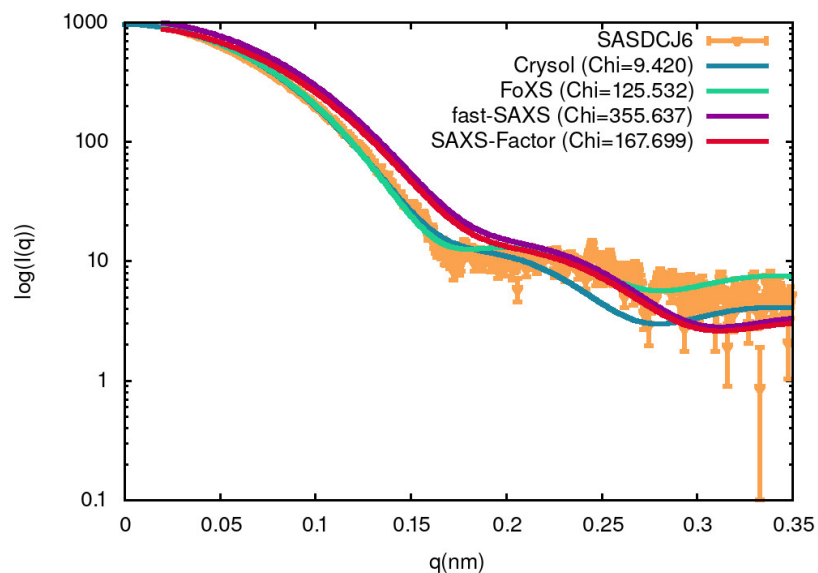
(a) SASDCD6



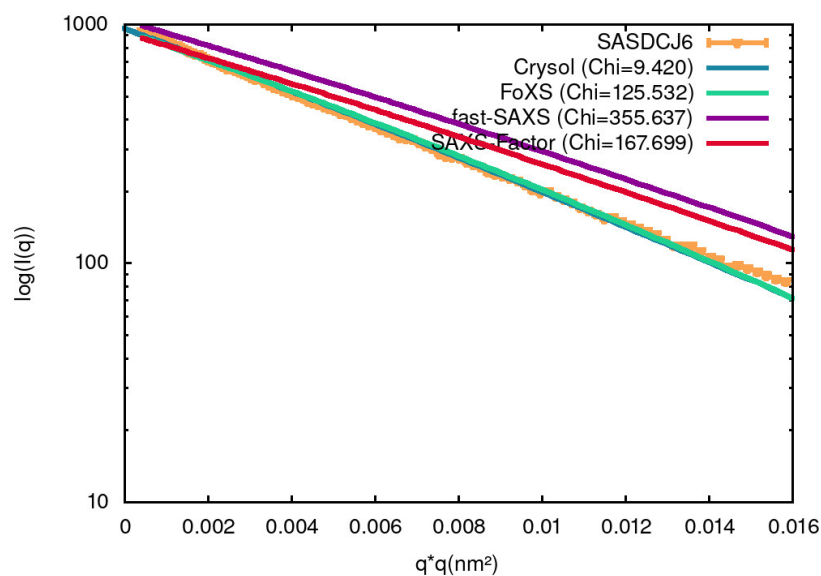
(b) SASDCD6 guinier

Figura C.28: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDCD6.

Fonte: Autoria Própria.



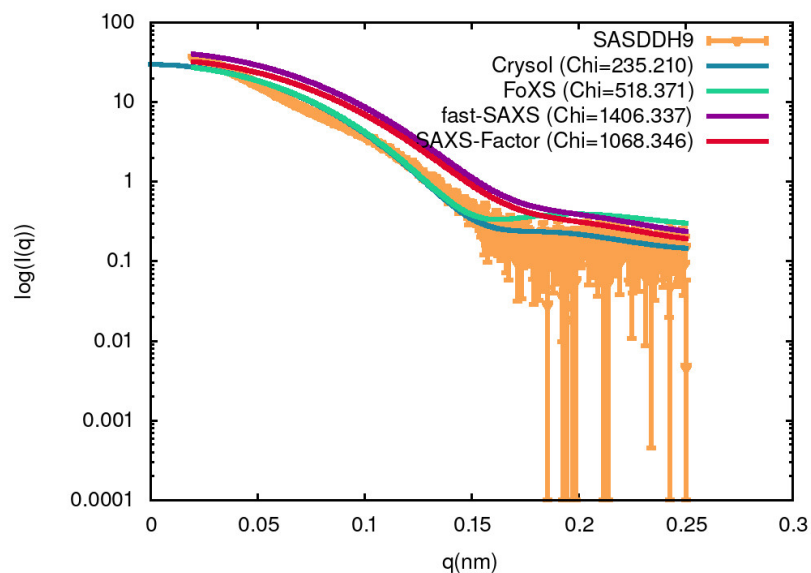
(a) SASDCJ6



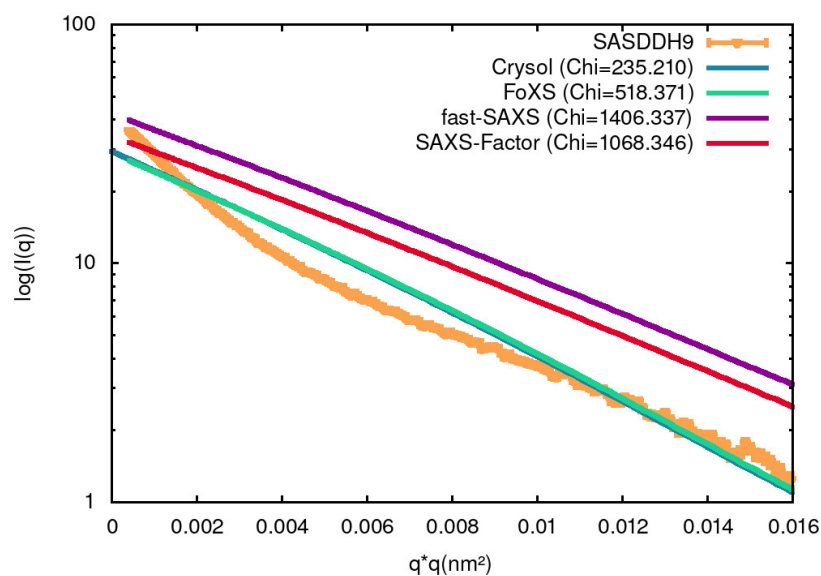
(b) SASDCJ6 guinier

Figura C.29: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDCJ6.

Fonte: Autoria Própria.



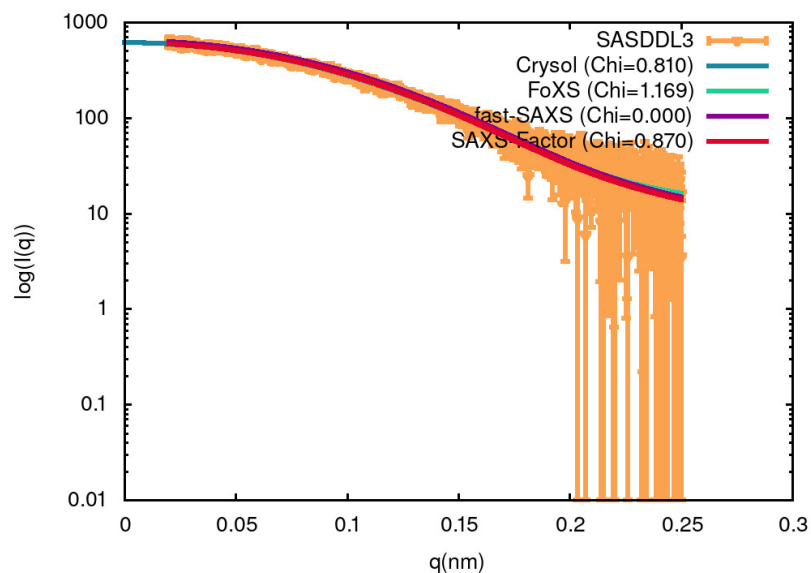
(a) SASDDH9



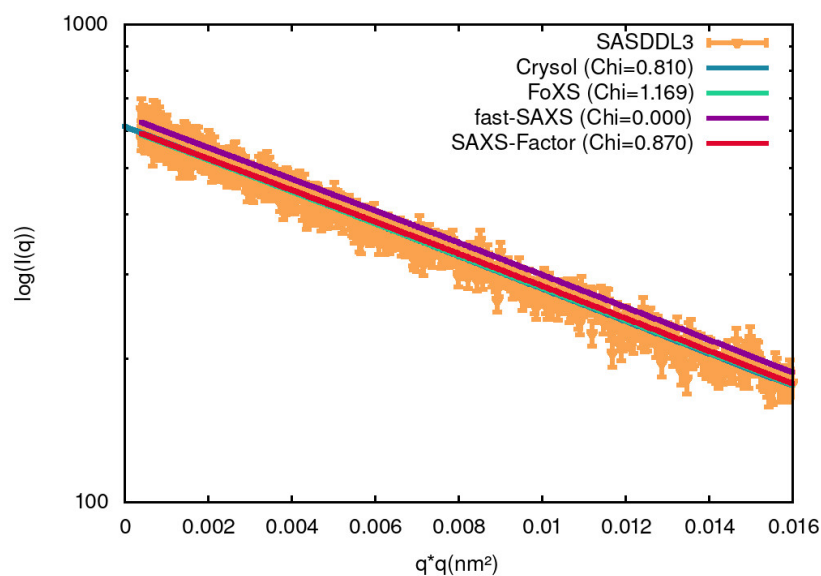
(b) SASDDH9 guinier

Figura C.30: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDDH9.

Fonte: Autoria Própria.



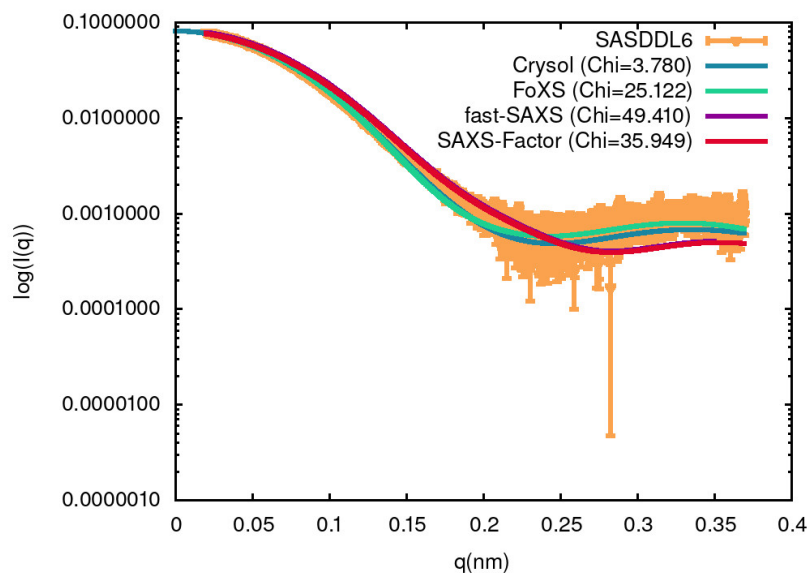
(a) SASDDL3



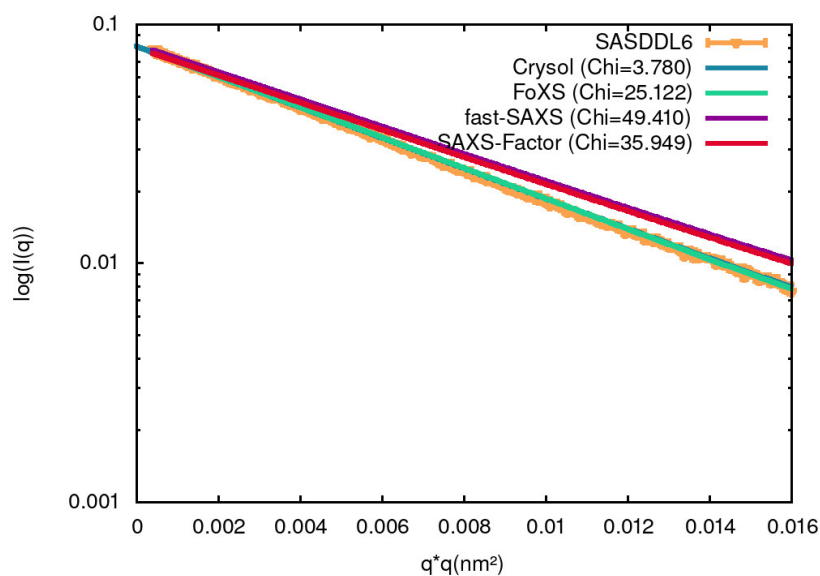
(b) SASDDL3 guinier

Figura C.31: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDDL3.

Fonte: Autoria Própria.



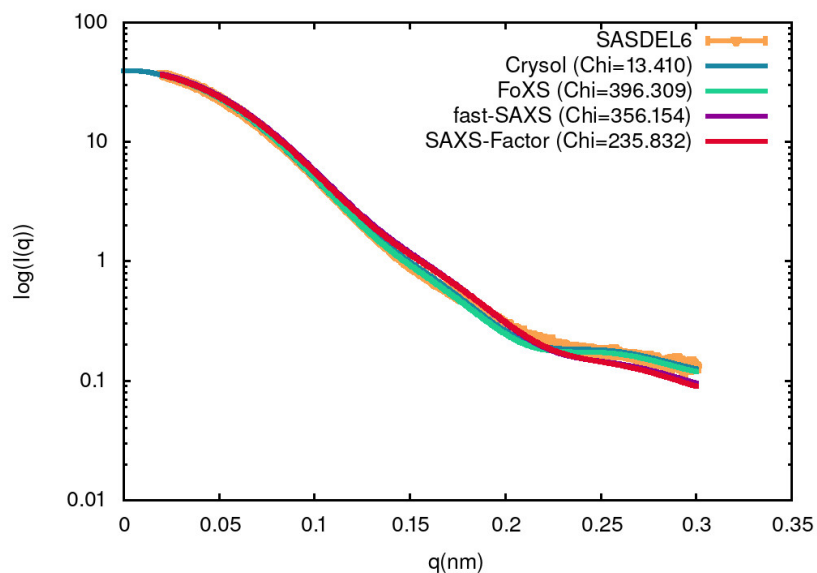
(a) SASDDL6



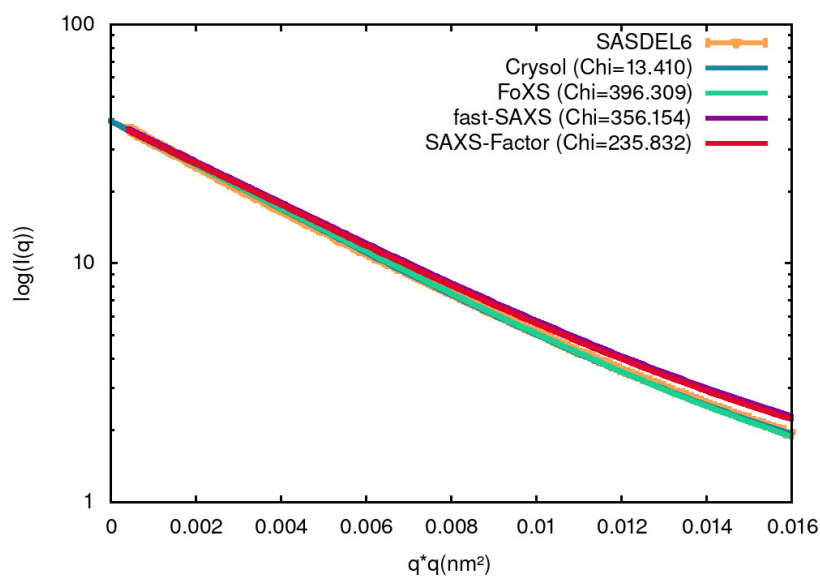
(b) SASDDL6 guinier

Figura C.32: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDDL6.

Fonte: Autoria Própria.



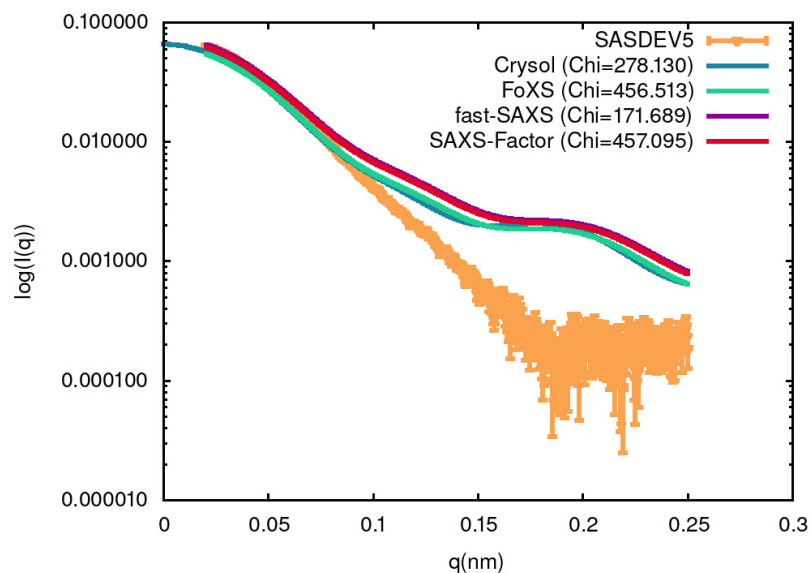
(a) SASDEL6



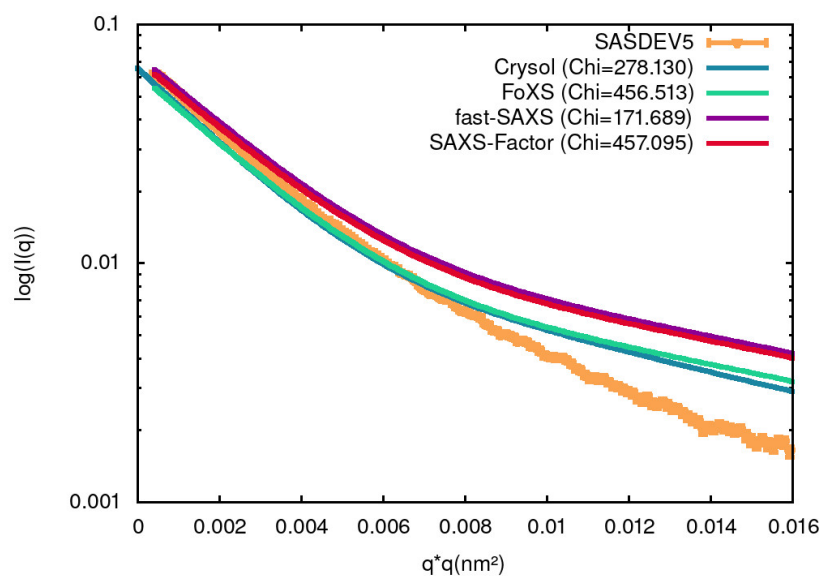
(b) SASDEL6 guinier

Figura C.33: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDEL6.

Fonte: Autoria Própria.



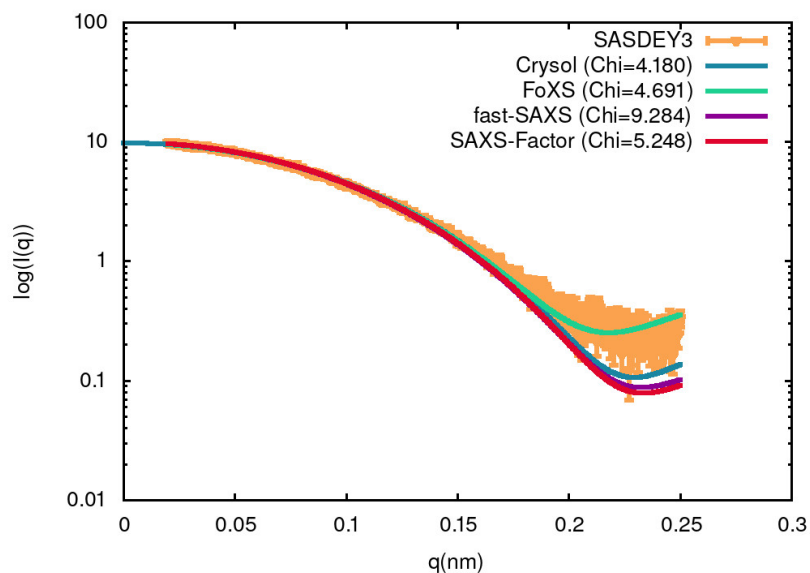
(a) SASDEV5



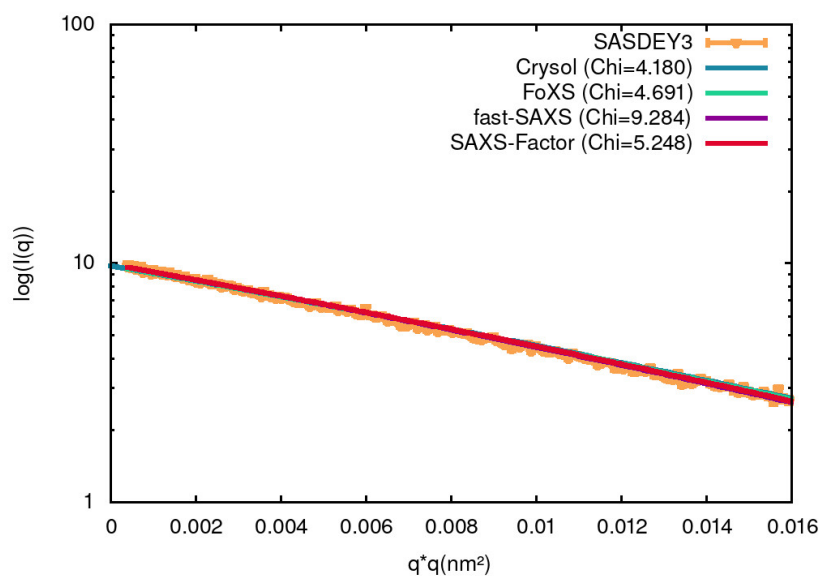
(b) SASDEV5 guinier

Figura C.34: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDEV5.

Fonte: Autoria Própria.



(a) SASDEY3



(b) SASDEY3 guinier

Figura C.35: Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDEY3.

Fonte: Autoria Própria.