

Jenifer Nicoletti

Estrutura dos subdomínios de
diversas sorcalbuminas na presença de ligantes
variando-se o pH, por espalhamento de raios X a baixo ângulo



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

1910001119



Jenifer Nicoletti

**ESTRUTURA DOS SUBDOMÍNIOS DE DIVERSAS SORO
ALBUMINAS NA PRESENÇA DE LIGANTES, VARIANDO-
SE O pH, POR ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXO
ÂNGULO**



T 1.119/02

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

ORIENTADOR: PROF. DR. JOHNNY RIZZIERI OLIVIERI

São José do Rio Preto - SP

1998



Aos meus pais:

Fábio Nicoletti (*in memoriam*)

Maria Rosena Sana



Este trabalho recebeu o apoio financeiro da:

CAPES
FAPESP
CNPq



Agradecimentos

Ao Professor Doutor Johnny Rizzieri Olivieri pela orientação, confiança e estímulo. Pela compreensão, apoio e amizade quando muito precisei.

Ao Professor Doutor José Ramon Beltran Abrego pela colaboração, ensinamentos, estímulo e amizade.

Ao Professor Doutor Walter F. Azevedo Jr. pelo valioso auxílio, pelas sugestões e pela camaradagem durante o tempo em que trabalhamos no mesmo local.

Aos professores Marcelo, Márcio, José Rugiero e Elói por estarem sempre dispostos a esclarecerem dúvidas, pela atenção dedicada e pela amizade.

À todo o corpo docente do Departamento de Física pelos ensinamentos transmitidos, pela atenção e amizade, e por permitirem o uso dos equipamentos e dos laboratórios.

Ao meu amigo Giovanni pelo companheirismo, estímulo e solidariedade em momentos difíceis; pela amizade e pela união em momentos de tensão ou de alegria.

Aos companheiros de SAXS, Giovanni, João Ricardo e Weber pela amizade, compreensão e ajuda durante toda a realização deste trabalho.

À todo o grupo do laboratório de raios X, em especial Walter, Fernanda, Leandra, João Ricardo e Giovanni, pelo clima de amizade, descontração e

união compartilhado durante este último ano.

*Aos meus colegas de pós graduação pelo companheirismo e amizade:
Adriana, Alexandre Teso, Alexandre Guerzoni, André, Benatti, Bernadete,
Cecília, Dulcinéia, Fábio, Fátima, Fernanda, Flávio, Giovanni, Gláucia, João
Ricardo, Leandra, Mac giver, Milton, Murilo, Norma, Ocimar, Osmar, Raquel,
Renato, Sandra, Selma e Uderlei.*

*Aos funcionários Barbosa, Paulinho, Ilva, D. Cida, Toninha e Zezé pela
acessoria necessária à realização deste trabalho e pela amizade.*

*Aos meus ex professores e amigos: Álvaro, César, Valmir e, em especial,
José Ricardo, pelos conhecimentos e experiências transmitidos, pela força e
incentivo para que eu fizesse o mestrado.*

*À todos os meus amigos e amigas que me deram apoio, carinho, e
compreenderam as minhas ausências.*

Às minhas amigas Katiúscia e Sandra pela amizade, companhia e afeto.

*Aos meus irmãos (Rejane, Ana Maria, Fábio, Cesar, Franklin e Jefferson)
pelo carinho e força que sempre me deram.*

*À minha mãe pelo seu amor infinito, carinho e compreensão; pela sua
preocupação e suas orações.*

Ao meu pai pela força, estímulo e coragem que sua lembrança me trás.

A Deus por tudo que tem me permitido conseguir.

À CAPES, FAPESP e CNPq por financiarem este trabalho.

SUMÁRIO

Índice de figuras	
Índice de tabelas	
Lista de símbolos utilizados	
Resumo	
Abstract	
1 - Introdução	1
2 - Estudo da proteína Soro Albumina	4
2.1 - Aspectos gerais	4
2.2 - Estrutura primária	5
2.3 - Estrutura tridimensional	9
2.4 - Propriedades físicas e formas	11
3 - Difração de raios X	15
3.1 - Introdução	15
3.2 - Produção de raios X	16
3.3 - Absorção de raios X	18
3.4 - Espalhamento de raios X	19
3.4.1 - Espalhamento Thomson	20
3.4.2 - Espalhamento Compton	21
4 - Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)	22
4.1 - Considerações gerais.....	22
4.2 - Espalhamento por uma partícula fixa	23
4.3 - Espalhamento por uma partícula móvel	27
4.4 - Lei de Porod	31
4.5 - Lei de Guinier	31
4.6 - Função Distribuição de Distâncias e Raio de Giração.....	33
5 - Materiais e Métodos experimentais	35

5.1 - Técnica de SAXS	35
5.1.1 - Equipamentos	35
5.1.2 - Sistema de colimação	37
5.1.3 - Calibração do detetor	38
5.1.4 - Estabilidade do feixe de raios X	41
5.1.5 - Perfil do feixe	42
5.2 - Métodos de análise dos dados experimentais	44
5.2.1 - Preparação de amostras	44
5.2.2 - Normalização das curvas de espalhamento experimentais.....	45
5.2.3 - Extrapolação para diluição infinita	48
5.2.4 - Informações contidas numa curva de SAXS	50
5.2.5 - Interpretação dos dados de SAXS.....	51
6 - Métodos computacionais.....	52
6.1 - Método das Transformadas Indiretas de Fourier - ITP	52
6.1.1 - Estimativa da dimensão máxima da partícula.....	60
6.1.2 - Estimativa do número de funções Splines.....	61
6.2 - Programa MULTIBODY	63
6.2.1 - Modelos estruturais	64
7 - Resultados experimentais	65
7.1 - Observações.....	65
7.2 - Resultados da albumina de cavalo com ligantes mas essencialmente livre de globulina no pH 7,0	66
7.2.1 - Intensidades de espalhamento, correções e normalizações.....	66
7.2.2 - Gráficos de Guinier	70
7.2.3 - Eliminação do “background”	72
7.2.4 - Intensidade de espalhamento corrigida.....	73
7.2.5 - Função $P(r)$ e R_g pelo método integral	75
7.3 - Resultados das albuminas de cavalo, de porco e de coelho	77

Índice de figuras

Figura 2.1: diagrama da estrutura primária da albumina	6
Figura 2.2: localização de algumas regiões de ligação na albumina humana	7
Figura 2.3: modelo “space-filling” do domínio II da albumina e uma molécula de palmitato	9
Figura 2.4: visão estereoscópica da molécula de albumina humana	10
Figura 2.5: visão estereoscópica dos domínios II e III da albumina humana	11
Figura 2.6: modelos estruturais para a soro albumina humana propostos por Olivieri e Craievich.....	14
Figura 3.1: espectro típico de radiação de raios X	17
Figura 4.1: esquema de uma partícula fixa e um feixe de raios X incidindo segundo a direção do vetor unitário $\vec{S}_0$	24
Figura 4.2: definição do vetor $\vec{S}$ do espaço recíproco	25
Figura 4.3: volume $v(\vec{r})$	29
Figura 5.1: sistema do equipamento de SAXS	35
Figura 5.2: sistema de colimação Kratky	38
Figura 5.3: esquema do posicionamento do detetor em relação ao feixe incidente e ao porta amostra	39
Figura 5.4: curva de calibração do detetor	40
Figura 5.5: gráficos da estabilidade do feixe de raios X	41
Figura 5.6: perfil da largura do feixe de raios X	42
Figura 5.7: perfil do comprimento do feixe de raios X	43
Figura 5.8: curva característica de espalhamento do lupolen	46
Figura 5.9: afastamento da lei de Porod	50
Figura 6.1: esquema ilustrativo do método ITP	58



Figura 6.2: influência do espalhamento “background” e dos efeitos de concentração função $P(r)$	60
Figura 6.3: efeitos da escolha dos valores para a dimensão máxima	62
Figura 7.1: intensidades de espalhamento para albumina de cavalo sem globulina, no pH 7,0.....	67
Figura 7.2: intensidades de espalhamento normalizadas para albumina de cavalo sem globulina, no pH 7,0.....	68
Figura 7.3: intensidades com as concentrações normalizadas e extrapoladas à concentração zero, no pH 7,0	69
Figura 7.4: regiões de Guinier e de Porod	70
Figura 7.5: esquema de um gráfico de Guinier	71
Figura 7.6: gráfico $J(q) \times q$ e gráfico de Guinier.....	72
Figura 7.7: gráfico de Porod	73
Figura 7.8: gráfico $I(q) \times q$	74
Figura 7.9: gráfico de Guinier, após correção pelo ITP.....	75
Figura 7.10: função $P(r)$ (albumina de cavalo sem globulina no pH 7,0)	76
Figura 7.11: gráficos $J(q) \times q$ (pH 5,0)	79
Figura 7.12: gráficos $J(q) \times q$ (pH 7,0)	80
Figura 7.13: gráficos de Guinier (pH 5,0)	81
Figura 7.14: gráficos de Guinier (pH 7,0)	82
Figura 7.15: gráficos $I(q) \times q$ (pH 5,0)	83
Figura 7.16: gráficos $I(q) \times q$ (pH 7,0)	84
Figura 7.17: gráficos de Guinier (pH 5,0)	85
Figura 7.18: gráficos de Guinier (pH 7,0)	86
Figura 7.19: funções $P(r)$ (pH 5,0)	87
Figura 7.20: funções $P(r)$ (pH 7,0)	88
Figura 7.21: comparação entre curvas teóricas e experimentais no pH 5,0	89
Figura 7.22: comparação entre curvas teóricas e experimentais no pH 7,0	90

Figura 8.1: modelo 1: SACg, pH 5,0	92
Figura 8.2: modelo 2: SACag, pH 5,0	93
Figura 8.3: modelo 3: SAP, pH 5,0	94
Figura 8.4: modelo 4: SACo, pH 5,0	95
Figura 8.5: modelo 5: SACg, pH 7,0	96
Figura 8.6: modelo 6: SACag, pH 7,0	97
Figura 8.7: modelo 7: SAP, pH 7,0	98
Figura 8.8: modelo 8: SACo, pH 7,0	99
Figura 9.1: modelo de Olivieri e Craievich, da SAH, pH 5,0	102
Figura 9.2: modelo de Olivieri e Craievich, da SAH, pH 7,0	103
Figura 9.3: modelo de Olivieri e Craievich, da SAB, pH 7,0	104

Índice de tabelas

Tabela 1: regiões de ligação da albumina7

Tabela 2.1: resumo das propostas para a forma da albumina13

Tabela 5.1: concentrações das amostras de albumina45

Tabela 7.1: resultados para os R_{gs} 78

Tabela 7.2: resultados para as $D_{máxs}$ 78

Tabela 9.1: comparação entre os valores dos R_g 100

Tabela 9.2: comparação entre os valores dos R_g experimentais com os dos
modelos105

Símbolos utilizados

SAXS: espalhamento de raios X a baixo ângulo (small angle X-ray scattering)

LV: luz visível.

RX: raios X

u.a.: unidades arbitrárias.

CuK α : linhas características K α do cobre.

D.S.P.: detetor sensível à posição.

P(r): função distribuição de distâncias.

R_g: raio de giração.

D_{max}: máxima dimensão da partícula.

ITP: tranformações indiretas da função p(r).

SACg: Soro Albumina de Cavalo sem globulina

SACag: Soro Albumina de Cavalo sem ácidos graxos

SAP: Soro Albumina de Porco sem globulina/ ácidos graxos

SACo: Soro Albumina de Coelho sem globulina

SAH: Soro Albumina Humana

SAB: Soro Albumina Bovina



Resumo

A albumina é uma das proteínas mais abundantes encontradas no plasma sanguíneo, é estável, muito solúvel e ácida. Seu ponto isoelétrico está ao redor do pH 4,8; seu peso molecular é aproximadamente 66500 e suas principais funções são o transporte e armazenamento de numerosas substâncias como ácidos graxos, bilirrubina, metais, etc., e cujo desempenho é possível graças às suas maleabilidade e flexibilidade, atribuíveis à sua estrutura com pontes de dissulfeto ligando apenas partes próximas da cadeia polipeptídica. Há uma grande homologia entre as diversas albuminas, humana, bovina, de cavalo, de rato, etc. As estruturas moleculares das soro albuminas são comparáveis em muitos aspectos, mas as seqüências de aminoácidos não são idênticas, muito embora a maioria dos ligantes acima citados liga-se a várias albuminas igualmente bem.

Neste trabalho, fizemos um estudo da variação conformacional de diversas albuminas: de cavalo, porco e coelho. Sabemos que as albuminas encontram-se ligadas a muitos ligantes diferentes, mas as que foram por nós estudadas são essencialmente livres, algumas de ácidos graxos e outras de globulina. Trabalhamos em dois valores de pH (5,0 e 7,0). Nosso objetivo foi avaliar, pela técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), as mudanças conformacionais ocorridas nas albuminas, comparando com a albumina humana e com a bovina, encontrando parâmetros geométricos e estruturais, como raio de giração, função distribuição de distâncias e máxima dimensão de proteínas. Estamos propondo modelos, obtidos a partir de simulações computacionais, para as várias conformações observadas nas albuminas em estudo. Verificamos que, além das mudanças ocorridas na forma das moléculas, houve uma diminuição nos valores dos raios de giração das mesmas, com o aumento do pH, o que, juntamente com os modelos, pode estar indicando uma contração, ou empacotamento da molécula.

Abstract

Albumin is one of the most common protein present in the blood plasma, it is stable, very soluble, and acidic. Its isoelectric point is around 4.8, molecular weight is approximately 66500 and its main functions are transport and storage of several molecules such as, fatty-acid, bilirrubine, metals, etc... and its function is mainly due to its flexibility. Such flexibility is due to disulfide bridges binding only close portions of the protein structure. There is a great homology among several albumins from humans, bovines, horses, rats, etc... The molecular structures of albumins are similar in several features, but the amino acid sequence are not identical, however the majority of their ligands have similar specificity.

In the present work it was studied the conformational changes of several albumins: from horse, pig and rabbit. It is known that albumins can bind to several different ligands, however the albumins studied in the present work are essentially free of fatty-acids or globulins. The present study was performed at two different pH's (5.0 and 7.0). Our goal was evaluate the conformational changes occurred, using the Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) technique. Using the SAXS technique, several geometrical and structural parameters such as radius of gyration, function of distance distribution, and maximum dimension of the protein were obtained. It was proposed theoretical models, obtained from computer simulations, for several observed conformations for the albumins under study.

It was verified a reduction in the radius of gyration values of the molecules with a raise of pH, which, together with the models, may be indicating a contraction or closure of the protein.

1 - Introdução

Em trabalho realizado por Olivieri e Craievich (1995), utilizando a técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) para o estudo de soro albuminas, verificou-se que as mesmas sofrem grandes variações conformacionais com a mudança de pH, em concordância com outros estudos feitos por técnicas diversas presentes na literatura (página 13, tabela 2.1).

A albumina é uma das proteínas mais abundantes encontradas no plasma sangüíneo, seu peso molecular é ao redor de 66500 e suas principais funções são o transporte e armazenamento de numerosas outras substâncias, tais como ácidos graxos, bilirrubina, metais, drogas, etc. É um dos principais componentes do plasma no estabelecimento da pressão osmótica do sangue. O desempenho dessas funções é possível graças à sua maleabilidade e flexibilidade, o que lhe confere uma grande importância biológica. Daí o incentivo cada vez maior ao seu estudo, visto que há grande facilidade de se encontrar albuminas isoladas e purificadas (Peters, 1985).

O espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) tem sido muito aplicado em macromoléculas em solução, o que possibilita o seu estudo em condições o mais próximas possíveis de seu ambiente biológico. Possui uma teoria bem desenvolvida que permite obter vários parâmetros geométricos e estruturais, como raio de giração, volume, superfície, função distribuição de distância e máxima dimensão de proteínas; ou seja, nos dá o formato da molécula (Glatter e Kratky, 1982; Guinier e Fournet, 1955). Tem sido aplicada para uma variedade de sistemas de interesse biológico, como, por exemplo, as pesquisas da estrutura de soro lipoproteínas humanas em solução (Tardieu *et al*, 1976), estudo das albuminas humana e bovina (Olivieri e Craievich, 1995), análise conformacional do complexo Crotoxina (Santos e Abrego, 1998), mudanças



conformacionais de fosfolipases em solução (Brognaro e Abrego, 1995), etc.

Recentemente, estudos por meio de SAXS da enzima alostérica ACTase de *Escherichia coli*, em comparação com análises cristalográficas, possibilitaram que se provasse que os movimentos das subunidades durante transição dos estados T→R em solução são significativamente maiores que nos cristais. Grandes diferenças são observadas entre a estrutura quaternária no cristal e em solução no estado R (Svergun *et al*, 1997).

Uma deficiência desta técnica, especialmente se comparada com a cristalografia por difração de raios X, é a sua baixa resolução, ou pequena ordem de magnitude na resolução atômica. Sua principal vantagem é a possibilidade de se variar facilmente as condições físicas e químicas e explorar transições estruturais. Além disso, nem sempre é possível obter cristais das macromoléculas biológicas. É evidente que a informação obtida do espalhamento a baixo ângulo concerne somente à forma exterior e não da estrutura da molécula; maiores informações a nível atômico podem ser obtidas com difração de proteínas cristalizadas. Os graus de dificuldades apresentados pelos dois métodos são diferentes, a cristalografia requer uma considerável quantia de trabalho, tanto na preparação de bons cristais como na interpretação de resultados, enquanto que uma investigação a baixo ângulo de uma solução pode ser considerada mais simples, apesar das dificuldades também encontradas.

Quanto aos possíveis danos que a radiação pode causar às proteínas devido à absorção de raios X pela amostra sabemos que SAXS somente estuda a morfologia das macromoléculas biológicas, independente de suas atividades funcionais. Então, uma queda na atividade somente poderá ser detectada por SAXS se for acompanhada por uma significativa mudança na sua morfologia (Pilz, 1979).

Muitos estudos recentes de espalhamento a baixo ângulo de raios X, ou



neutrons, mostram um acréscimo na acessibilidade e utilidade da técnica de SAXS, para estudo de conformação biomolecular e interações em solução como função de propriedades biológicas numa extensa faixa de dimensões. O desenvolvimento de fontes e instrumentação tem produzido ganho no fluxo de raios X ou neutrons em amostras, e tem possibilitado experimentos mais rápidos em amostras a mais baixas concentrações. Exemplo dessas fontes são os síncrotrons e equipamentos com ânodos rotatórios cada vez mais potentes (Trehwella, 1997).

As variações conformacionais da molécula de albumina ocorrem em função do pH, mas essas variações podem ocorrer mesmo em pH constante, como nos organismos vivos, só que nesses casos são induzidas pela presença de diferentes ligantes, segundo dados bibliográficos (Kragh-Hansen, 1981a).

Neste trabalho, faremos um estudo do comportamento de diversas albuminas: de cavalo, porco e coelho, na presença de ligantes, em dois valores de pH, tendo por objetivo avaliar, pela técnica de SAXS, as suas variações conformacionais em comparação com a humana e a bovina livre de ligantes, propondo também modelos, obtidos a partir de simulações em computador, para as várias conformações observadas nas albuminas em estudo.

A albumina, como vimos anteriormente, liga-se facilmente a ácidos graxos, como palmitato, oleato, entre outros, mas como são moléculas pequenas comparadas a ela espera-se que não haja mudanças significativas nos valores dos raios de giração ou tamanho da molécula, nos estudos de SAXS. A presença de ligantes induz à mudanças conformacionais, que podem ser verificadas através de modelos gerados a partir das funções distribuição de distâncias.

Temos também por objetivo aprender a técnica de SAXS e, entender e dominar o uso dos programas computacionais utilizados na interpretação e análise dos resultados experimentais.



2.2 - Estrutura primária

A albumina humana é uma proteína composta de uma única cadeia polipeptídica, com 585 aminoácidos. A sequência completa de aminoácidos da soro albumina humana foi publicada simultaneamente em 1975 por Brown *et al.* e Meloun *et al.* É caracterizada pelo pequeno conteúdo de triptofano e metionina e alto conteúdo de cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e arginina.

O conteúdo de glicina e isoleucina é menor do que na maioria das proteínas. A alta carga total, potencialmente 185 íons por molécula no pH 7,0, somada à sua solubilidade e às muitas pontes de dissulfeto contribuem para sua estabilidade.

Contém 17 pares de cisteínas vizinhas em toda a sequência. A quantidade de pontes de dissulfeto formada confere às albuminas uma forte estabilidade, mas a sua localização permite uma maleabilidade e flexibilidade muito grandes, o que possibilita a existência de várias conformações em diferentes valores de pH. Apresenta, também uma cisteína livre, que possivelmente deve estar protegida da oxidação devido à forma da cadeia (Brown, 1975).

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



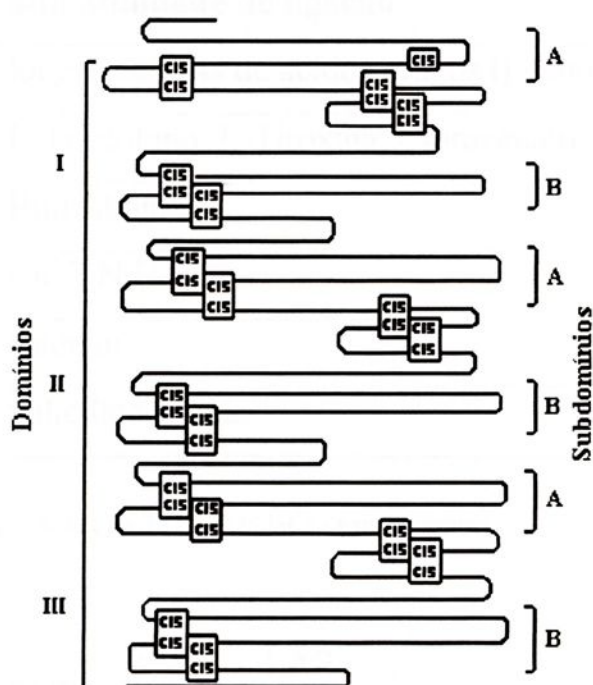


Figura 2.1: diagrama da estrutura primária da albumina.

Há pelo menos seis sítios de ligação na molécula de albumina; esta proposta é baseada na revisão da literatura descrevendo ligações competitivas de ligantes com alta afinidade aos sítios de ligação (Kragh-Hansen, 1981a); um esquema desta proposta é mostrado na tabela 1 e alguns sítios de ligação estão representados na figura 2.2 abaixo.

Um grande número de drogas carregadas negativamente ou neutras são ligadas à albumina com comparáveis constantes de associação (10^4 a 10^5 M^{-1}), como por exemplo Warfarin, Salicilato, Fenilbutazona, Novobiocina, etc.

Apesar do fato de que a albumina carrega uma carga líquida negativa no pH fisiológico, é frequentemente proposto que ela liga-se às moléculas carregadas negativamente em preferência às com carga positiva, apesar de ligar-se também a várias drogas carregadas positivamente (com constantes de associação comparáveis à maioria das negativas), por exemplo Quinino, Procaína, Lidocaína, etc. A albumina liga-se também a vários compostos inorgânicos como: Cl^- , SCN^- , Cu^{++} , Ni^{++} , Mn^{++} , etc. (Kragh-Hansen, 1981a)

Sítio de ligação	alta afinidade de ligação
1	longas cadeias de ácidos graxos (palmitato, oleato, linoleato)
2	L-Triptofano, L-Tiroxina, Clorazepato, p-Iodobenzoato
3	Bilirrubina
4	Cu^{++} , Ni^{++}
5	Haemin
6	Salicilato, Sulfas

Tabela 1: esquema de regiões de ligação localizadas na soro albumina

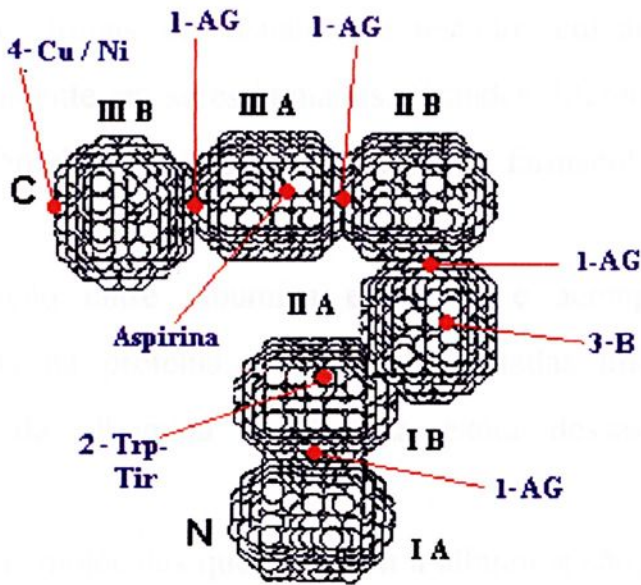


Figura 2.2: localização de algumas regiões de ligação na Albumina Humana, em relação aos domínios e sub-domínios. N e C são os terminais amino e carboxil, respectivamente.

Há uma grande homologia entre as diversas albuminas, humana, bovina, de cavalo, de rato, etc. As configurações espaciais das soro albuminas são comparáveis em muitos aspectos, mas as seqüências de aminoácidos não são idênticas, muito embora a maioria dos ligantes liga-se a várias albuminas igualmente bem (Brown, 1976; Mac Lachlan e Walker, 1977).

A seqüência de aminoácidos e a estrutura molecular da albumina de cavalo já foi determinada. Comparações da estrutura primária de albumina de cavalo com humana e bovina revelam 76,1% e 73,9% de identidade, respectivamente. Estudos cristalográficos de soro albumina de cavalo revelam dois sítios de ligação para 2,3,5-ácido triiodobenzóico nos sub-domínios IIA e IIIA idênticos aos da soro albumina humana (Ho *et al*, 1993). A homologia entre as albuminas humana e bovina e entre humana e de rato é de 80%, com 63% de resíduos conservados entre as três (Peters, 1985).

Muitos estudos já foram feitos com ligações de pequenas moléculas à várias espécies de albuminas, o que é de suma importância visto que os efeitos *in vivo* de novas drogas são usualmente testados em animais antes de serem testados clinicamente em seres humanos. Grandes diferenças em ligações com a soro albumina podem contribuir na atividade farmacológica (Kragh-Hansen, 1981a).

A interação entre albumina e ligante é acompanhada de mudanças conformacionais na proteína. Devido às limitadas informações da estrutura tridimensional da albumina a natureza exata dessas mudanças não está determinada.

In vivo, as moléculas que se ligam à albumina são, principalmente, longas cadeias de ácidos graxos alifáticos como oleato, palmitato, linoleato e estearato. Entretanto, a proteína é também capaz de se ligar com relativa alta afinidade a ácidos graxos com cadeias curtas e médias.

Uma razoável comparação entre os tamanhos das moléculas de albumina e de palmitato pode ser vista na figura 2.3, conforme modelo proposto por Brown e Shockley (1982).



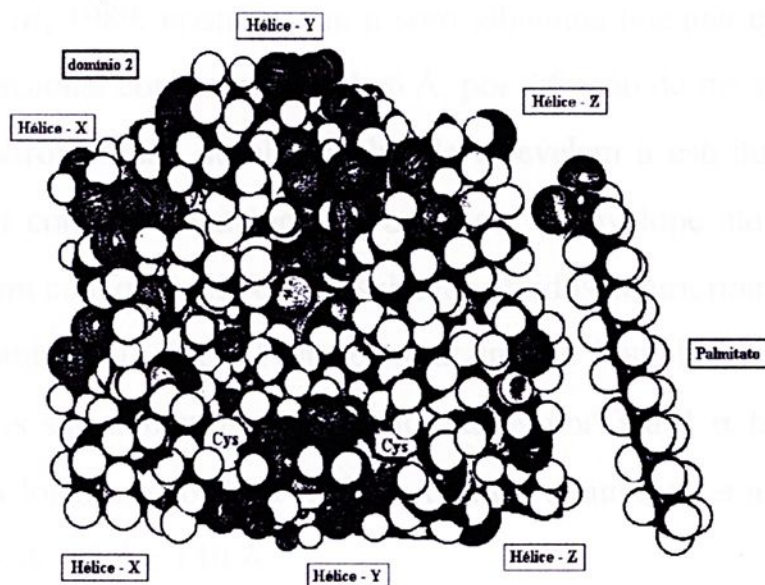


Figura 2.3: modelo "space-filling" do domínio II da albumina bovina e uma molécula de palmitato, de Brown e Shockley.

Quanto à desnaturação, albumina muda reversivelmente sob as condições normais nas quais muitas proteínas são desnaturadas. No entanto, pode ocorrer desnaturação irreversível, com dimerização ou eventual agregação se, por exemplo, for submetida a prolongado e repetido aquecimento. Essas mudanças ocorrem com estados intermediários, os quais talvez indicam o envolvimento das pontes de dissulfeto ou domínios (Aoki *et al*, 1973).

2.3 - Estrutura tridimensional

Squire *et al*, 1968, medindo a velocidade de sedimentação e revendo estudos publicados de dispersão dielétrica, sedimentação, SAXS e microscopia eletrônica, concluíram que a forma da molécula era de um elipsóide de revolução prolato, com eixos de tamanhos 40 Å e 140 Å.

Carter *et al*, 1989, cristalizaram a soro albumina humana e resolveram a estrutura tridimensional com resolução de 6 Å, por difração de raios X. Os mapas de densidade eletrônica são de alta qualidade e revelam a estrutura como uma proteína globular com predominância de α hélice. O envelope molecular para a proteína estava em concordância com resultados obtidos anteriormente por outros métodos. Os domínios I, II e III são estruturalmente homólogos e cada um é composto de dois sub-domínios (A e B) formados por 3 a 4 α hélices ligadas entre si por uma longa seção de α hélice. Agora a albumina seria um elipsóide oblato com eixos de 40 Å e 140 Å.

Em estudos mais recentes, Carter *et al*, (1990), propuseram um diferente arranjo quaternário para os 6 sub-domínios com resolução de 4 Å.

A ligação da cauda (sub-domínios IIB, IIIA e IIIB) à cabeça (sub-domínios IA, IB e IIA) da molécula difere do originalmente proposto. Os sub-domínios assumem uma forma de coração (figura 2.4).

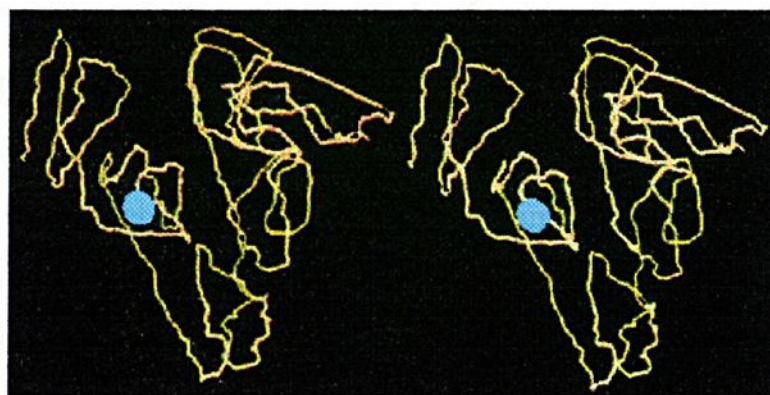


Figura 2.4: visão estereoscópica da molécula de albumina humana, que apresenta o formato de um coração, conforme proposta de Carter *et al*, 1990.

Os sub-domínios I, II e III podem ser superpostos (figura 2.5), o que é consistente com a homologia na sequência de aminoácidos.

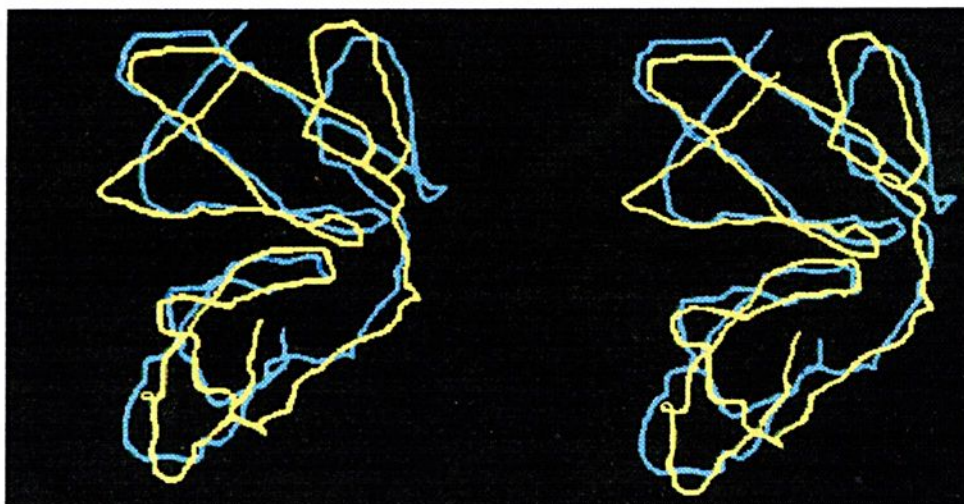


Figura 2.5: visão estereoscópica dos domínios II (amarelo) e III (azul) superpostos para ilustrar a homologia estrutural.

A largura da molécula do terminal amino ao terminal carboxil é de aproximadamente 82 Å e a máxima dimensão da molécula do ápice do coração aos domínios terminal amino e carboxil é de aproximadamente 83 Å e 70 Å, respectivamente. A profundidade da molécula é de aproximadamente 30 Å.

3.4 - Propriedades físicas e formas

Gurd e Rothgeb, 1979, notaram que o nome proteína pode ter relação com o deus grego Proteus, como *proteios* “na posição primária”. Pois proteínas, como Proteus, podem mudar de forma e tamanho de acordo com as circunstâncias. Sua flexibilidade é atribuível à localização das pontes de dissulfeto, as quais ligam apenas partes próximas da cadeia polipeptídica.

Flexibilidade é vista como a habilidade em expandir e desdobrar-se rápida e reversivelmente sob condições de desnaturação e na rapidez com que pode sofrer várias transições.

A molécula de albumina não é uniformemente carregada ao longo de seu comprimento. A carga elétrica líquida em pH 7,0 é de $-9e$, $-8e$ e $+2e$ nos domínios I, II e III. Pode-se dizer, então, que a cabeça, ou terminal amino (região I), é altamente negativa, enquanto o terminal carboxil (região III) é aproximadamente neutro.

O peso molecular pode ser determinado pelo conhecimento preciso da seqüência de aminoácidos. O resultado obtido foi de 66439 (Peters, 1985).

Uma importante característica da albumina é sua habilidade de ligar-se a grande variedade de materiais biológicos. A maioria das associações envolve interações hidrofóbicas, sendo que a albumina tem grande flexibilidade em adaptar sua forma a do ligante.

Quanto à forma da molécula, existem diferentes propostas, variando conforme a técnica utilizada ou o pH em que se trabalhou, que podem ser vistas na tabela 2.1 abaixo. Observa-se que, por ser altamente flexível, essa molécula vai mudando sua forma com a variação do pH, o que foi verificado por estudos feitos com atividade óptica rotatória. A molécula encontra-se numa posição mais esticada, ou desenrolada, em torno do pH 2,7, passando pelo ponto de maior enrolamento ao redor do pH 4,3 e se tornando novamente mais desenrolada do pH 7,0 para cima.

A albumina foi estudada por diferentes técnicas por muitos autores, sendo que cada um deles tinha uma proposta para o pH em que trabalhou, mas não havia uma uniformidade que explicasse tantas formas diversas que a proteína assumia.



autor	pH	técnica	R _g (nm)	forma
Squire	5,2	sedimentação e outras		elipsóide prolato
Laggner	7,5 e 5,1 3,7	SAXS	3,2 3,8	elipsóide prolato ou prisma chato
Anderegg	4,6	SAXS	2,98	prisma reto paralelepípedo
Luzzatti	5,3	SAXS	3,06	elipsóide oblato ou prolato
Carter	5,2 7,2	cristais, estrutura 3D		coração
Olivieri (SAH)	3,0 4,5 5,0 7,0	SAXS	3,28 3,26 3,12 3,34	variável para cada pH
Olivieri (SAB)	3,0 4,5 7,0	SAXS	3,27 3,27 3,03	variável para cada pH

tabela 2.1: resumo das diversas propostas para a forma e raio de giração da albumina

Olivieri e Craievich, 1995, por espalhamento de raios X a baixo ângulo, propuseram um modelo baseado nos subdomínios, estudando as Soro Albumina Humana e Soro Albumina Bovina livres de ligantes, em diversos valores de pH. Encontraram valores para o raio de giração entre 31Å (pH 5,0) e 33,4 Å (pH 7,0) para a Soro Albumina Humana, mostrando que esta proteína encontra-se mais fechada perto do seu ponto isoelétrico e mais aberta para valores de pH próximos de 7,0. Os modelos propostos (figura 2.6) encontram-se em concordância com a estrutura determinada cristalograficamente para Soro Albumina Humana (Carter *et al.*,1990) e para Soro Albumina de Cavalo (Ho *et al.*,1993), os quais sugerem

que a estrutura da albumina entre os valores de pH 5,0 e 7,0 pode ser aproximada para um prisma triangular equilátero de lado 80 Å e uma espessura de 30 Å.

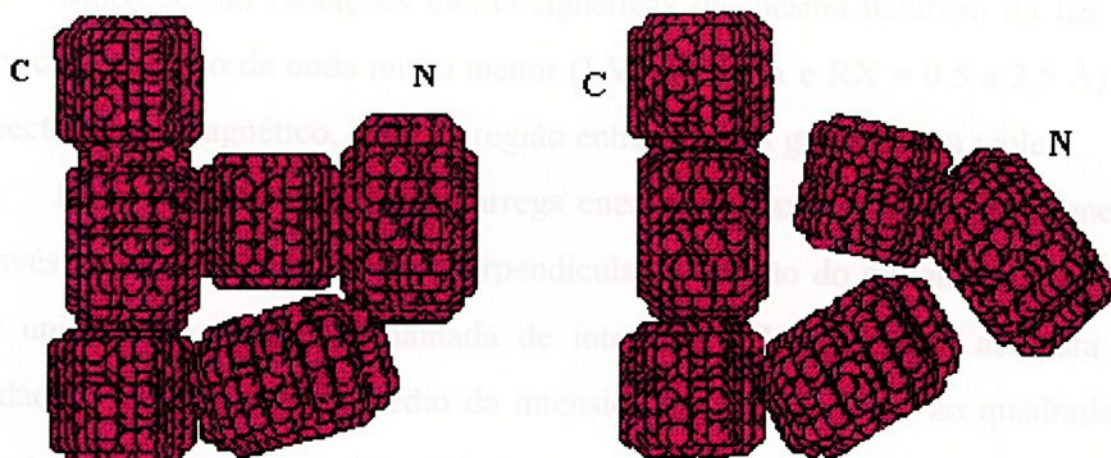


Figura 2.6: modelos estruturais para a albumina humana, nos valores de pH 5,0 e 7,0, propostos por Olivieri e Craievich (1995). N e C indicam os terminais amino e carboxil, respectivamente.

3 - Difração de raios X

3.1 - Introdução

Raios X são radiações eletromagnéticas da mesma natureza da luz mas com comprimento de onda muito menor ($LV = 6000 \text{ \AA}$ e $RX = 0,5 \text{ a } 2,5 \text{ \AA}$). No espectro eletromagnético, ocupa a região entre os raios gama e ultra violeta.

Radiação eletromagnética carrega energia e a taxa de fluxo dessa energia através de uma unidade de área perpendicular à direção do movimento da onda, por unidade de tempo, é chamada de intensidade **I**, em escala absoluta sua unidade é $\text{J/m}^2/\text{s}$. O valor médio da intensidade é proporcional ao quadrado da amplitude da onda, isto é, $\langle I \rangle \approx A^2$.

Supondo um feixe monocromático de raios X, seguindo na direção **x**, tem-se associado a ele um campo elétrico **E** na direção **y**, por exemplo, e um campo magnético **H** na direção **z**. O campo elétrico **E**, plano polarizado, pode ser expresso pela equação:

$$E = A \text{ sen } 2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - \nu t \right) \quad (3.1)$$

onde:

A: amplitude da onda,

λ : comprimento da onda,

ν : frequência.

Sendo: $\lambda = \frac{c}{\nu}$, **c** é a velocidade da luz no vácuo.

Uma carga elétrica acelerada irradia energia. A aceleração pode ser positiva ou negativa, e então a carga oscilando continuamente numa mesma posição média atua como fonte de radiação eletromagnética. Pela teoria clássica esta radiação é vista como onda.



De acordo com a teoria quântica a radiação é considerada como pacotes de partículas (quanta ou fótons). Cada fóton tem associado a ele uma quantia de energia $E = h\nu$, onde h é a constante de Planck.

3.2 - Produção de raios X

Raios X são produzidos quando uma partícula elétrica carregada, de suficiente energia cinética é rapidamente desacelerada. Usualmente são utilizados elétrons; a radiação é produzida num tubo de raios X, o qual contém uma fonte de elétrons e dois eletrodos de metal. A alta tensão aplicada, normalmente da ordem de 30000 a 50000 volts, entre esses eletrodos e rapidamente leva os elétrons para o ânodo, ou alvo, o qual é atingido com alta velocidade. No ponto de impacto há a produção de raios X que saem do tubo através de duas ou mais janelas no mesmo, as quais usualmente são de berílio, transparentes aos raios X.

A maior parte da energia cinética dos elétrons chocando-se com o alvo é convertida em calor, menos do que 1% é transformada em raios X.

O tubo de raios X consiste de um invólucro de vidro com vácuo que isola o ânodo e o cátodo. O cátodo é um filamento de tungstênio e o ânodo um alvo de metal, geralmente de cobre, molibdênio ou tungstênio, contido num bloco de cobre resfriado a água.

A corrente no tubo, isto é, o fluxo de elétrons no filamento, normalmente é da ordem de 10 a 100 mA.

Todo tubo de raios X tem uma potência máxima que não pode ser excedida sem danificá-lo; este limite é fixado pela quantidade de calor que pode ser dissipado pelo alvo, e é estabelecido pelo fabricante em termos de máxima corrente permitida no tubo (em mA) para uma dada voltagem (em kV).



Como a eficiência na produção de raios X é menos que 1% devido ao aquecimento do alvo, e é necessário se utilizar altas intensidades por várias horas de exposição, ocasionando uma maior produção de calor, uma solução é o uso de um tubo de ânodo rotatório, no qual a rotação contínua do ânodo permite que haja resfriamento do alvo além de um menor desgaste do mesmo, pois o feixe de raios X não incidirá sempre no mesmo local.

Quando os raios vindos do alvo são analisados vemos uma mistura de diferentes comprimentos de onda λ , e a variação da intensidade com o comprimento de onda depende da voltagem no tubo. Na figura 3.1 vemos os tipos de curvas obtidas. O espectro contínuo é devido à rápida desaceleração dos elétrons, os quais são desacelerados de forma diversa. Podem ser desviados pelos átomos do alvo perdendo sucessivamente sua energia cinética em frações ou podem ser parados num impacto, perdendo toda sua energia cinética imediatamente, originando os fótons de energia máxima, isto é, raios X de λ mínimo.

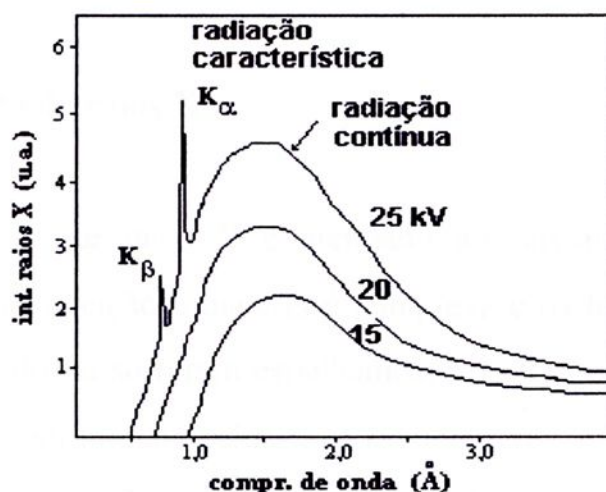


Figura 3.1: espectro típico de radiação de raios X.

Quando a tensão no tubo de raios X é elevada acima de um certo valor crítico, característico do metal do alvo, aparece bruscamente uma intensidade

máxima para certos comprimentos de onda, superpostas ao espectro contínuo, chamadas linhas características.

Somente as linhas K são úteis na difração de raios X, as linhas de comprimentos de onda maiores são facilmente absorvidas. Há várias linhas no conjunto K, mas somente as três de maior energia são observadas no trabalho normal de difração: $K_{\alpha 1}$, $K_{\alpha 2}$ e K_{β} .

A existência das linhas K_{α} é que tornam possível muitos experimentos de difração, pois estes requerem uso de radiação monocromática. Para isso o feixe atravessa um filtro feito de um material cuja aresta de absorção K situa-se entre os comprimentos de onda das linhas K_{α} e K_{β} do metal do alvo. O filtro absorverá razoavelmente as componentes K_{β} , mas reduzirá a intensidade das linhas K_{α} praticamente à metade do seu valor original.

Filtros são usados comumente na forma de folhas finas, e os mais usuais são de zircônio, níquel, ferro e manganês.

3.3 - Absorção de raios X

Um feixe de raios X é atenuado ao passar através da matéria. Esta interação entre radiação e matéria é complexa e os fótons que não aparecem no feixe transmitido ou sofreram espalhamento ou foram absorvidos. Fótons podem ser absorvidos por átomos pelo efeito fotoelétrico.

Se o fóton incidente tiver energia igual ou superior à energia de ligação de um elétron num átomo, pode ocorrer transferência da energia do fóton ao elétron e conseqüente ejeção do elétron, que é chamado de fotoelétron, cuja energia será a diferença entre a energia do fóton incidente e a energia de ligação. Após absorver um fóton, o átomo fica em estado excitado e pode voltar ao seu estado



fundamental emitindo, ou outro elétron ou fótons X, ambos de baixa energia, cujo comprimento de onda λ é característico do átomo excitado.

Considerando um feixe de raios X monocromático de intensidade I incidente sobre um material de espessura x , a intensidade do feixe transmitido é $I + dI$, com $dI < 0$. Experimentos mostram que dI é proporcional a I e a x .

Na forma diferencial, temos: $\frac{dI}{I} = -\mu dx$, μ é chamado coeficiente de absorção linear.

Integrando, temos: $I = I_0 e^{(-\mu x)}$, onde I é a intensidade do feixe transmitido e I_0 é a intensidade do feixe incidente.

O coeficiente μ é proporcional à densidade ρ , sendo que $\frac{\mu}{\rho}$ é uma constante do material e independe do estado físico, é chamada coeficiente de absorção de massa e é tabelado.

Então, a equação da intensidade pode ser reescrita como:

$$I = I_0 e^{(-\frac{\mu}{\rho}) \rho x} \quad (3.4)$$

3.4 - Espalhamento de raios X

A difração de raios X pela matéria resulta da combinação de dois fenômenos: o espalhamento por cada átomo individual e a interferência entre as ondas espalhadas por estes átomos.

O processo de espalhamento pode ser entendido da seguinte forma: os elétrons oscilam com a frequência dos raios X passando através dos objetos e emitindo ondas secundárias coerentes com a onda incidente e por conseguinte entre elas mesmas, as quais interferem umas com as outras.

Supondo uma partícula esférica com dois pontos espalhadores (elétrons); as ondas espalhadas dos dois pontos a um ângulo 2θ têm uma diferença de caminho de 2λ . Se nós considerarmos o espalhamento de todos os pontos, ou elétrons, a superposição das ondas com todas as fases possíveis conduzirá ao não espalhamento na direção 2θ como um resultado da interferência destrutiva. Mas se considerarmos o espalhamento a baixos ângulos as diferenças de fase serão pequenas e as ondas começarão a reforçar umas às outras. O espalhamento máximo será observado na direção do ângulo de espalhamento zero, onde todas as ondas estão exatamente em fase.

O espalhamento tem duas contribuições, coerente e incoerente. Se os fótons são desviados de seu curso sem perda de energia, temos a radiação espalhada coerente, ou espalhamento Thomson, que tem o mesmo λ do feixe incidente. Outros podem ser espalhados com uma diminuição na energia, isto é, com uma leve mudança dos λ , este é o espalhamento incoerente ou Compton.

3.4.1 - Espalhamento Thomson

Uma partícula carregada, sob efeito de uma onda de determinada frequência oscila numa frequência coerente com a mesma; esta oscilação implica numa re-emissão de luz. Este fenômeno é conhecido como espalhamento Thomson, abordado pelo eletromagnetismo clássico. Temos o espalhamento coerente de luz por um elétron livre, dado pela Fórmula de Thomson. (vide Anexo 1)

$$I_e = \frac{r_e^2}{r^2} I_0 \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \quad (3.5)$$

onde: I_e é a intensidade espalhada por um elétron,

I_0 é a intensidade incidente.



3.4.2 - Espalhamento Compton

Quando a energia do fóton incidente é muito superior à energia de ligação de um elétron num átomo, o elétron pode ser considerado como livre. Ocorre, então, colisão inelástica entre fóton e elétron: o elétron adquire energia e é projetado fora do núcleo, enquanto o fóton perde energia e muda de trajetória. Este fenômeno é conhecido como Efeito Compton.

O deslocamento Compton é dado pela equação:

$$\Delta\lambda(\text{\AA}) = \frac{2h}{m c} \sin^2 \theta = 0,048 \sin^2 \theta = 0,024(1 - \cos 2\theta) \quad (3.6)$$

Para efeitos de detecção e medida da energia do fóton esta interação é inconveniente pois, embora o elétron seja liberado com uma parte da energia, o fóton continua sua trajetória, podendo escapar do meio absorvedor. (Cullity, 1978; Guinier, 1963; Barbosa, 1998).

4 - Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

4.1 - Considerações gerais

Por que o uso de baixo ângulo?

A difração de raios X foi primeiramente utilizada para estabelecer a estrutura atômica de cristais, mas foram encontrando outras aplicações para esta técnica, como o estudo das imperfeições nos cristais, o tamanho de cristais e a estrutura de corpos amorfos. SAXS é um destes campos de aplicação de difração de raios X, e tem sido desenvolvido e utilizado desde 1930. A teoria de SAXS é semelhante à da difração, mas foram introduzidos conceitos inteiramente distintos daqueles costumariamente usados em difração, e os aspectos experimentais também são diferentes pois SAXS exige um aparato de laboratório específico, com câmaras e tubos especiais.

A relação fundamental que descreve a difração de raios X por cristais é dada por:

$$\lambda = 2d \sin\theta$$

O ângulo de difração, θ , varia inversamente com a distância entre os planos das redes de difração. Na maioria dos cristais os espaços observados nas redes são da mesma ordem de magnitude dos comprimentos de onda dos raios X geralmente usados, então os ângulos θ são usualmente grandes. Estas condições possibilitaram a descoberta do fenômeno da difração e seu aproveitamento no estudo de estruturas cristalinas.

O estudo de SAXS foi introduzido quando se precisou detectar grandes espaços nas redes, em certos minerais e moléculas complexas como altos polímeros e proteínas. Como a relação entre o ângulo de espalhamento e a distância entre dois centros espalhadores é inversamente proporcional, tornou-se necessário o uso de ângulos pequenos. Experimentalmente, foi observado que



certas amostras causam um intenso e contínuo espalhamento a ângulos da ordem de 2° sem produzir os usuais tipos de efeitos de difração de raios X. Normalmente em trabalhos de baixo ângulo usam-se ângulos variando de 2° a 5° .

Na difração usamos comprimentos de onda da ordem de $2\text{\AA}$, pois comprimentos de onda grandes são absorvidos por uma grande parte da matéria. As linhas mais freqüentemente usadas são as $\text{CuK}\alpha$ de $\lambda = 1,54\text{\AA}$.

Espalhamento de raios X a baixo ângulo é uma técnica muito usada para estudos das características estruturais de partículas de tamanho coloidal ou macromoléculas, pois são muito grandes comparadas ao comprimento de onda dos raios X. É caracterizado pelo inverso da relação entre o ângulo de espalhamento e tamanho da partícula: $2\theta = \frac{\lambda}{D}$, onde D é a dimensão máxima da partícula.

Raios X são espalhados por elétrons e SAXS é sempre observado quando existe inomogeneidade na densidade eletrônica das amostras.

Nos trabalhos de SAXS consideramos apenas o espalhamento coerente pois o espalhamento Compton pode ser negligenciado quando são envolvidos apenas ângulos pequenos.

4.2 - Espalhamento por uma partícula fixa

Consideremos agora dois centros espalhadores O e M_k e calculemos o espalhamento resultante numa dada direção definida pelo vetor unitário $\vec{S}_0$, como mostra a figura 4.1 abaixo. Esta radiação resulta da interferência das ondas espalhadas pelos pontos O e M_k . Assumimos que a mudança de fase ϕ devido ao espalhamento é a mesma para os dois átomos.



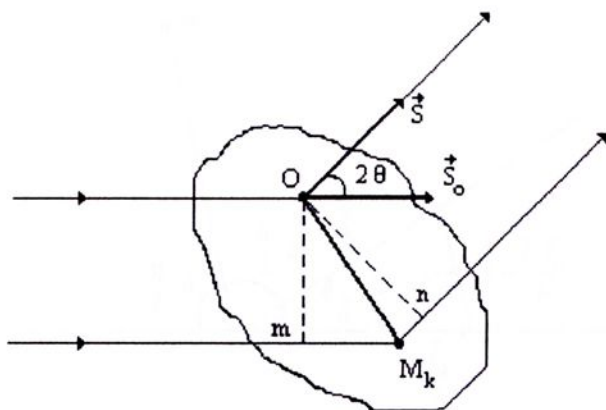


Figura 4.1: esquema de uma partícula fixa e um feixe de raios X incidindo segundo a direção do vetor unitário $\vec{S}_0$.

A diferença de fase entre as ondas emitidas depende das respectivas posições de O e M_k . A diferença de caminho para o raio vindo por M_k é dada por $\delta = m\vec{M}_k + \vec{M}_k n$, m e n são projeções de O nos raios que passam por M_k .

Nós definiremos as direções dos raios incidentes e espalhados por vetores unitários $\vec{S}_0$ e $\vec{S}$.

Vetorialmente:

$$m\vec{M}_k = \vec{S}_0 \cdot O\vec{M}_k$$

$$\vec{M}_k n = -\vec{S} \cdot O\vec{M}_k$$

$$\delta = -O\vec{M}_k (\vec{S} - \vec{S}_0) \quad (4.1)$$

A diferença de fase será então:

$$\varphi = \frac{2\pi \delta}{\lambda} = -2\pi O\vec{M}_k \frac{\vec{S} - \vec{S}_0}{\lambda} \quad (4.2)$$

O vetor $\vec{s} = \frac{\vec{S} - \vec{S}_0}{\lambda}$ é definido como vetor $\vec{s}$ do espaço recíproco.

Como mostra a figura 3.2, sua direção é a mesma de $O\vec{N}$, a qual bissecta o ângulo formado entre $\vec{S}$ e $-\vec{S}_0$. Seu comprimento é $s = \frac{2}{\lambda} \sin\left(\frac{\vec{S} - \vec{S}_0}{2}\right)$.

Por simplicidade chamaremos o ângulo de espalhamento $(\vec{S}, \vec{S}_0)$ de 2θ .

Mas $I(\mathbf{q}) = A(\mathbf{q}) A^*(\mathbf{q})$, então:

$$I(\vec{q}) = A_e^2(\vec{q}) \sum_k \sum_j \mathbf{f}_k \mathbf{f}_j \cos(\vec{q} \cdot [\mathbf{M}_k - \mathbf{M}_j]) \quad (4.8)$$

A intensidade espalhada por um elétron é :

$$I(\vec{q}) = A_e^2(\mathbf{q}) = \frac{r_e^2}{r^2} I_0 \left(\frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \right), \text{ e é função apenas do ângulo } \theta, \text{ isto é,}$$

da magnitude de $\mathbf{q}$.

Se a origem estiver no centro de simetria da partícula cada vetor $\mathbf{OM}_k$ terá um correspondente $-\mathbf{OM}_k$. Então:

$$A(\vec{q}) = \sum_k A_k = A_e(\vec{q}) \sum_k \mathbf{f}_k \cos(\vec{q} \cdot \mathbf{OM}_k) \quad (4.9)$$

Se considerarmos uma pequena partícula, o ponto $\mathbf{M}_k$ refere-se a um elemento de volume $d\mathbf{v}_k$, e o fator de espalhamento será: $\mathbf{f}_k = \rho_k d\mathbf{v}_k$, onde ρ_k é a densidade eletrônica nas vizinhanças do ponto $\mathbf{M}_k$.

A amplitude de espalhamento total pode ser escrita como:

$$\begin{aligned} A(\vec{q}) &= A_e(\vec{q}) \int_v \rho_k \cos(\vec{q} \cdot \mathbf{OM}_k) d\mathbf{v}_k \quad \text{ou} \\ A(\vec{q}) &= A_e(\vec{q}) \int_v \rho_k \exp[-i \vec{q} \cdot \mathbf{OM}_k] d\mathbf{v}_k \end{aligned} \quad (4.10)$$

O fator de estrutura da partícula é definido como a razão entre a amplitude total espalhada e a amplitude de radiação espalhada por um elétron. Então:

$$F(\vec{q}) = \frac{A(\vec{q})}{A_e(\vec{q})} = \int_v \rho_k \cos(\vec{q} \cdot \mathbf{OM}_k) d\mathbf{v}_k \quad (4.11)$$

Como a intensidade de espalhamento é o módulo da amplitude ao quadrado, usando $I_e(\mathbf{q}) = A_e^2(\mathbf{q})$, teremos:

$$I(\vec{q}) = |A(\vec{q})|^2 = I_e(\vec{q}) \cdot F^2(\vec{q}) \quad (4.12)$$

4.3 - Espalhamento por uma partícula móvel

Na maioria dos trabalhos de baixo ângulo, as partículas podem se movimentar. Este movimento pode ser descrito como a soma de translação e rotação. A translação não interfere na intensidade de espalhamento, somente a rotação afeta o cálculo da intensidade média.

Esta relação define a média do quadrado do fator de estrutura.

$$\overline{I(\vec{q})} = I_e(\vec{q}) \overline{F^2(\vec{q})} \quad (4.13)$$

Considerando que todas as orientações da partícula são igualmente prováveis, podemos calcular a média da função, $\cos(\vec{q} \cdot \vec{OM}_k)$. Chamando $\vec{OM}_k$ de $\vec{r}$ e o ângulo entre $\vec{q}$ e $\vec{OM}_k$ como φ , com os limites variando entre 0 e π radianos. A probabilidade deste ângulo estar contido entre φ e $\varphi + d\varphi$ é $\frac{1}{2} \sin \varphi d\varphi$. A média da função fase é, então:

$$\overline{\cos(\vec{q} \cdot \vec{r})} = \int_0^\pi \cos(\vec{q} \cdot \vec{r}) \frac{\sin \varphi}{2} d\varphi \quad (4.14)$$

Resolvendo a equação acima chegamos a “Fórmula de Debye”: (vide anexo2)

$$\overline{\cos(\vec{q} \cdot \vec{r})} = \frac{\sin(qr)}{qr} \quad (4.15)$$

Desta forma podemos rescrever a equação 4.11:

$$\overline{F(\vec{q})} = \int_v \rho_k \frac{\sin(qr)}{qr} dv_k \quad (4.16)$$

Para partículas centrossimétricas:

$$\overline{F(\vec{q})} = \sum_k f_k \frac{\sin(q|\vec{OM}_k|)}{q|\vec{OM}_k|} \quad (4.17)$$

Generalizando para partículas com distribuição contínua de pontos de espalhamento, temos:

$$\overline{F(\mathbf{q})} = \int_V \rho(\mathbf{M}_k) \frac{\text{sen}(\mathbf{q}|\mathbf{OM}_k|)}{q|\mathbf{OM}_k|} d\mathbf{v}_k \quad (4.18)$$

onde $\rho(\mathbf{M}_k)$ é a densidade eletrônica.

$$\text{Sendo } |\mathbf{OM}_k| = r \quad \text{e} \quad \int_r^{r+dr} \rho(\mathbf{M}_k) d\mathbf{v}_k = \bar{\rho}(r) 4\pi r^2 dr,$$

$$v = \frac{4}{3}\pi r^3 \quad \text{e} \quad dv = 4\pi r^2 dr$$

A equação 4.18 torna-se:

$$\overline{F(\mathbf{q})} = \int_0^\infty \bar{\rho}(r) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} 4\pi r^2 dr \quad (4.19)$$

Para partículas esfericamente simétricas, a densidade eletrônica de qualquer ponto depende somente da distância r deste ponto do centro da partícula e pode ser denotada por $\rho(r)$. Daí, da equação 4.19, temos:

$$\overline{F(\mathbf{q})} = \int_0^\infty \rho(r) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} 4\pi r^2 dr \quad (4.20)$$

Neste caso particular, a rotação da partícula não modifica a amplitude da radiação espalhada, logo:

$$\overline{F^2(\mathbf{q})} = \overline{F(\mathbf{q})}^2 = F^2(\mathbf{q}) \quad (4.21)$$

Considerando a partícula com um volume V , definida por uma densidade eletrônica $\rho(\mathbf{M}_k)$, teremos:

$$\overline{F^2(\mathbf{q})} = \int_V \int_V \rho(\mathbf{M}_k) \rho(\mathbf{M}_j) \frac{\text{sen}(\mathbf{q}|\mathbf{M}_k\mathbf{M}_j|)}{q|\mathbf{M}_k\mathbf{M}_j|} d\mathbf{v}_k d\mathbf{v}_j \quad (4.22)$$

Assumindo que $V = \text{constante}$ e $|\mathbf{M}_k\mathbf{M}_j| = r$

$$\overline{F^2(\mathbf{q})} = \int_{\mathbf{v}} \int_{\mathbf{v}} \rho(\mathbf{M}_k) \rho(\mathbf{M}_j) \frac{\text{sen}(\mathbf{qr})}{qr} d\mathbf{v}_k d\mathbf{v}_j \quad (4.23)$$

Em coordenadas esféricas centradas no ponto $\mathbf{M}_k$, o elemento de volume $d\mathbf{v}_j$ será: $d\mathbf{v}_j = r^2 d\omega dr$. Então, teremos a integral estendida somente para o volume V da partícula:

$$\overline{F^2(\mathbf{q})} = \int_{\mathbf{v}} \left\{ \rho(\mathbf{M}_k) \int_{\mathbf{v}} \rho(\mathbf{M}_j) \frac{\text{sen}(\mathbf{qr})}{qr} r^2 d\omega dr \right\} d\mathbf{v}_k \quad (4.24)$$

O ponto $\mathbf{M}_j$ é algum ponto na partícula situado a uma distância r do ponto $\mathbf{M}_k$, onde $\mathbf{OM}_j - \mathbf{OM}_k = \vec{r}$ com $|\vec{r}| = r$.

Estendendo para todo o espaço, a expressão acima ficará:

$$\overline{F^2(\mathbf{q})} = \int_{\mathbf{v}} \left\{ \rho(\mathbf{OM}_k) \int_0^\infty \int_0^{4\pi} \rho(\mathbf{OM}_k + \vec{r}) \frac{\text{sen}(\mathbf{qr})}{qr} r^2 d\omega dr \right\} d\mathbf{v}_k \quad (4.25)$$

sendo que:

$$\rho(\mathbf{OM}_k + \vec{r}) = \rho \quad \text{se o ponto } (\mathbf{OM}_k + \vec{r}) \text{ está dentro da partícula e} \\ = 0, \text{ se está fora dela.}$$

Fazendo a partícula sofrer um deslocamento $\vec{r}$ sobre si mesma, conforme a figura 4.3 abaixo:

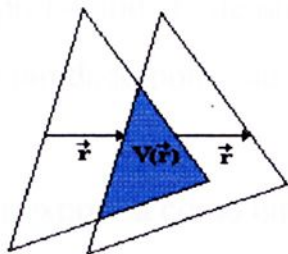


Figura 4.3: mostra o volume $V(\vec{r})$, que é o volume da partícula deslocada sobre si mesma segundo o vetor $\vec{r}$. $V(\vec{r})$ é função da direção do vetor $\vec{r}$.

Podemos escrever que a integral parcial

$$\int_v \rho(\vec{OM}_k) \rho(\vec{OM} + \vec{r}) d\vec{v}_k = \rho^2 V(\vec{r}) \quad e$$

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

Se nós introduzirmos o volume médio, definido pela relação:

$$\overline{V(r)} = \frac{1}{4\pi} \int_0^{4\pi} V(\vec{r}) d\omega \quad (4.27)$$

teremos:

$$\overline{F^2(\vec{q})} = \int_0^\infty \rho^2 \overline{V(r)} 4\pi \frac{\text{sen}(qr)}{qr} r^2 dr \quad (4.28)$$

A função característica $\gamma_o(r)$ é definida como:

$$\gamma_o(r) = \frac{\overline{V(r)}}{\overline{V(o)}} = \frac{\overline{V(r)}}{\overline{V}} \quad (4.29)$$

e introduzindo-a na equação 4.28, teremos:

$$\overline{F^2(\vec{q})} = \int_0^\infty \rho^2 \gamma_o(r) \overline{V} \frac{\text{sen}(qr)}{qr} 4\pi r^2 dr \quad (4.30)$$

$\gamma_o(r)$ representa a probabilidade de que um ponto, a uma dada distância r numa direção arbitrária de um dado ponto na partícula, também pertença à partícula.

$\gamma_o(r)$ pode ser expressa como um polinômio em r :

$$\gamma_o(r) = 1 - \frac{Sr}{4V} + \dots, \text{ onde } S \text{ é a superfície externa da partícula e } V \text{ o seu}$$

volume.

4.4 - Lei de Porod

$\overline{F^2(q)}$ para grandes valores de q pode ser obtido substituindo o valor de $\gamma_0(r)$ acima na expressão 4.30:

$$\overline{F^2(q)} = V\rho^2 \int_0^\infty \left(1 - \frac{Sr}{4V}\right) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} 4\pi r^2 dr \quad (4.31)$$

Resolvendo a equação acima teremos: (vide anexo 3)

$$\overline{F^2(q)} = \frac{2\pi\rho^2 S}{q^4} + \frac{V\rho^2 4\pi}{q^3} [A \cos(qR_1) + B \text{sen}(qR_1)] \quad (4.32)$$

Para valores grandes de q apenas o primeiro termo é relevante e teremos, então, a chamada **Lei de Porod**:

$$\overline{F^2(q)} = \frac{2\pi S \rho^2}{q^4} \quad (4.33)$$

onde S é a superfície específica da molécula.

$$\text{Como } I(q) = I_e \overline{F^2(q)}, \text{ teremos: } I(q) = \frac{I_e 2\pi S \rho^2}{q^4} \quad (4.34)$$

$$\text{Ou } I(q) = \frac{a S}{q^4}, \text{ com } a = I_e 2\pi \rho^2 \quad (4.35)$$

4.5 - Lei de Guinier

O valor de $\overline{F^2(q)}$ para valores pequenos de q é encontrado substituindo-se a seguinte expansão:

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

na equação (4.30):

$$\begin{aligned}\overline{F^2(q)} &= V\rho^2 \left[\int_0^\infty \gamma_0(r) 4\pi r^2 dr \left(1 - \frac{q^2 r^2}{6} + \frac{q^4 r^4}{120} + \dots \right) \right] \\ &= V\rho^2 \left[\int_0^\infty \gamma_0(r) 4\pi r^2 dr - \frac{q^2}{6} \int_0^\infty \gamma_0(r) 4\pi r^4 dr + \frac{q^4}{120} \int_0^\infty \gamma_0(r) 4\pi r^6 dr + \dots \right]\end{aligned}$$

Sabendo que:

$$V = \int_0^\infty \gamma_0(r) 4\pi r^2 dr \quad (4.36)$$

e ficando apenas com os dois primeiros termos da expansão, teremos:

$$\overline{F^2(q)} = V^2 \rho^2 \left[1 - \frac{q^2}{6V} \int_0^\infty \gamma_0(r) 4\pi r^4 dr \right] \quad (4.37)$$

Definimos o raio de giração (R_g) da partícula como:

$$R_g^2 = \frac{1}{2V} \left[\int_0^\infty \gamma_0(r) 4\pi r^4 dr \right] \quad (4.38)$$

Temos, então, a **Lei de Guinier**, válida somente para valores de q pequenos:

$$\overline{F^2(q)} = V^2 \rho^2 \left(1 - \frac{q^2 R_g^2}{3} \right) \quad (4.39)$$

Lembrando que $e^x = 1 + x + \frac{x^2}{2!} + \dots$, temos:

$$\overline{F^2(q)} = V^2 \rho^2 \exp\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (4.40)$$

A intensidade de espalhamento será:

$$I(q) = I_e V^2 \rho^2 \exp\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (4.41)$$

O valor de $\overline{F^2(\mathbf{q})}$ para $\mathbf{q} = 0$ é:

$$\overline{F^2(0)} = V \rho^2 \int_0^\infty 4\pi r^2 \gamma_0(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = V^2 \rho^2 \quad (4.42)$$

Este é o quadrado do número total de elétrons na partícula. Todas as ondas espalhadas estão em fase e as amplitudes são adicionadas.

4.6 - Função distribuição de distâncias ($P(\mathbf{r})$) e raio de giração (R_g)

Considerando o espalhamento por um elétron $I_e = 1$ e usando as equações (4.12) e (4.30), podemos escrever que:

$$I(\mathbf{q}) = \int_0^\infty \rho^2 \gamma_0(\mathbf{r}) V \frac{\text{sen}(\mathbf{qr})}{qr} 4\pi r^2 d\mathbf{r} \quad (4.43)$$

Definindo a função $P(\mathbf{r})$:

$$P(\mathbf{r}) = \rho^2 \gamma_0(\mathbf{r}) V 4\pi r^2 \quad (4.44)$$

temos:

$$I(\mathbf{q}) = \int_0^\infty P(\mathbf{r}) \frac{\text{sen}(\mathbf{qr})}{qr} d\mathbf{r} \quad (4.45)$$

e a transformada de Fourier inversa será:

$$P(\mathbf{r}) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty I(\mathbf{q}) qr \text{sen}(\mathbf{qr}) dq \quad (4.46)$$

A função $P(\mathbf{r})$ é muito útil pois contém toda a informação a respeito do meio espalhador. Representa o número de pares de elétrons separados pela distância $\mathbf{r}$, os quais são encontrados pela combinação de qualquer elemento de volume i com outro k da mesma partícula.

O raio de giração é definido em analogia com o raio de inércia da Mecânica, onde:

$$R_g^2 = \frac{I}{M}, \quad I: \text{momento de inércia e } M: \text{massa total do corpo.}$$

$$R_g^2 = \frac{1}{M} \int r^2 dm \quad (4.47)$$

O raio de giração é uma medida da distribuição de massa de um corpo em relação a um eixo de rotação. Quando ele é grande a massa do corpo está em média relativamente afastada do eixo.

$$R_g^2 = \frac{1}{M} \int_V r^2 \rho dv$$

Para uma esfera:

$$R_g^2 = \frac{\int_V \rho r^2 4\pi r^2 dr}{\int_V \rho dv} = \frac{\int_V \rho 4\pi r^4 dr}{\int_V \rho 4\pi r^2 dr} \quad (4.48)$$

Raio de giração é uma medida intuitiva para a extensão espacial da partícula. É a raiz quadrada média da distância dos elétrons ao centro de gravidade da molécula.

O R_g pode ser calculado a partir da $P(r)$ por:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^\infty P(r) r^2 dr}{2 \int_0^\infty P(r) dr} \quad (4.49)$$

Dessa forma o R_g pode ser calculado usando toda a curva de intensidade de espalhamento, ao contrário do método de Guinier que é válido somente para a região onde q tende a zero. (Guinier e Fournet, 1955).

5 - Materiais e Métodos experimentais

5.1 - Técnica de SAXS

5.1.1 - Equipamentos

Constitui-se de aparelho de raios X “RIGAKU DENKI” com ânodo rotatório de cobre ($\lambda_{K\alpha} = 1,54 \text{ \AA}$) potência 5,4 kW. Usa-se um filtro de Ni de 20 μm de espessura colocado na saída do tubo para eliminar em torno de 95% da radiação $K\beta$.

O alinhamento do feixe de raios X é feito com um sistema de colimação por blocos (Câmara de Kratky). A amostra é colocada num capilar de vidro Lyndemann de 1 mm de diâmetro interno e num porta amostra, o qual será inserido no equipamento frente a um tubo cilíndrico com um sistema de vácuo para diminuir o espalhamento e a absorção do raios X pelo ar. Esse local em que se coloca o porta amostra possui janelas de Kapton por onde passa o feixe de raios X.

No extremo do equipamento está o detector e sua eletrônica. A figura 5.1 mostra o esquema da montagem do equipamento.

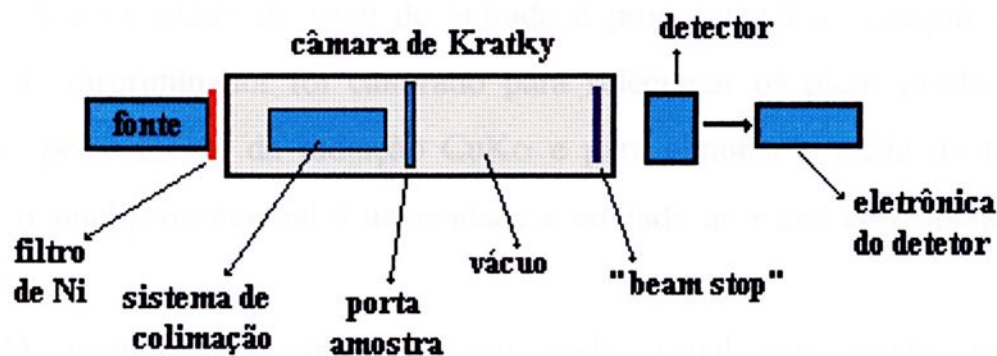


Figura 5.1: esquema do sistema do equipamento de SAXS

O detector está acoplado a um conjunto eletrônico composto de pré-amplificadores, amplificadores, analisador, discriminador, somador de ondas e um microprocessador para armazenamento dos dados, que estão ligados a um sistema computacional para o qual são finalmente transferidos os dados coletados.

Utilizamos um detector a gás sensível à posição para registrar as intensidades de espalhamento em 512 pontos angulares (canais) (Barbosa, 1994).

O detector é constituído por um filamento de quartzo, revestido de carbono, que está envolvido em uma mistura de gases argônio-CH₄, sob uma pressão de 75 PSI. O fóton espalhado pela amostra ioniza o gás que irá descarregar no filamento. O sinal gerado correspondente a um evento sobre a posição x ao longo de um fio de comprimento L é enviado para cada um dos lados do detector, chegando em tempos diferentes, pois o mesmo encontra resistências diferentes ao se propagar em direção às extremidades. Estes sinais são então amplificados e em seguida disparam um pulso. Como eles chegam em tempos diferentes ao conversor, a posição de entrada do fóton é determinada em função dessa diferença. A diferença de tempo é convertida proporcionalmente a uma voltagem, que é então enviada ao multicanal.

Junto a esse sistema, temos um mecanismo para medir a intensidade de cada pulso. Ele é composto de um dispositivo somador e discriminador de pulsos. A intensidade do sinal de entrada é proporcional à energia do fóton inicial. O discriminador foi calibrado para selecionar os picos produzidos no detector pelos fótons da radiação CuK α e para eliminar o ruído de fundo. A seguir, o sinal proporcional à intensidade é enviado ao canal correspondente no multicanal.

O número de contagens em cada canal vai sendo registrado simultaneamente por um microcomputador acoplado à eletrônica do detector.



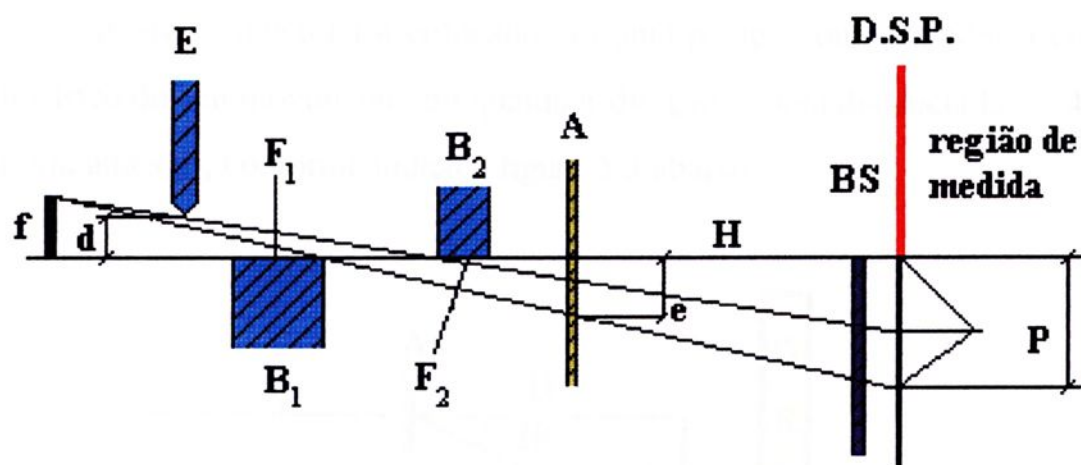
Como as amostras biológicas em solução apresentam geralmente um espalhamento muito pequeno, é necessário utilizar um tempo de exposição razoável ou aumentar a radiação incidente. Usamos a potência de nosso aparelho num limite de 5000W (50 kV e 100 mA) com o tempo de exposição de uma hora cada medida.

5.1.2 - Sistema de Colimação

Feixes incidentes de seção puntual produzem baixas intensidades de espalhamento, principalmente quando utilizamos macromoléculas em solução; por isso o sistema de colimação mais indicado é o que produz feixes de seção transversal na forma de retângulos de aproximadamente 10 cm e largura de 1,0 a 1,5 mm. O feixe por nós utilizado tem dimensões de 40 mm por 0,5 mm.

Para se obter esse tipo de geometria do feixe, é utilizado um sistema de blocos, também chamado de sistema de colimação Kratky, ou simplesmente “Câmara de Kratky”, conforme a figura 5.2 abaixo, com a vantagem de reduzir quase totalmente o espalhamento parasita e de se conseguir medidas em ângulos o mais próximos de zero.





Fonte de radiação: representada pela projeção f do foco no plano perpendicular ao eixo do feixe.

B_1 e B_2 : blocos com superfície polida.

E: bloco terminando em aresta.

D.S.P.: detector sensível à posição.

B.S.: "beam- stop" (aparador do feixe).

F_1 e F_2 : superfícies polidas dos blocos B_1 e B_2 .

H: plano principal definido pelas superfícies F_1 e F_2 .

d: fenda de entrada do feixe.

e: zona da amostra atingida pelo feixe.

P: perfil do feixe.

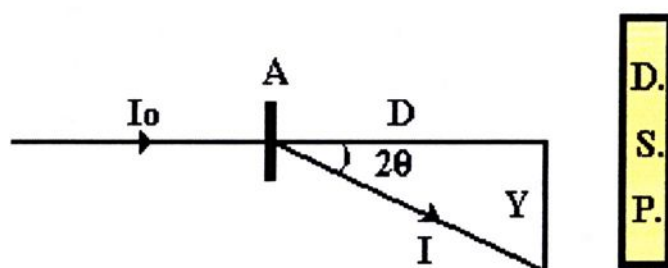
A: amostra.

Figura 5.2: desenho esquemático do sistema de colimação Kratky.

5.1.3 - Calibração do detector

É necessário que se faça um levantamento sobre a linearidade e sensibilidade do detector, e obter a relação entre ângulo de espalhamento e número de canal.

Primeiro, o detetor foi colocado em uma posição que permitiu o controle milimétrico do seu movimento em qualquer direção, a uma distância $D = 242 \text{ mm}$ do porta amostra, conforme indica a figura 5.3 abaixo.



I_0 : feixe incidente

A : porta amostra

I : feixe espalhado

D : distância da amostra ao detetor = 240 mm

D.S.P. : detetor sensível à posição

2θ : ângulo de espalhamento

Y : distância do canal zero ao canal de incidência do feixe

Figura 5.3: esquema do posicionamento do detetor em relação ao feixe incidente e ao porta amostra.

Depois, usando baixa intensidade para o feixe incidente (20 KV e 10 mA), filtros de Ni para atenuar o feixe, sem “beam-stop” e com tempo de coleta de 100 s, deslocamos o detetor ao longo do eixo vertical em intervalos de 5 mm medindo as intensidades, sempre no mesmo canal zero. A curva levantada pode ser observada na figura 5.4.

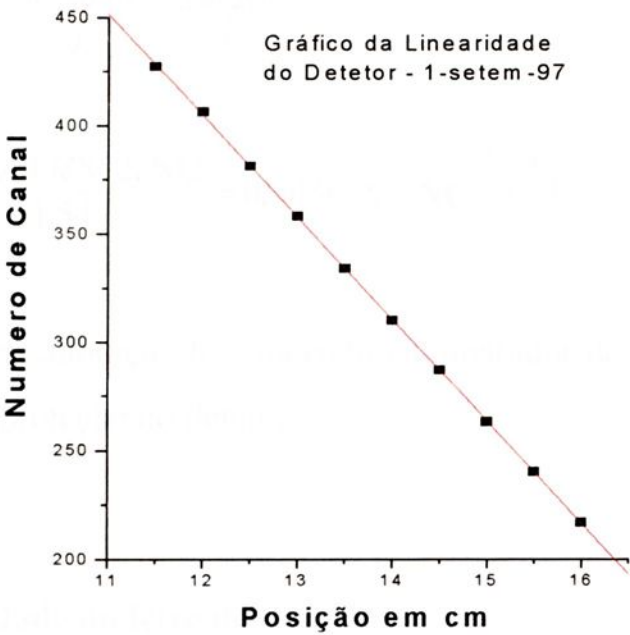


Figura 5.4: curva de calibração do detetor.

O coeficiente angular (α) da reta obtida nos fornece a relação:

$$\alpha = \frac{1}{K} \text{ canais / mm}$$

$$\frac{1}{K} = 4,701818 \text{ canais / mm} \text{ ou} \tag{5.1a}$$

$$K = 0,2126837 \text{ mm / canal} \tag{5.1b}$$

Podemos relacionar o número de canal (NC) com o ângulo de espalhamento 2θ :

$$2\theta \text{ (rad)} = \frac{Y}{D} = \frac{K \cdot NC}{D} \tag{5.2}$$

Então:

$$2\theta \text{ (rad)} = \frac{0,2126837 \cdot NC}{240} = 0,0008862 \cdot NC \tag{5.3}$$

$$2\theta \text{ (graus)} = \frac{0,0008862 \cdot 180 \cdot NC}{\pi} = 0,050774 \cdot NC \text{ (graus)} \tag{5.4}$$

Para $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$, $\text{sen}\theta \approx \theta$ e



$$q = 2\pi S = \frac{4\pi \text{sen}\theta}{\lambda} = \frac{2\pi(2\theta)}{\lambda} \tag{5.5}$$

Logo:

$$q = \frac{2\pi \cdot 0,0008862 \cdot \text{NC}}{1,54} = 0,003616 \cdot \text{NC} \left(\text{\AA}^{-1} \right) \tag{5.6}$$

Após esta calibração foi colocado um aparador de feixe (“beam-stop”) no canal zero para proteção do detetor.

5.1.4 - Estabilidade do feixe de raios X

É importante que o feixe de raios X tenha uma boa estabilidade. Para verificar isso foram feitas medidas com polietileno (lupolen) em intervalos regulares, durante sete horas, com tempo de medida de 100s. O resultado foi satisfatório pois verificamos uma boa estabilidade, conforme a figura 5.5 abaixo.

Gráficos da estabilidade do feixe de raios-X

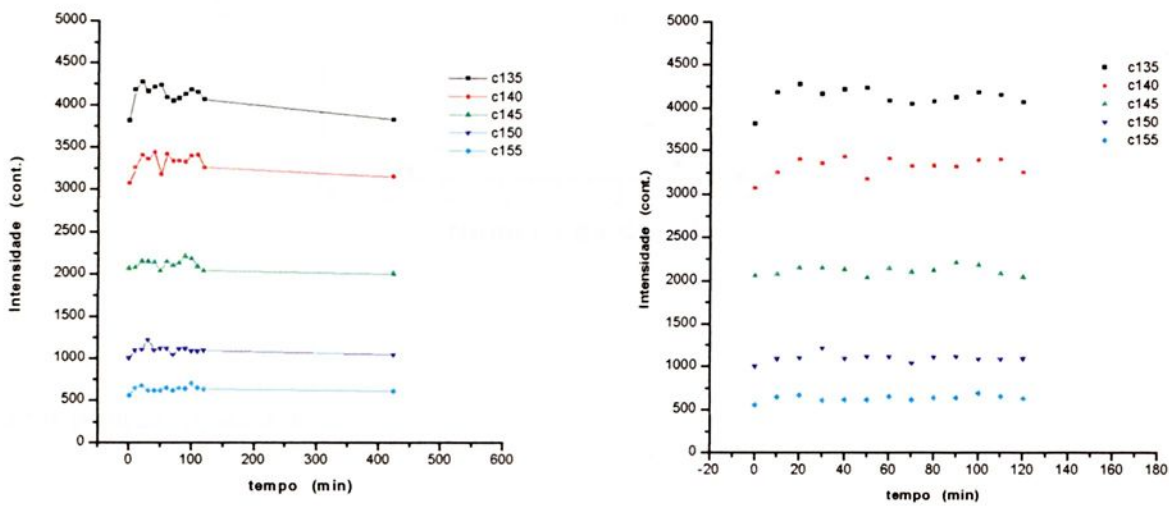


Figura 5.5: gráficos para verificação da estabilidade do feixe de raios X (c= nº de canal).

5.1.5 - Perfil do Feixe

A teoria de SAXS foi desenvolvida para um feixe puntual, mas o perfil do feixe utilizado por nós, como já vimos, é linear e infinito. Por isso, é necessário que sejam feitas algumas correções nos valores experimentais da intensidade de espalhamento.

Precisamos determinar o perfil da largura e o perfil do comprimento do feixe.

Para determinar o perfil da largura do feixe, retiramos o “beam-stop”, colocamos um filtro de níquel de espessura 20 μm na saída da fonte de raios X e usamos baixa potência (20 KV e 10 mA). Utilizamos vácuo e porta amostra com janela de Kapton. Os valores das intensidades encontradas estão na figura 5.6.

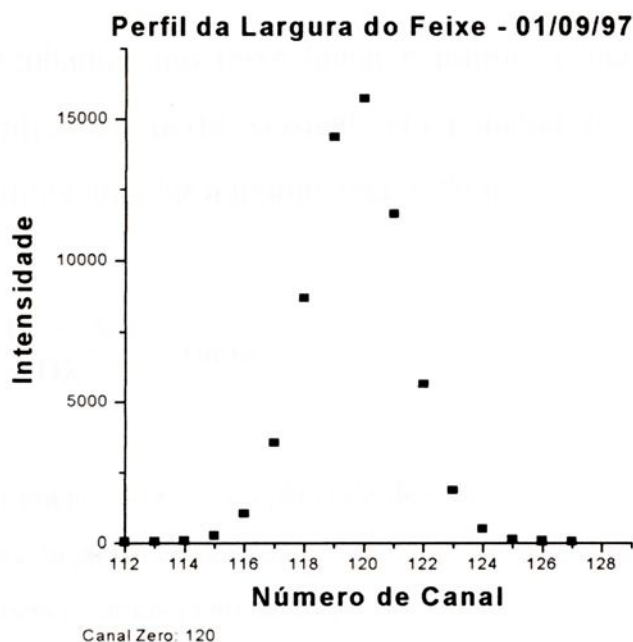


Figura 5.6: perfil da largura do feixe

Esse gráfico permite também a determinação da posição do que chamamos de canal zero ou ângulo zero; nesta calibração o canal zero foi o canal 120.

Para o perfil do comprimento do feixe usamos as mesmas condições anteriores, giramos o detetor deixando-o na posição horizontal e medimos a intensidade. O resultado pode ser visto no gráfico da figura 5.7 abaixo.

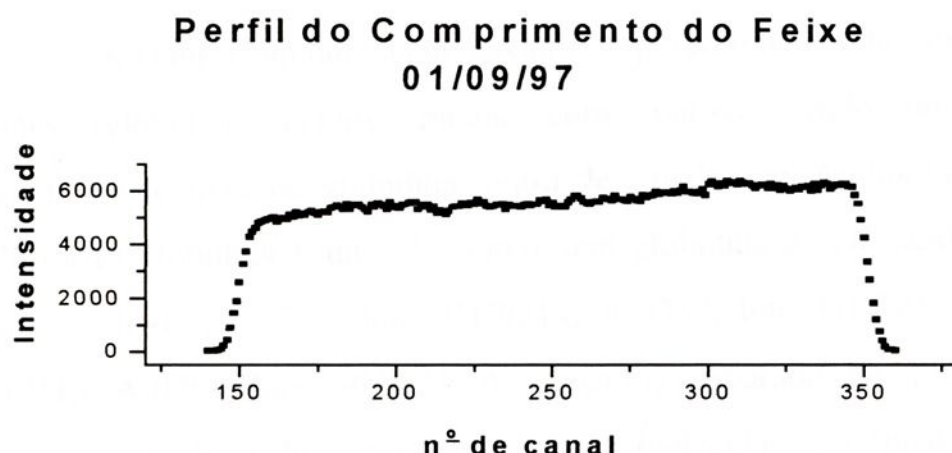


Figura 5.7: perfil do comprimento do feixe.

Para que tenhamos um feixe linear e infinito é necessário que o mesmo apresente, no gráfico do perfil vertical, um patamar de intensidade constante (figura 5.7), e o limite angular máximo seja dado por:

$$q_{\text{máx}} \leq \frac{\pi (Z - \Delta J)}{D\lambda}, \text{ onde:} \quad (5.7)$$

Z : comprimento do feixe no plano do detetor

ΔJ : largura da janela do detetor

D : distância da amostra ao detetor

λ : comprimento de onda

Sendo $Z = 40 \text{ mm}$, $\Delta J = 3 \text{ mm}$, $D = 242 \text{ mm}$ e $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$, o limite para o valor de q para o perfil vertical em nossa última calibração foi:

$$q_{\text{máx}} \leq 0,31 \text{ \AA}^{-1}$$

5.2 - Métodos de análise dos dados experimentais

5.2.1- Preparação de amostras

Utilizamos albuminas de cavalo, de porco e de coelho liofilizadas, com ligantes (globulina, ácidos graxos, entre outros) sendo uma de cavalo essencialmente livre de globulina, outra de cavalo sem ácidos graxos, uma de coelho sem globulina e uma de porco sem globulina e sem ácidos graxos, da Sigma, códigos A-3434, lote 21H9314, A-5280, lote 47F9303, A-1173, lote 24H9313, A-0764, lote 39F9321. A solução é preparada diluindo-se a proteína em uma solução salina para blindar as moléculas externamente, e evitar interações entre as mesmas. Medimos, em uma balança analítica, 5 mg da proteína e diluímos em 100 μ l de tampão formiato de amônia 0,1M, nos valores de pH 5,0 e 7,0.

Os tampões foram preparados a partir da diluição de 0,2 ml de ácido fórmico (25,1 M) em 50 ml de água destilada e deionizada. Os ajustes dos pH foram feitos com hidróxido de amônia NH_4OH ($c = 17,03$ M) diluído em água destilada e deionizada na razão 1:3.

Câmaras com feixe linear requerem recipientes para a amostra alongados para minimizar a quantia de amostra necessária (aproximadamente 50 μ l). Nós utilizamos capilares de vidro pois são fáceis de limpar e sua superfície não interage com moléculas biológicas. Além do que os capilares absorvem fracamente e produzem poucos distúrbios no espalhamento.

As amostras foram colocadas em capilares de vidro Lyndemann de 1,0 mm de diâmetro interno e a seguir levadas para o aparelho. A temperatura no laboratório foi controlada por aparelhos de ar condicionado em aproximadamente 20°C. Foram feitas medidas de 3600 s com o capilar sozinho e também com o solvente.



Foram preparadas três amostras de cada albumina na concentração 50mg/ml, depois foram sendo diluídas abaixando-se a concentração conforme a tabela 5.1 abaixo:

Albuminas de cavalo, porco e coelho

pH	concentração (mg/ml)			
5,0	50	40	30	20
7,0	50	40	30	20

Tabela 5.1: concentração das amostras de albumina.

5.2.2 - Normalização das Curvas de Espalhamento Experimentais

Conforme mencionado acima, trabalhamos com a proteína diluída em um solvente e colocada em um capilar de vidro; porisso, para que tenhamos a intensidade de espalhamento devido somente à macromolécula precisamos subtrair a contribuição do capilar e do solvente.

A expressão da intensidade normalizada é dada por:

$$J_N(q) = AK_1 J_a(q) - AK_2 J_s(q) - AK_3 J_c(q)$$

(5.8)

onde:

- $J_a(q)$ = Intensidade de espalhamento da solução
- $J_s(q)$ = Intensidade de espalhamento do solvente
- $J_c(q)$ = Intensidade de espalhamento do capilar
- AK_1 = Fator de atenuação devido à amostra
- AK_2 = Fator de atenuação devido ao solvente
- AK_3 = Fator de atenuação devido ao capilar

e:

$$AK_1 = \frac{\Delta t_n}{J_{d_s} \Delta x \Delta t_1}, \quad AK_2 = \frac{(1 - \omega) \Delta t_n}{J_{d_s} \Delta x \Delta t_1} \quad \text{e} \quad AK_3 = \frac{\omega \Delta t_n}{J_{d_s} \Delta x \Delta t_1} \quad (5.9)$$

onde:

J_d = Intensidade proporcional ao feixe direto (amostra, solvente e capilar);

Δx = Espessura da amostra (ou do capilar);

Δt_1 = Tempo de exposição real;

Δt_n = Tempo a ser normalizado;

ω = Fração do volume total ocupado pelo soluto.

As medidas de intensidade do feixe direto não podem ser feitas diretamente pois trazem o risco de danificar o detetor devido às altas intensidades. Para contornar esta dificuldade usamos uma amostra padrão de alto poder espalhador, o lupolen (polietileno). A intensidade espalhada pelo lupolen é proporcional à intensidade do feixe direto. Essas medidas com lupolen devem ser feitas antes e depois das medidas com as amostras de proteínas, sempre no mesmo ângulo. Nós utilizamos um valor calculado pela média aritmética das intensidades de espalhamento na região linear do gráfico característico do lupolen, como por exemplo na figura 5.8 abaixo.

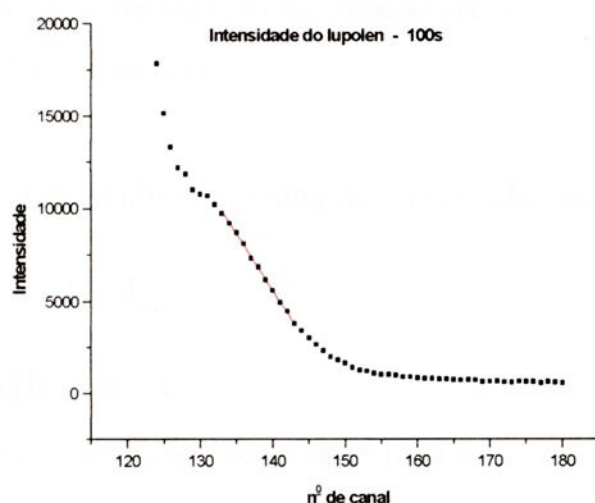


Figura 5.8: curva característica de espalhamento do lupolen.

A fração ω é definida como a razão entre o volume total do soluto e o volume total da solução. Seu valor é aproximadamente 0,1 para diferentes macromoléculas de proteínas.

Após esta normalização é possível se comparar as diferentes curvas de espalhamento das amostras.

Foram feitas três séries de medidas repetidas das albuminas variando-se o pH (5,0 e 7,0) em diferentes concentrações (50, 40, 30 e 20 mg/ml) com exposições de uma hora de duração para cada concentração, num total de vinte e quatro medidas para cada albumina, duas medidas para o solvente e duas medidas para o capilar.

Calculamos uma curva de intensidade média das doze medidas e extrapolamos à concentração zero pelo método dos mínimos quadrados. A intensidade média é calculada de acordo com a expressão 5.10 abaixo:

$$\hat{I}_j = \hat{A}_0 + \hat{b} C_j \quad (5.10)$$

Onde:

$\hat{I}_j$ é a intensidade de um determinado q_j ;

$\hat{A}_0$ é a média extrapolada à concentração zero e

C_j é cada concentração.

O erro é calculado pela soma dos quadrados de resíduos:

$$SQE = \sum \left(\hat{I}_j - I_{exp_j} \right)^2 \quad e \quad (5.10a)$$

$$S = \sqrt{SQE / n - 2} \quad (5.10b)$$

n = número de experimentos [em nosso caso=12 (4 concentrações x 3 medidas)].

5.2.3 - Extrapolação para Diluição Infinita

A teoria de SAXS foi desenvolvida levando-se em conta a não interferência interpartículas, ou seja, é válida somente para a diluição infinita. Macromoléculas biológicas, especialmente proteínas em solução, produzem espalhamento muito pequeno à concentrações abaixo de 5 mg/ml com erro estatístico grande. Para proteínas globulares, efeitos de concentração somente podem ser negligenciados para concentrações abaixo de 1 mg/ml. É necessário, portanto, eliminar efeitos. Para isso devemos realizar medidas das intensidades de espalhamento com amostras de concentração decrescente, até um valor mínimo possível e em seguida, através de algum método matemático, extrapolar os valores das intensidades de espalhamento para uma concentração zero (ou diluição infinita). Em nosso trabalho fizemos quatro diluições para cada amostra.

Podemos extrapolar também parâmetros individuais, como raio de giração, as intensidades no ângulo zero $I(0)$ ou a função $P(r)$.

Fizemos a normalização de cada curva de espalhamento pela sua respectiva concentração $J_n(q)/c$ e depois usando o método dos mínimos quadrados obtivemos o valor extrapolado para a concentração zero. A extrapolação é feita para cada um dos pontos angulares nas diferentes concentrações.

O modelo adotado na teoria de espalhamento por partículas supõe duas fases com densidades eletrônicas diferentes, mas sem flutuações dentro de cada uma delas. As soluções de proteínas são compostas de duas fases (soluto e solvente) que apresentam flutuações de densidade eletrônica dentro de cada uma delas, que originam um espalhamento essencialmente constante, independente de q . Para utilizar o modelo de duas densidades eletrônicas precisamos subtrair do espalhamento experimental a contribuição dessas flutuações.

A intensidade de espalhamento, corrigida, em ângulos grandes (região de Porod) pode ser escrita como:

$$I(q) = \frac{A}{q^3} + I_b(q) \quad (5.11)$$

Mas, se utilizarmos a intensidade de espalhamento sem correção do perfil do feixe teremos:

$$J(q) = \frac{A}{2\pi q^3} + J_b(q) \quad (5.12)$$

onde A é a constante de Porod.

Dentro dessa região angular, podemos considerar $J_b(q) = J_b$ como sendo uma constante. Se multiplicarmos a equação por q^3 teremos:

$$J(q) q^3 = \frac{A}{2\pi} + J_b q^3 \quad (5.13)$$

Na prática, a partir do gráfico de $J(q) q^3 \times q^3$, podemos determinar o valor de J_b , que é o coeficiente angular da reta, como mostra a figura 5.9 abaixo. A constante de Porod pode ser determinada no mesmo gráfico pela intersecção da reta com o eixo das ordenadas.

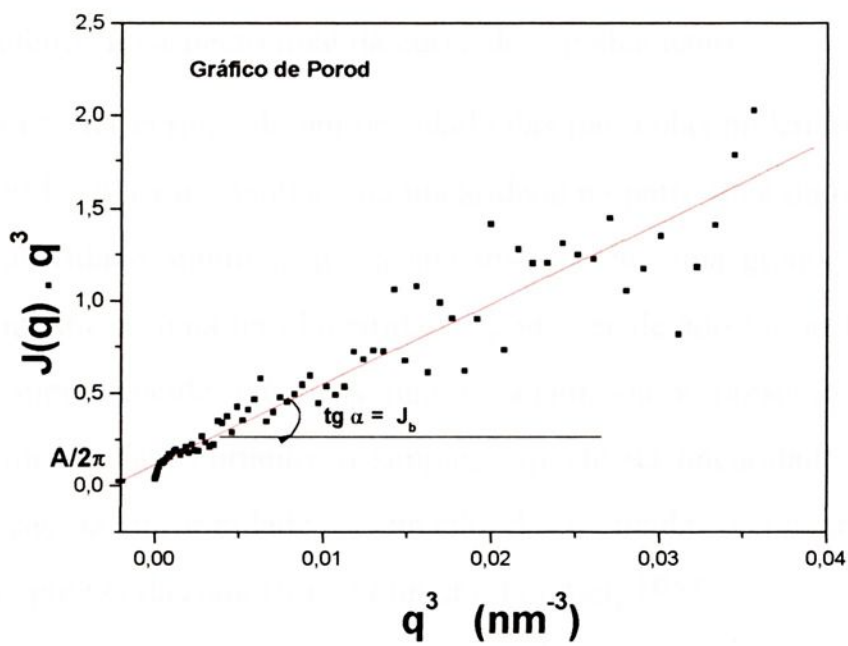


Figura 5.9: afastamento da lei de Porod, causada pelas flutuações da densidade eletrônica dentro do soluto e do solvente.

5.2.4 - Informações contidas numa curva de SAXS

É possível obter um número de parâmetros diretamente da curva de espalhamento ($I(q)$ versus q), os quais são importantes fontes de informações e a base para toda a análise.

O raio de giração é o único parâmetro preciso que pode ser determinado por SAXS sem necessidade de hipóteses complementares. É evidente que este parâmetro sozinho não pode definir a partícula. As curvas de $\log I$ versus q^2 para partículas de mesmo raio de giração mas diferentes formas terão a mesma inclinação na origem e coincidirão para $q < q_{\text{máx}}$, mas divergirão para além deste ponto. O uso da curva inteira na determinação da forma da partícula é muito

difícil na prática, pois grandes mudanças na forma da mesma produzem somente pequenos efeitos no aspecto final da curva de espalhamento.

Para se ter certeza da uniformidade das partículas podemos verificar se a curva de $\log I$ versus q^2 mantém sua linearidade na parte final da região de baixo ângulo. Linearidade significa que a amostra contém uma grande proporção de partículas idênticas; uma não linearidade pode ser devido ou ao fato de que as partículas supostamente idênticas não o sejam, ou à presença de pequenas partículas misturadas. Portanto, o simples aspecto da linearidade desta curva é uma indicação da uniformidade do tamanho das partículas e constitui um meio de inspeção da pureza das amostras (Guinier e Fournet, 1955).

5.2.5 - Interpretação dos dados de SAXS

Os métodos de interpretação podem ser classificados em dois grupos:

- a) interpretação no espaço recíproco (função espalhamento corrigida)
- b) interpretação no espaço real (função distribuição de distâncias)

A interpretação no espaço recíproco é o método mais comum. As curvas de espalhamento devem ser corrigidas, e gráficos especiais são usados para determinar os vários parâmetros, como por exemplo:

$\log I(q)$ versus q^2 (gráfico de Guinier)

$I \cdot q^4$ versus q^4 (gráfico de Porod)

A interpretação no espaço real é feita sobre a função $P(r)$, que nos dá informações importantes de detalhes estruturais da partícula.



6 - Métodos Computacionais

6.1 - Método das transformações indiretas de Fourier da Função $P(r)$ - ITP - Correção das curvas de espalhamento devido ao sistema de colimação e distribuição do comprimento de onda

Devido à grande quantidade de dados envolvidos e à complexidade dos cálculos é necessário o uso de vários programas computacionais entre os quais está o programa ITP (Müller e Glatter, 1982), que possibilita o cálculo da intensidade de espalhamento corrigida $I(q)$ e da função distribuição de distâncias $P(r)$ a partir da curva de espalhamento experimental $I_{\text{exp}}(q)$ (ou $J(q)$), usando o método da Transformada Indireta de Fourier, e gera a curva de espalhamento corrigida por efeito de altura e largura do feixe. Essa rotina inclui também as operações de alisamento pelo método dos mínimos quadrados pesados, transformação com efeitos de terminação, e fornece, ainda, o erro programado.

Nos experimentos com partículas em solução, isto é, não orientadas, um grande número de partículas contribuem para o espalhamento. A informação contida em uma distribuição de densidade eletrônica tridimensional $\rho(r)$ (que descreve a estrutura toda da partícula) é reduzida à função distribuição de distâncias unidimensional $P(r)$. Esta função é proporcional ao número de linhas com comprimento r ligando algum elemento de volume i com um elemento de volume k da mesma partícula. Nós observamos a partícula indiretamente por meio do espalhamento.

O processo físico do espalhamento pode ser matematicamente expresso por uma transformada de Fourier (transformação T_1) a qual define como a informação no espaço real (função distribuição de distâncias) é transportada para o espaço recíproco (função espalhamento).



Na prática, a intensidade de espalhamento não pode ser medida exatamente, pois precisaria se ter um feixe primário monocromático perfeitamente colimado (puntual), mas como o sistema de colimação de blocos nos definem um feixe de secção linear e não puntiforme, as curvas de espalhamento sofrem uma modificação apreciável. Por isso é necessário que as intensidades experimentais sejam corrigidas dos efeitos causados pelo perfil do feixe, efeitos devidos ao comprimento da fenda (transformação T_3) e à largura (T_4).

Os efeitos da distribuição do comprimento de onda também devem ser corrigidos, se o feixe for policromático (radiação CuK_α e CuK_β), e isto é feito pela transformação linear T_2 .

As transformações T_3 e T_4 podem ser expressas matematicamente pelas correspondentes equações integrais. Elas causam um “smeared” da função espalhamento, a estrutura fina da curva é fortemente alisada.

A função espalhamento corrigida $I(\mathbf{q})$ resulta da função $P(\mathbf{r})$ pela resolução das transformações lineares T_1 a T_4 , as quais serão mais detalhadas abaixo (Glatter, 1977; Pilz *et al*, 1979).

T_1 : relaciona a intensidade de espalhamento com a distribuição de distâncias da partícula.

A função $P(\mathbf{r})$ é definida como a função correlação $\gamma(\mathbf{r})$ da partícula multiplicada por r^2 :

$$P(\mathbf{r}) = \gamma(\mathbf{r}) \cdot r^2 \quad (6.1)$$

A transformação T_1 é dada pela transformada de Fourier :

$$I(\mathbf{q}) = 4\pi \int_0^\infty P(\mathbf{r}) \frac{\sin(\mathbf{qr})}{\mathbf{qr}} d\mathbf{r} \quad (6.2)$$

A transformação linear T_1 tem uma inversa T_1^{-1} dada por:



$$P(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty I(q) q r \sin(qr) dq \quad (6.3)$$

T_2 : curva de espalhamento observada $I_m(q)$, medida com radiação policromática, está relacionada com a curva $I(q)$ teórica para radiação monocromática e de comprimento de onda λ_0 , pela integral:

$$I_m(q) = \int_0^\infty \omega(\lambda') I(q/\lambda') d\lambda' \quad (6.4)$$

onde: $\lambda' = \frac{\lambda}{\lambda_0}$ e

$\omega(\lambda')$ representa a função distribuição de comprimento de onda da radiação policromática.

As equações desenvolvidas pela teoria de SAXS são válidas para feixes de seção puntiforme. Se o feixe possui uma seção linear, existe uma distribuição de intensidade, $P(t)$, ao longo de seu comprimento e uma $Q(x)$ ao longo de sua largura. A intensidade espalhada observada, $J(q)$, será então o resultado da contribuição de todo o espalhamento procedente da amostra banhada por este feixe.

Seja $I_0(x,t)$ a distribuição de intensidade bidimensional do feixe primário passando pela amostra, onde t é a coordenada do centro do feixe na direção do comprimento da fenda e x , a coordenada perpendicular a t .

$I_0(x,t)$ pode ser escrita como o produto de duas distribuições independentes:

$$I_0(x,t) = P(t) \cdot Q(x) \quad (6.5)$$

Portanto, o efeito de colimação bidimensional pode ser dividido em dois efeitos unidimensionais, correspondentes às transformações T_3 e T_4 .

T_3 : o feixe primário linear com distribuição de intensidade $P(t)$ na direção longitudinal causa uma intensidade de espalhamento não corrigida $\tilde{I}(q)$, que é a integral sobre a intensidade teórica $I(q)$ pesada pela função intensidade $P(t)$:

$$\begin{aligned}\tilde{I}(q) &= \int_{-\infty}^{\infty} P(t) I \left[(q^2 + t^2)^{1/2} \right] dt \quad \text{ou} \\ \tilde{I}(q) &= 2 \int_0^{\infty} P(t) I \left[(q^2 + t^2)^{1/2} \right] dt\end{aligned}\quad (6.6)$$

T_4 : a distribuição de intensidade $Q(x)$ do feixe primário linear em relação à sua largura nos dá uma intensidade experimental medida $\hat{I}(q)$ descrita pela integral convolução:

$$\hat{I}(q) = \int_{-\infty}^{\infty} Q(x) I(q - x) dx \quad (6.7)$$

A correção para os três efeitos ficará, então:

$$I_{\text{exp}}(q) = 2 \int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\infty} \int_0^{\infty} Q(x) P(t) \omega(\lambda) I \left(\frac{(q-x)^2 + t^2}{\lambda} \right) d\lambda dt dx \quad (6.8)$$

Considerando todos os efeitos, a intensidade experimental pode ser obtida pela expressão:

$$I_{\text{exp}}(q) = 8\pi \int_{-\infty}^{\infty} dx \int_0^{\infty} dt \int_0^{\infty} d\lambda \int_0^{\infty} dr Q(x) P(t) \omega(\lambda) P(r) \frac{\text{sen}\beta}{\beta} + \varepsilon(q) \quad (6.9)$$

$$\beta = r \left[(q-x)^2 + t^2 \right]^{\frac{1}{2}} / \lambda \quad (6.10)$$

$\varepsilon(q)$ é o erro estatístico.

Usualmente as intensidades de espalhamento são registradas com um detector proporcional sensível à posição, e o desvio padrão de cada ponto dos dados é calculado pelas expressões 5.10a e 5.10b, citadas no capítulo 5, item 5.2.2, página 47.

A solução da equação acima é feita mediante o método da transformação indireta e é aplicável para sistemas monodispersos de macromoléculas em solução.

O método inicia-se supondo um valor para a máxima dimensão da partícula ($D_{\text{máx}}$), para a qual a função $P(r) = 0$, quando $r \geq D_{\text{máx}}$. Porém, para valores de r na faixa de $0 \leq r \leq D_{\text{máx}}$, ela pode ser aproximada por uma combinação linear de um certo número N de funções φ_v :

$$P_A(r) = \sum_1^N c_v \varphi_v(r) \quad (6.11)$$

onde $\varphi_v(r)$ são funções cúbicas “ β -Spline”. Elas são definidas como convolução de produtos da função escada e representa curvas com a derivada segunda mínima. Os coeficientes c_v são desconhecidos.

O próximo passo é aplicar as transformações T_1 , T_2 , T_3 e T_4 às funções $\varphi_v(r)$.

O resultado intermediário após T_1 representando a intensidade de espalhamento sem efeitos de colimação correspondente à distribuição de distâncias $\varphi_v(r)$ pode ser escrito como:

$$\psi_v(q) = T_1 \varphi_v(r) \quad (6.12)$$

A intensidade não corrigida resultante após serem executadas todas as transformações será:

$$\chi_v(q) = T_4 T_3 T_2 T_1 \varphi_v(r)$$

$$\chi_v(q) = T_4 T_3 T_2 \psi_v(q) \quad (6.13)$$

As funções $\chi_v(\mathbf{q})$ constituem um sistema otimizado para a aproximação dos dados de espalhamento da partícula com uma dimensão máxima $D_{\text{máx}}$, medidos sob as condições especiais representadas por T_1 - T_4 .

Os coeficientes c_v são agora determinados pelo método dos mínimos quadrados, tal que ele represente uma ótima aproximação dos dados experimentais. A minimização do desvio entre $I_A(\mathbf{q})$ e $I_{\text{exp}}(\mathbf{q})$ é dada pela expressão:

$$L = \int_{q_1}^{q_2} \left[I_{\text{exp}}(\mathbf{q}) - \sum_{v=1}^N c_v \chi_v(\mathbf{q}) \right]^2 / \sigma^2(\mathbf{q}) d\mathbf{q} = \text{Mínimo} \quad (6.14)$$

onde:

q_1 e q_2 são os ângulos do primeiro e do último ponto dos dados,
 $\sigma^2(\mathbf{q})$ é a variação das medidas.

Os coeficientes c_v resultantes da equação 6.14 definem a solução no espaço real de acordo com a equação 6.11, onde a curva de aproximação dos dados é dada por:

$$\tilde{I}_A(\mathbf{q}) = \sum_{v=1}^N c_v \chi_v(\mathbf{q}) \quad (6.15)$$

A curva de espalhamento corrigida é definida então por:

$$I_A(\mathbf{q}) = \sum_{v=1}^N c_v \psi_v(\mathbf{q}) \quad (6.16)$$

O raio de giração (R_g) pode ser calculado a partir da $P(\mathbf{r})$ por:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^D P_A(\mathbf{r}) r^2 d\mathbf{r}}{2 \int_0^D P_A(\mathbf{r}) d\mathbf{r}} \quad (6.17)$$

O raio de giração calculado desta maneira usa todos os pontos da curva de espalhamento, e só necessita do valor de $D_{\text{máx}}$ (dimensão máxima da molécula). A consequência disto é uma maior precisão no cálculo de R_g se comparado com o método de Guinier.

A intensidade a ângulo zero pode ser calculada de acordo com a equação:

$$I(0) = 4\pi \int_0^{D_{\text{máx}}} P(r) \, dr \tag{6.18}$$

O método ITP pode ser melhor visualizado na figura 6.1 abaixo.

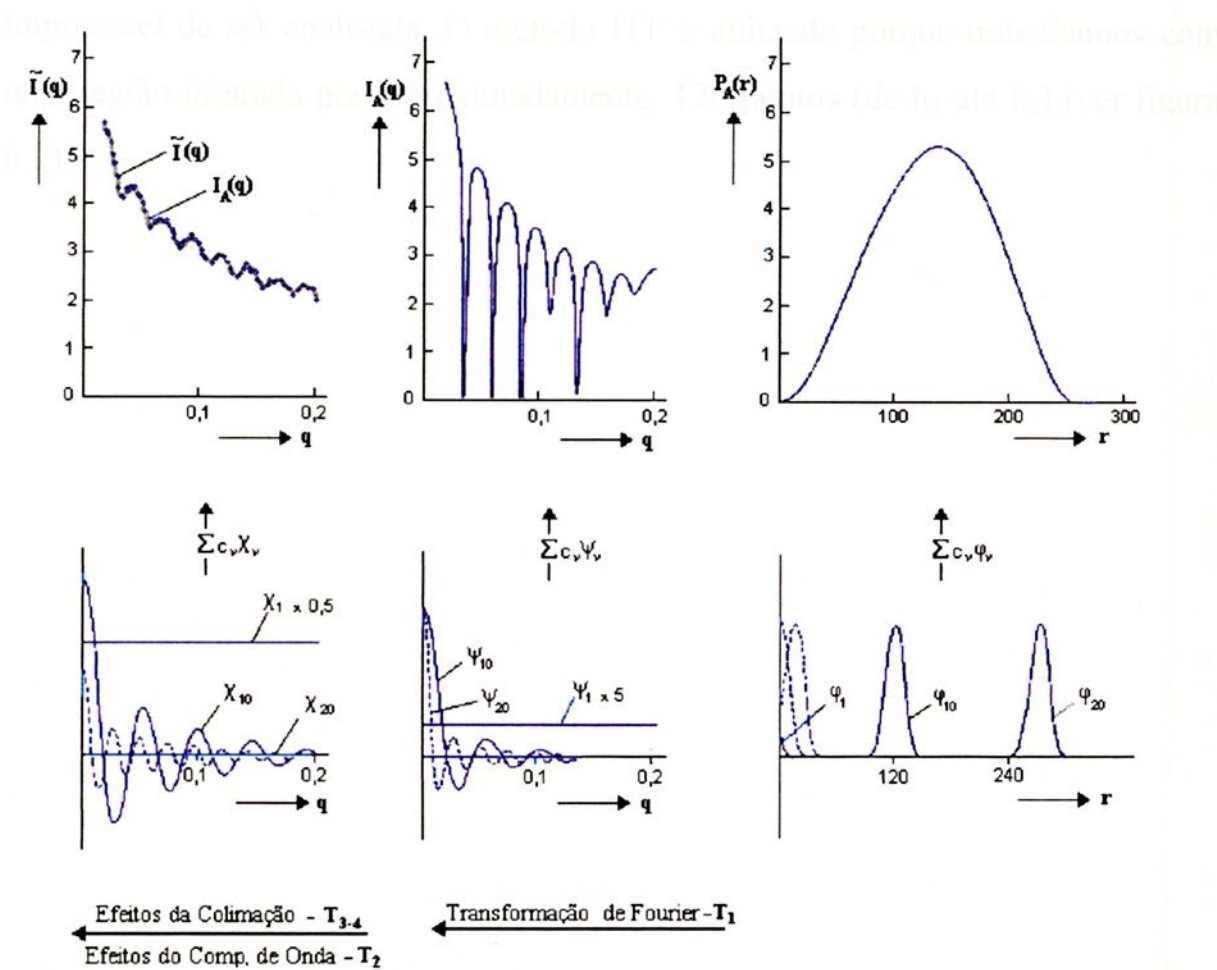


Figura 6.1: funções $\phi_v(q)$, $\psi_v(q)$ e $\chi_v(q)$ usadas para a aproximação das intensidades de espalhamento pelo ITP.

Na maioria das vezes os dados experimentais são afetados pelo espalhamento de fundo (“background”) e pelos efeitos de concentração, como podem ser observados na figura 6.2. A função $P(r)$ calculada pelo ITP reflete estes efeitos com um pequeno desvio na função para valores próximos de $r = 0$ (espalhamento de fundo) e uma oscilação negativa ao redor da máxima dimensão da molécula (efeitos de concentração). Devemos eliminá-los, de acordo com Porod, e extrapolando as intensidades à concentração zero para eliminar as interferências interpartículas.

Se aplicarmos uma transformação de Fourier convencional à função intensidade corrigida $I(q)$ teremos fortes oscilações da função $P(r)$, que estende-se até muito além da máxima dimensão da molécula, tornando-se praticamente impossível de ser analisada. O método ITP é utilizado porque trabalhamos com uma região limitada por, aproximadamente, 120 pontos (de h_1 até h_2) (ver figura 6.2).

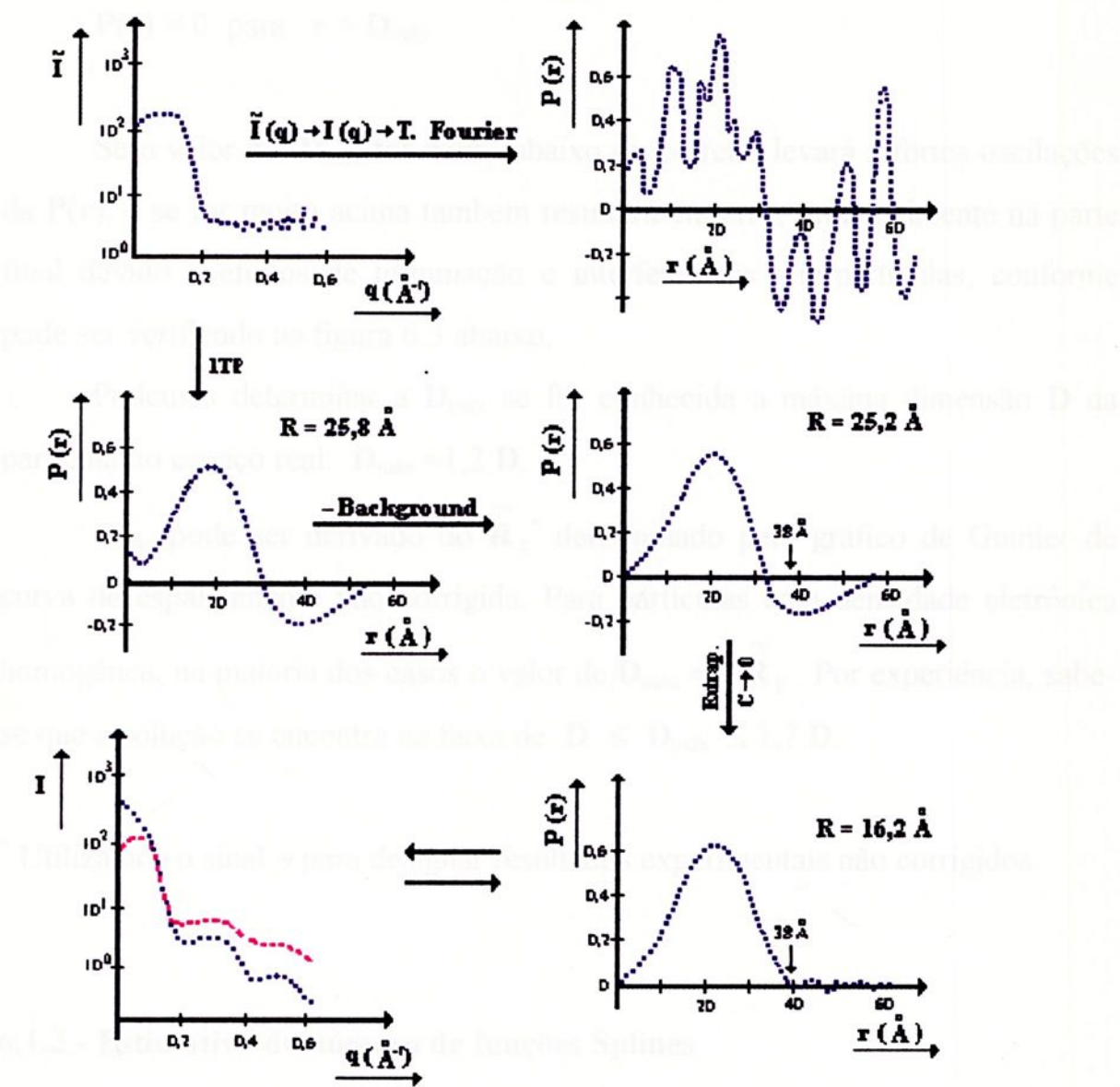


Figura 6.2: transformação de Fourier convencional da intensidade de espalhamento corrigida (acima). Influência do espalhamento “background” e dos efeitos de concentração e eliminação dos mesmos (meio). Função espalhamento corrigida pelo “background” e pelos efeitos de concentração (abaixo, azul) e não corrigida (abaixo, rosa).

6.1.1 - Estimativa da dimensão máxima da partícula

É necessário estimar um valor um pouco acima da máxima dimensão D no espaço real, pelo qual a $P(r)$ assume valor zero:

$$P(r) = 0 \text{ para } r > D_{\text{máx}}$$

Se o valor de $D_{\text{máx}}$ for muito abaixo do correto, levará a fortes oscilações da $P(r)$, e se for muito acima também resultará em erro, principalmente na parte final devido a efeitos de terminação e interferências interpartículas, conforme pode ser verificado na figura 6.3 abaixo.

Podemos determinar a $D_{\text{máx}}$ se for conhecida a máxima dimensão D da partícula no espaço real. $D_{\text{máx}} \approx 1,2 D$.

$D_{\text{máx}}$ pode ser derivado do $\tilde{R}_g^*$ determinado pelo gráfico de Guinier de curva de espalhamento não corrigida. Para partículas com densidade eletrônica homogênea, na maioria dos casos o valor de $D_{\text{máx}} \approx 4 \tilde{R}_g$. Por experiência, sabe-se que a solução se encontra na faixa de $D \leq D_{\text{máx}} \leq 1,7 D$.

* Utilizamos o sinal $\sim$ para designar resultados experimentais não corrigidos.

6.1.2 - Estimativa do número de funções Splines

A função $P(r)$ é aproximada por N funções Splines igualmente espaçadas na faixa de $0 \leq r \leq D_{\text{máx}}$.

O limite teórico para N será:

$$N_{\text{máx}}^{\text{teór}} = \frac{q_2 \cdot D_{\text{máx}}}{\pi} \quad (6.19)$$

q_2 = último ângulo medido.

Na prática, na maioria dos casos, a escolha de N entre $15 \leq N \leq 30$ fornecerá bons resultados.

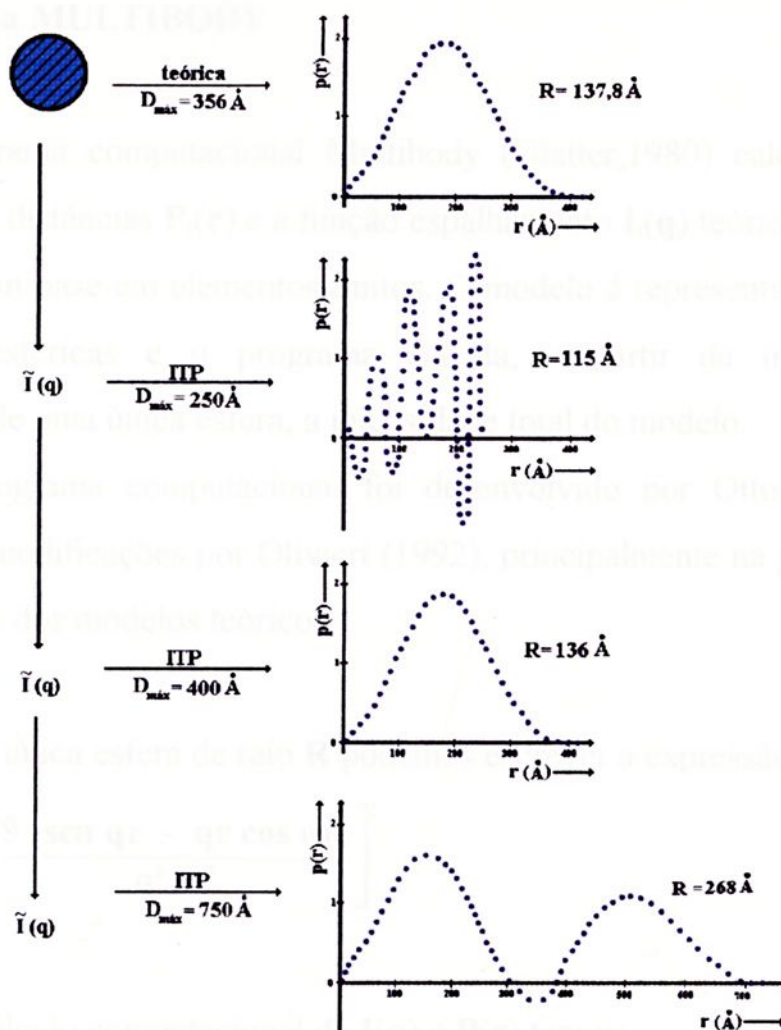


Figura 6.3: funções $P(r)$ de uma amostra de latex de dimensão máxima de 356 Å para vários valores de $D_{\text{máx}}$.

Além do programa ITP que corrige as curvas de espalhamento devido ao perfil do feixe, há vários outros desenvolvidos por Olivieri para o cálculo das normalizações das curvas de intensidade, extrapolação à concentração zero, gráficos de Guinier e de Porod, etc.

6.2 - Programa MULTIBODY

O programa computacional Multibody (Glatter, 1980) calcula a função distribuição de distâncias $P_t(\mathbf{r})$ e a função espalhamento $I_t(\mathbf{q})$ teóricas de modelos construídos com base em elementos finitos. O modelo é representado por muitas subunidades esféricas e o programa calcula, a partir da intensidade de espalhamento de uma única esfera, a intensidade total do modelo.

Esse programa computacional foi desenvolvido por Otto Glatter, mas sofreu várias modificações por Olivieri (1992), principalmente na parte que gera as coordenadas dos modelos teóricos.

Para um única esfera de raio R podemos escrever a expressão:

$$I_E(\mathbf{q}) = \left[\frac{3 (\text{sen } qR - qR \cos qR)}{q^3 R^3} \right]^2 \quad (6.20)$$

Para o cálculo computacional de $I(\mathbf{q})$ e $P(\mathbf{r})$ temos:

$$I(\mathbf{q}) = \sum_{i=1}^n v_i^2 \rho_i^2 \phi_i^2(\mathbf{q}) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n \rho_i \rho_k v_i v_k \phi_i(\mathbf{q}) \phi_k(\mathbf{q}) \frac{\text{sen}(\mathbf{q} \cdot \mathbf{d}_{ik})}{\mathbf{q} \cdot \mathbf{d}_{ik}} \quad (6.21)$$

onde:

$\mathbf{d}_{ik}$ é a distância entre os centros da i -ésima com a k -ésima esfera,

v_i , ρ_i e ϕ_i são, respectivamente, o volume, a densidade e o fator forma da i -ésima esfera.

$$E \quad \phi_i(\mathbf{q}) = \frac{3 [\text{sen}(qR_i) + (qR_i) \cos(qR_i)]}{(qR_i)^3} \quad (6.22)$$

onde R_i é o raio da i -ésima esfera.

$$P(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^n \rho_i^2 P_0(\mathbf{r}, R_i) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n \rho_i \rho_k \bar{P}(\mathbf{r}, \mathbf{d}_{ik}, R_i, R_k) \quad (6.23)$$

onde:

$P_0(\mathbf{r}, R_i)$ é a função distribuição de distância de uma esfera de raio R_i e densidade eletrônica igual à unidade,

$\overline{P}(\mathbf{r}, d_{ik}, R_i, R_k)$ é a função distribuição de distâncias entre as esferas i e k .

6.2.1 - Modelos estruturais

Modelos teóricos são construídos utilizando-se subunidades esféricas ou cúbicas e, partindo de uma proposta inicial para determinada proteína, chegamos a modelos o mais próximos possível dos resultados experimentais.

O programa Multibody gera as curvas teóricas dos modelos: função distribuição de distâncias $P_t(\mathbf{r})$ e intensidade de espalhamento $I_t(\mathbf{q})$. Através da comparação dessas curvas teóricas dos modelos com as funções experimentais $P(\mathbf{r})$ e $I(\mathbf{q})$ podemos fazer os ajustes necessários nos modelos; a comparação é mais conveniente no espaço real: $P(\mathbf{r})$ do que no espaço recíproco: $I(\mathbf{q})$, pois no espaço real observamos diretamente a máxima dimensão das moléculas. E, por tentativas, chegamos à proposta final mais aproximada para cada proteína analisada.



7 - Resultados experimentais

7.1 - Observações

Efetuamos no laboratório a coleta de dados das albuminas com ligantes conforme foram especificadas na página 43 (preparação de amostras) e trabalhamos com o computador na análise dos mesmos, com o objetivo de verificar o comportamento da albumina em função do pH e para a familiarização do uso dos programas computacionais adequados.

O trabalho experimental começa com o preparo de uma solução diluída na qual a molécula a ser estudada é encontrada no estado puro. É essencial que a densidade eletrônica do soluto seja diferente da do solvente, porque quanto menor for esta diferença mais fraco será o espalhamento a baixos ângulos.

O resultado de um experimento de SAXS consiste numa curva de espalhamento, isto é, a dependência funcional entre a intensidade de espalhamento $I(2\theta)$ e o ângulo de espalhamento 2θ .

Devido às características das macromoléculas biológicas em geral, devemos tomar alguns cuidados na preparação da solução e na coleta de dados:

- Como a diferença entre densidade eletrônica da proteína e a do solvente é pequena, a solução espalha muito pouco, por isso o tempo de exposição aos raios X deve ser longo para se obter uma boa estatística. Utilizamos o tempo de duas horas para cada medida.

- Os efeitos de concentração devem ser eliminados, pois a teoria de espalhamento foi feita considerando-se a não interferência interpartículas. Para isso fazemos medidas com concentrações decrescentes (entre 50 e 20 mg/ml) e extrapolamos os resultados para a concentração zero. Um resultado experimental que podemos verificar na curva de espalhamento é o decréscimo na intensidade $I(q)$ com o decréscimo da concentração.



- As curvas de espalhamento obtidas da solução têm contribuição do solvente e do próprio capilar. Devemos, portanto, subtrair os espalhamentos devidos aos mesmos.

- Devido ao longo tempo de exposição é necessário um controle sobre a estabilidade do feixe incidente.

7.2 - Resultados da albumina de cavalo com ligantes, mas essencialmente livre de globulina, no pH 7,0

7.2.1- Intensidades de espalhamento, correções e normalizações

Foram feitas três séries de medidas para cada concentração variando entre 50 e 20 mg/ml e as curvas de intensidades de espalhamento de raios X obtidas podem ser vistas na figura 7.1 e 7.2. Foram feitas também uma medida para o solvente e uma para o capilar.

Essas curvas foram normalizadas segundo as equações 5.8 e 5.9.



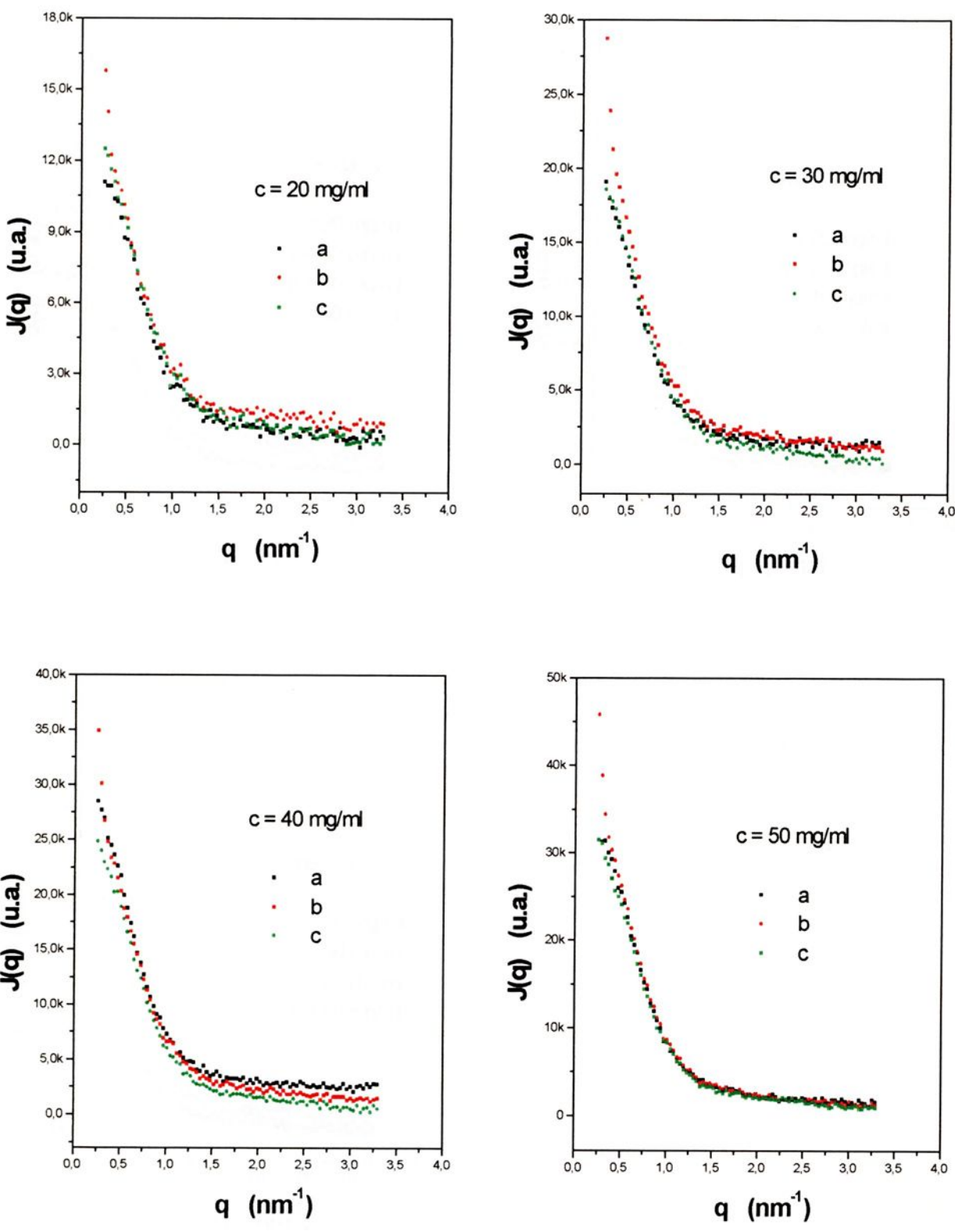


Figura 7.1: intensidades de espalhamento das 3 medidas (a,b,c) para as várias concentrações da albumina de cavalo sem globulina, no pH 7,0.

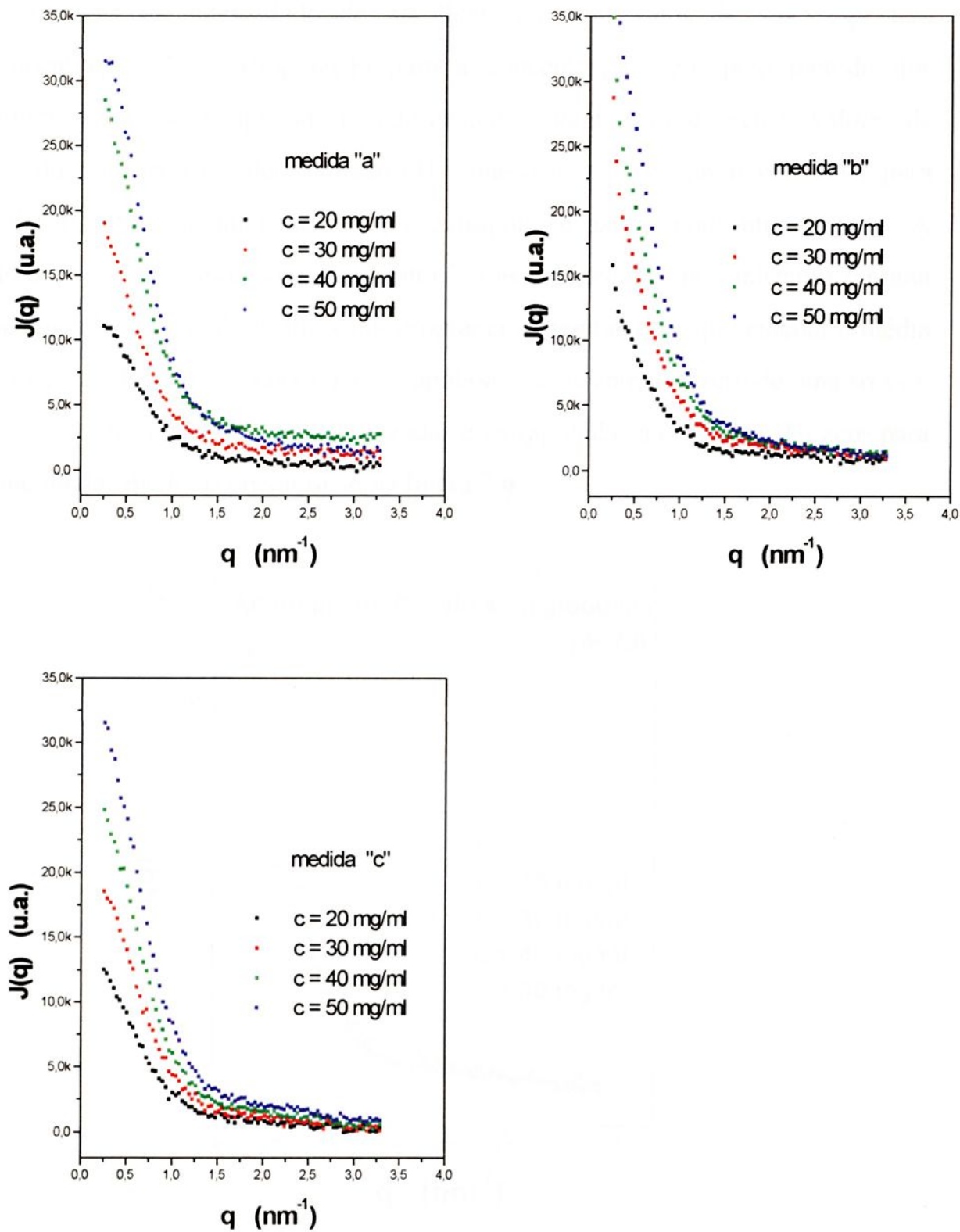


Figura 7.2: intensidades de espalhamento normalizadas para a albumina de cavalo sem globulina no pH 7,0.

A seguir foi feita a normalização em relação à concentração (divide-se cada curva de intensidade de espalhamento pelo valor de sua respectiva concentração) e a extrapolação para a concentração zero pelo método dos mínimos quadrados, aplicado a cada posição angular nos diferentes valores de pH, ou seja, para um determinado pH toma-se os valores das intensidades para cada concentração num mesmo q e extrapola-se para a concentração zero. A título de exemplo mostramos na figura 7.3 as intensidades normalizadas de uma das medidas (c), onde usamos um programa computacional que calcula a média das três medidas (doze curvas) e extrapola-as à concentração zero de uma só vez. O gráfico das intensidades normalizadas e extrapoladas à concentração zero para a média das medidas encontra-se na figura 7.6.

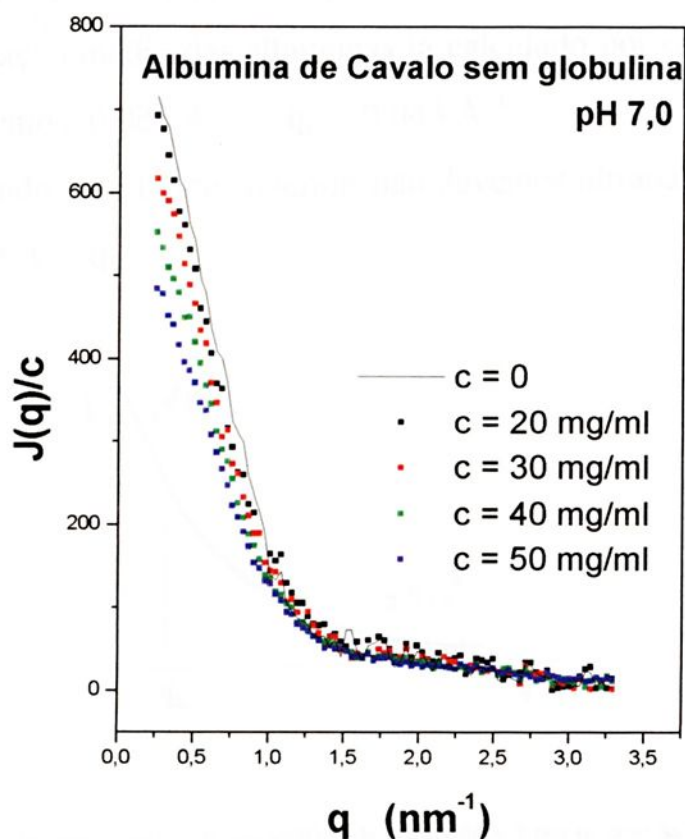


Figura 7.3: intensidades com as concentrações normalizadas e extrapoladas à concentração zero, para a medida “c” da albumina de cavalo sem globulina, no pH 7,0.

7.2.2 - Gráficos de Guinier

Nós vimos que para a região onde $q \rightarrow 0$ podemos aproximar a curva de intensidade de espalhamento pela equação:

$$I(q) = I(0) \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (7.1)$$

No gráfico da intensidade ($I(q)$ X q) temos a região de Guinier para valores pequenos de q , conforme a figura 7.4 abaixo. Para partículas com raio de giração R_g , existe um limite acima do qual a lei de Guinier não é válida. Para partículas esféricas, esse limite é dado por $q_L = 1,3 / R_g$ e, para partículas cilíndricas $q_L = 0,7 / R_g$. Nosso sistema não se encaixa perfeitamente em nenhum desses casos, entretanto se tomarmos esses valores como limites e sendo o raio de giração médio das albuminas já calculado por outros métodos ao redor de $30 \text{ \AA}$, teremos $0,023 \text{ \AA}^{-1} < q_L < 0,043 \text{ \AA}^{-1}$.

Tomando esse limite superior, não devemos ultrapassar $q_L = 0,043 \text{ \AA}^{-1}$ ou $q_L^2 = 0,0019 \text{ \AA}^{-2}$.

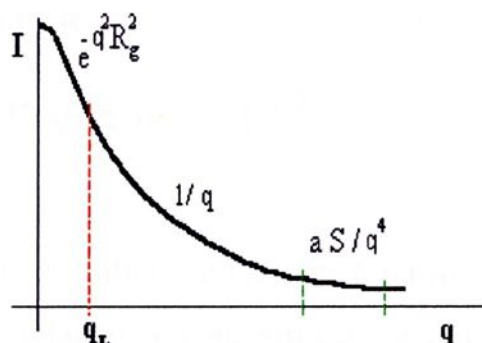


Figura 7.4: desenho esquemático de um gráfico de intensidade I por q , com as regiões de Guinier e de Porod.

O método de Guinier para determinar o raio de giração (R_g) das partículas é da seguinte forma:

a) primeiro calculamos o logaritmo da expressão 7.1 acima:

$$\log I(q) = \log I(q) - \frac{q^2 R_g^2}{3} \log e \quad (7.2)$$

Simplificando teremos:

$$\log I(q) = 0,1448 R_g^2 q^2 + cte$$

b) a partir da inclinação (α) do gráfico de $\log J(q) \times q^2$, da figura 7.5 abaixo, teremos:

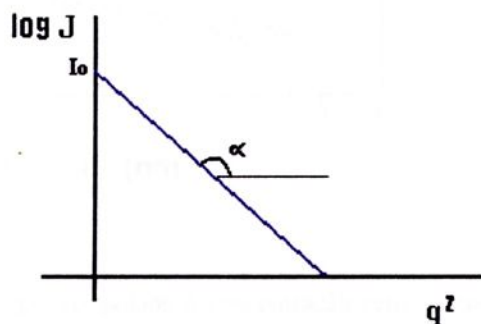


Figura 7.5: esquema de um gráfico de Guinier.

$$\operatorname{tg} \alpha = 0,1448 R_g^2 \quad e$$

$$R_g = 2,628 \sqrt{-\operatorname{tg} \alpha} \quad \left(\overset{\circ}{\text{A}} \right) \quad (7.3)$$

Construindo o gráfico de Guinier a partir das curvas de intensidade $J(q)$, normalizadas em relação à concentração e extrapoladas à concentração zero, obtemos o $R_{g\text{ext}}$, que pode ser visto na figura 7.6.

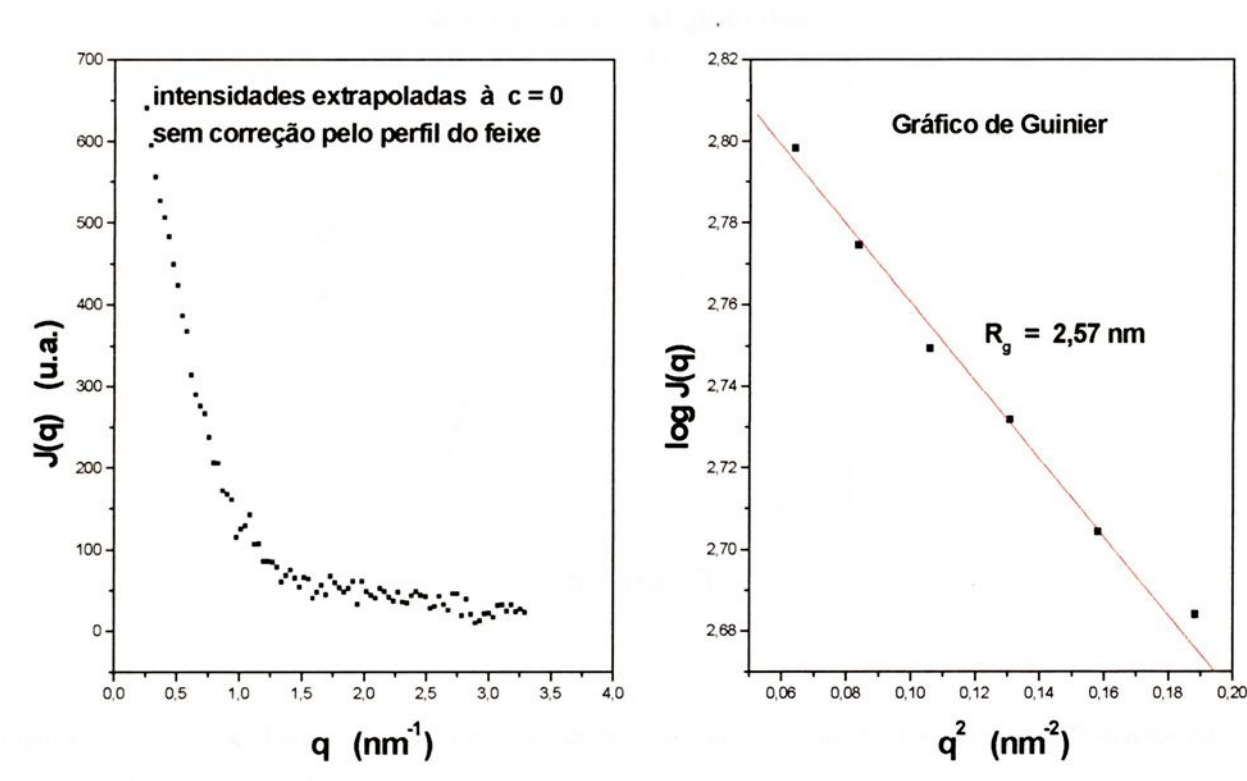


Figura 7.6: intensidade extrapolada à concentração zero e gráfico de Guinier, sem correção pelo perfil do feixe.

7.2.3 - Eliminação do “background”

Como vimos, na região de altos ângulos (Porod), a intensidade de espalhamento sem correção pelo perfil do feixe tem a contribuição das flutuações na densidade eletrônica do soluto e do solvente. Para eliminar este espalhamento construímos um gráfico de $J(q) \cdot q^3 \times q^3$, conforme figura 7.7, e determinamos o coeficiente angular da reta j_b , que nos dá o valor do espalhamento “background”, o qual será subtraído da intensidade $J(q)$ experimental. A seguir construímos um novo gráfico (figura7.8).

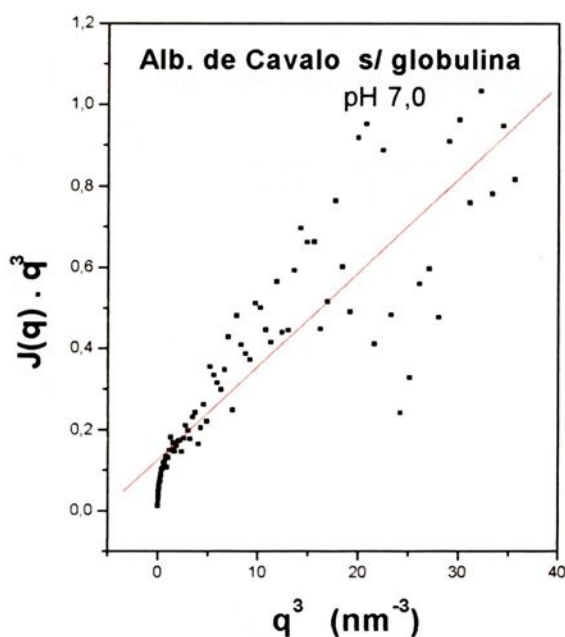


Figura 7.7: gráfico de Porod, para determinação do background e eliminação dos efeitos das flutuações na densidade eletrônica. $J_b = 37,08$.

7.2.4 - Intensidade de espalhamento corrigida

Partindo das intensidades de espalhamento extrapoladas à concentração zero $J(q)$, sem "background" e usando o programa de computação "Método das Transformadas Indiretas de Fourier (ITP)", calculamos as intensidades corrigidas $I(q)$.

Essas intensidades são corrigidas devido ao sistema de colimação e perfil do feixe.

A curva obtida para o pH 7,0 pode ser vista na figura 7.8.

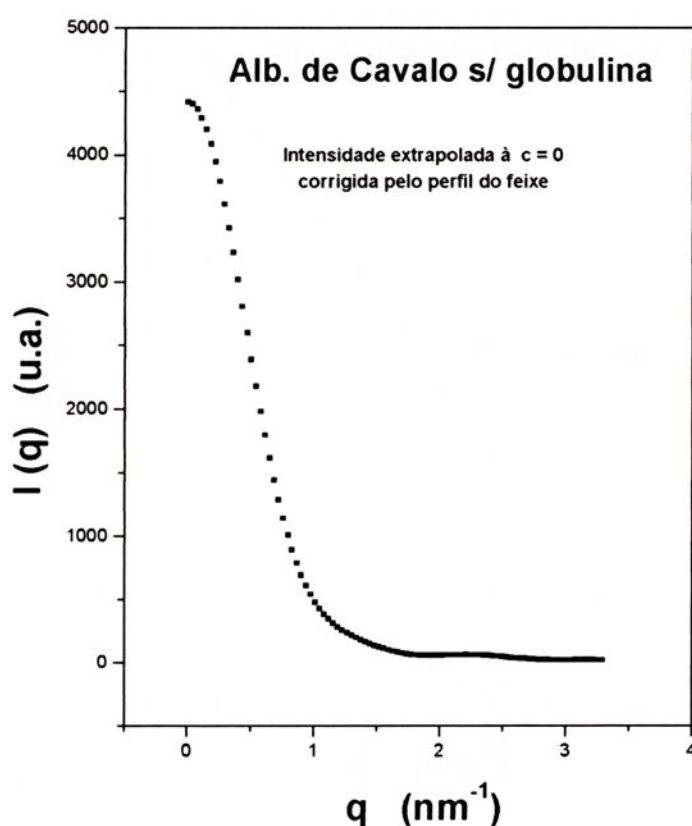


Figura 7.8: intensidade de espalhamento $I(q)$, extrapolada à concentração zero e corrigida pelo perfil do feixe.

Construindo o gráfico de Guinier a partir dessa curva corrigida, encontramos um raio de giração de 2,60 (nm), como pode ser visto na figura 7.9 abaixo, um pouco maior do que os valores encontrados a partir das curvas normalizadas pela concentração e extrapoladas à concentração zero, mas não corrigidas, 2,57 (nm).

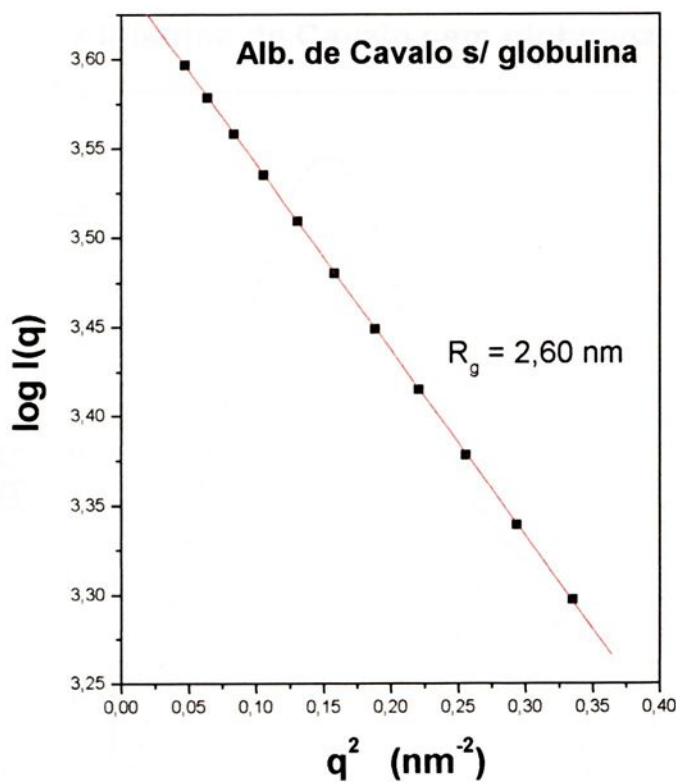


Figura 7.9: gráfico de Guinier para a curva corrigida pelo sistema de colimação e pelo perfil do feixe.

7.2.5 - Função distribuição de distâncias [P(r)] e raio de giração (R_g) pelo método integral

O programa ITP fornece também, a P(r) e o R_g, conforme as equações 5.14 e 5.29 já vistas anteriormente.

A função P(r) para a albumina de cavalo sem globulina no pH 7,0 está na figura 7.10.

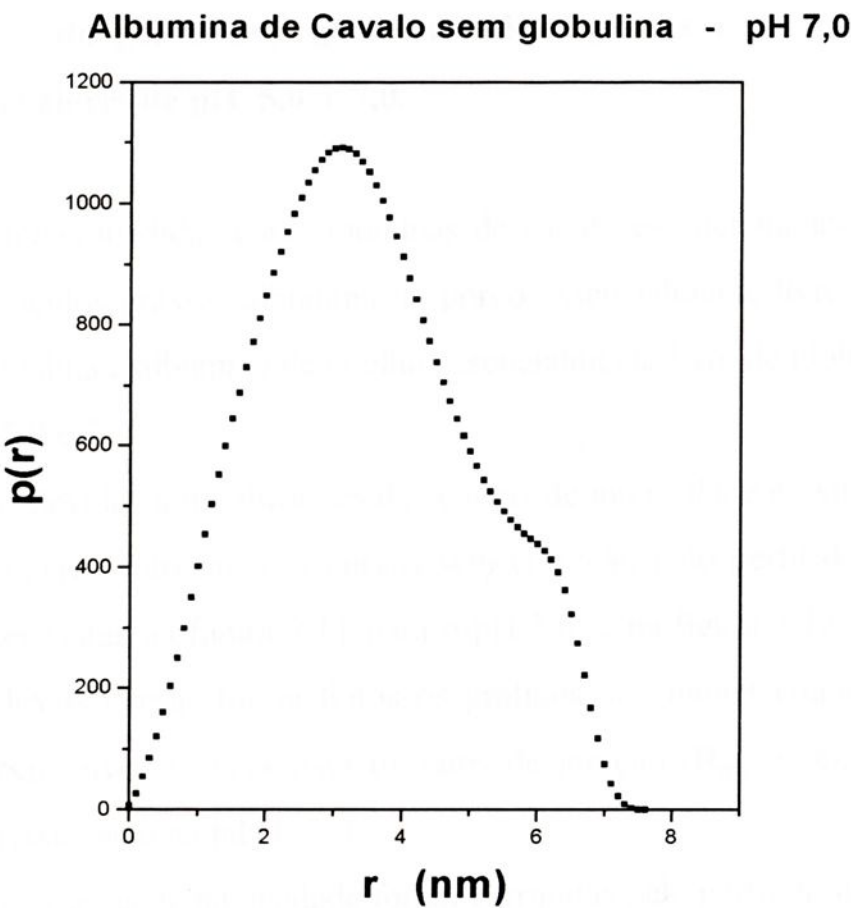


Figura 7.10: função $P(r)$ para a albumina de cavalo sem globulina no pH 7,0.

O R_g obtido pelo ITP para a albumina de cavalo sem globulina no pH 7,0 foi de 2,64 nm, para uma dimensão máxima de 7,5 nm, aproximadamente.

7.3 - Resultados para as albuminas de cavalo sem globulina, de cavalo sem ácidos graxos, de porco sem globulina/ácidos graxos e de coelho sem globulina, nos valores de pH 5,0 e 7,0.

Foram feitas medidas com albuminas de cavalo essencialmente livres de globulina e de ácidos graxos, albumina de porco essencialmente livre de ácidos graxos e de globulina e albumina de coelho essencialmente livre de globulina, nos valores de pH 5,0 e 7,0.

Após as devidas normalizações das curvas de intensidade e extrapolações à concentração zero, obtivemos as curvas sem correção pelo perfil do feixe, as quais podem ser vistas na figura 7.11 para o pH 5,0, e na figura 7.12 para o pH 7,0. A partir destas curvas foram feitos os gráficos de Guinier (figuras 7.13 e 7.14), cujos respectivos valores para os raios de giração (R_{gGUI}) sem correção pelo perfil do feixe estão na tabela 7.1.

Depois as curvas de intensidade foram corrigidas pelo perfil do feixe e pelo sistema de colimação (programa ITP), e podem ser vistos na figura 7.15 para o pH 5,0 e na figura 7.16 para o pH 7,0.

Após esta correção foram feitos novamente os gráficos de Guinier. Encontramos raios de giração ($R_{gGUIcorr}$) variando conforme tabela 7.1 abaixo. Os gráficos de Guinier estão nas figuras 7.17 e 7.18.

O programa ITP forneceu, também, as funções distribuição de distâncias $P(r)$ e os raios de giração R_{gITP} para as albuminas citadas, as quais estão nas figuras 7.19 e 7.20 e na tabela 7.1, respectivamente. Dos gráficos das funções $P(r)$ encontramos os valores para as dimensões máximas das albuminas, os quais estão na tabela 7.2.



Albumina	pH	R _g GUI (nm)	R _g GUIcorr. (nm)	R _g ITP (nm)
cavalo sem globulina	5,0	2,71	2,91	2,94
	7,0	2,57	2,60	2,64
cavalo sem ácidos graxos	5,0	2,89	2,93	2,98
	7,0	2,61	2,64	2,66
porco sem ác. graxos/globulina	5,0	2,84	2,86	2,89
	7,0	2,73	2,75	2,79
coelho sem globulina	5,0	2,98	3,05	3,09
	7,0	2,69	2,72	2,75

Tabela 7.1: resultados encontrados para o raio de giração das albuminas em estudo pelo método de Guinier (sem correção e após correção pelo perfil do feixe) e pelo ITP.

		Albumina			
	pH	SACg	SACag	SAP	SACo
D _{máx} (nm)	5,0	8,2	8,1	8,4	8,0
	7,0	7,4	7,4	7,7	7,9

Tabela 7.2: resultados encontrados para as dimensões máximas das diversas albuminas.

A eficiência do ajuste feito pelo programa ITP pode ser observada pela comparação entre a curva experimental e a curva gerada pelo programa, a partir das funções “β-Splines”, (figuras 7.21 e 7.22), como descrito no item 6.1 do capítulo 6. A oscilação existente na parte final das curvas são efeitos de terminação devidos à flutuação na densidade eletrônica da solução.

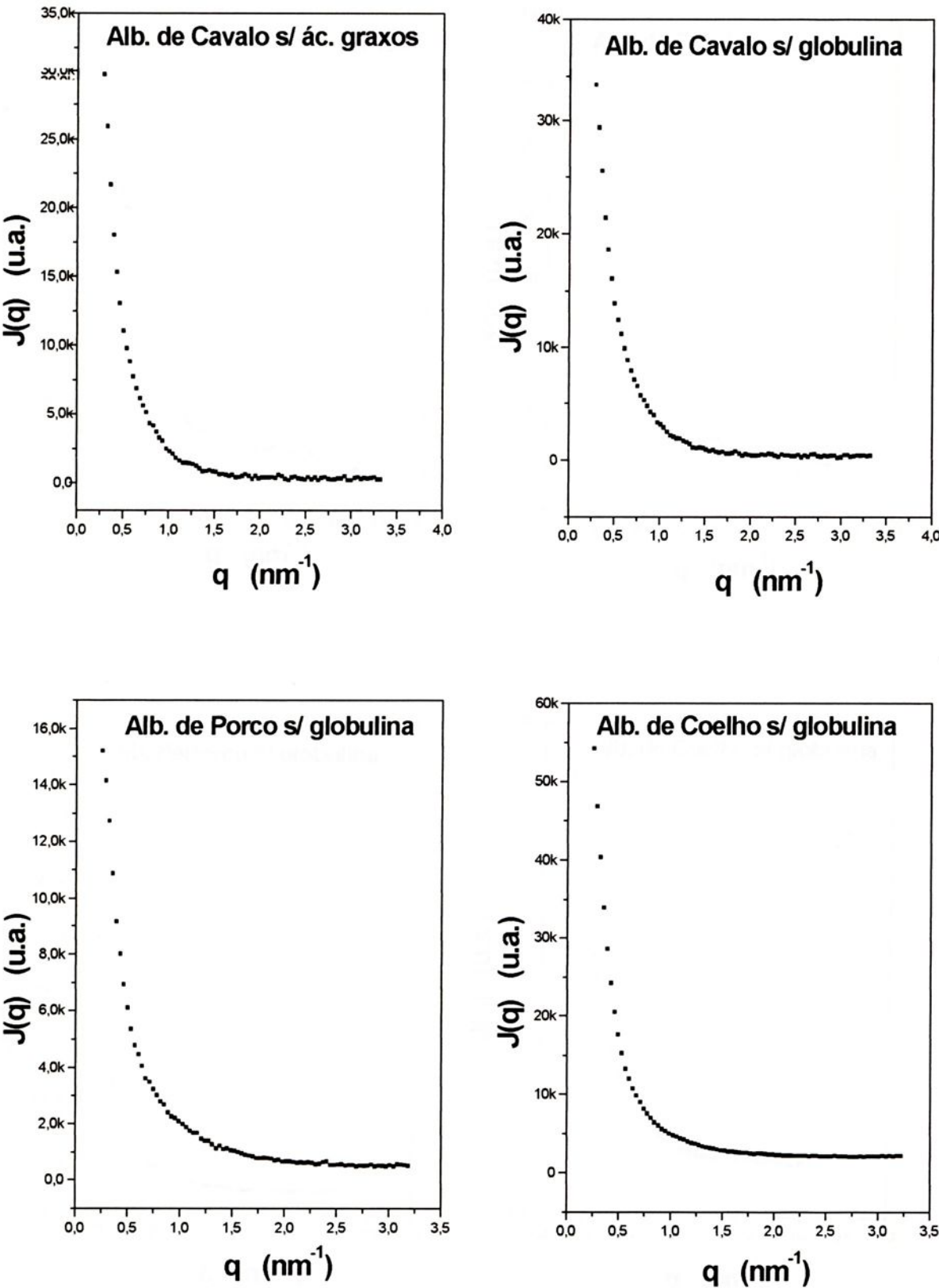


Figura 7.11: intensidades de espalhamento normalizadas pela concentração e extrapoladas à concentração zero, sem correção pelo perfil do feixe, para as várias albuminas no pH 5,0.

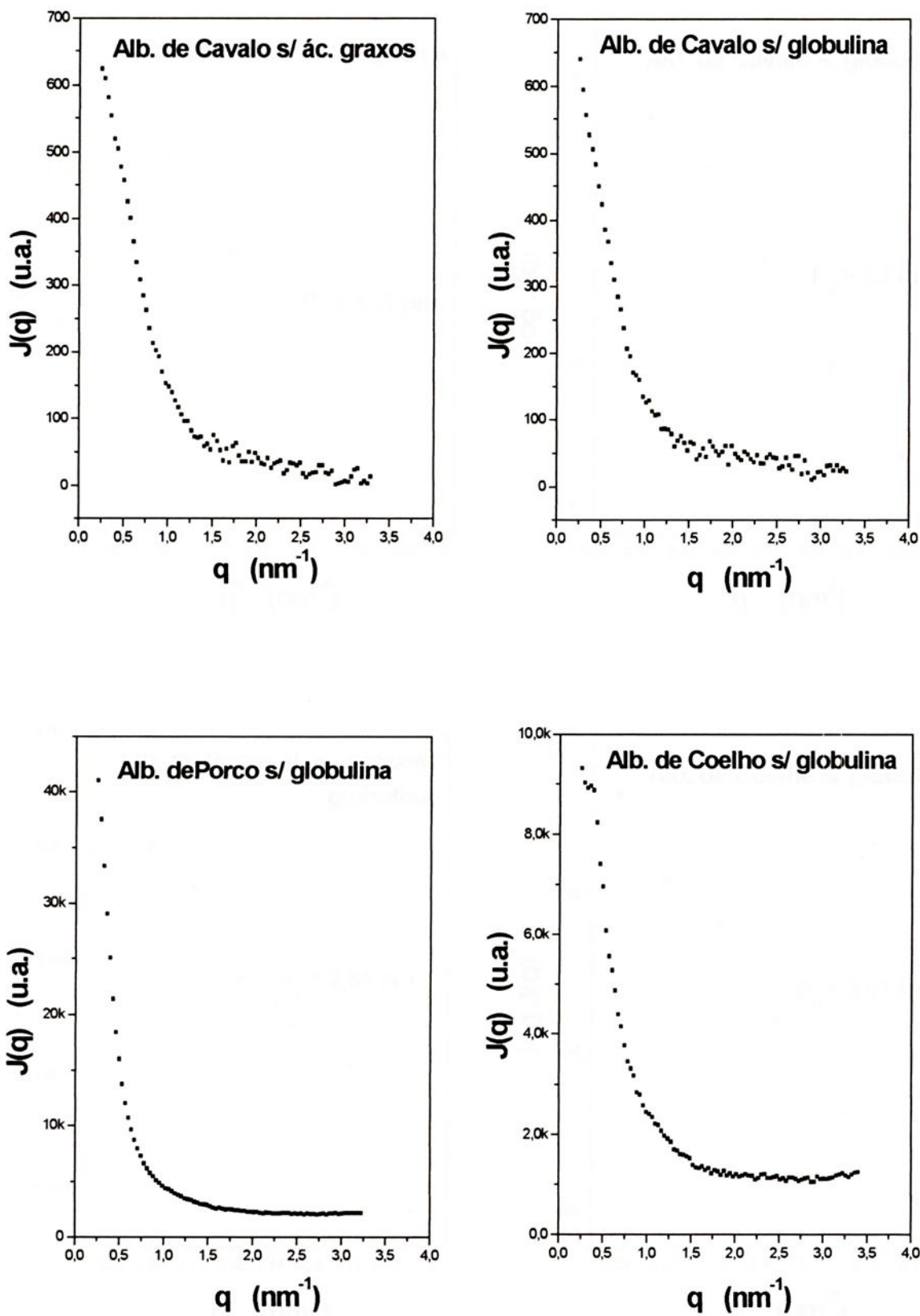


Figura 7.12: intensidades de espalhamento normalizadas pela concentração e extrapoladas à concentração zero, sem correção pelo perfil do feixe, para as várias albuminas no pH 7,0.

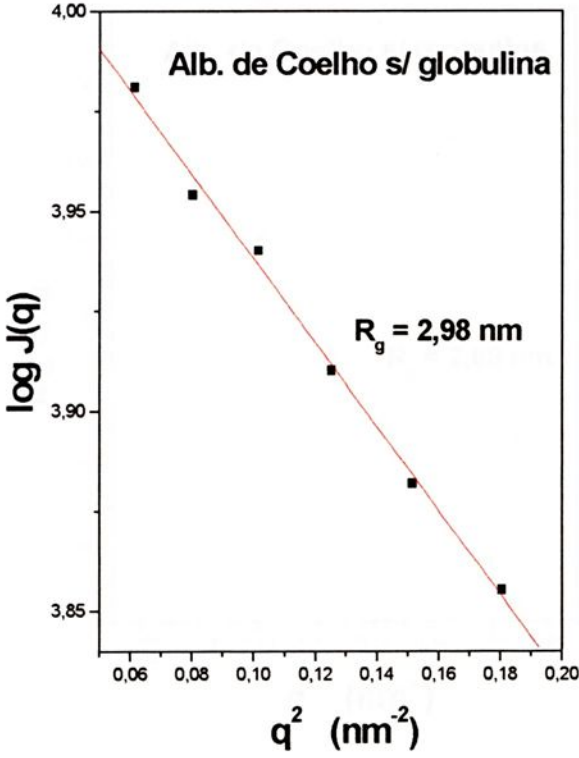
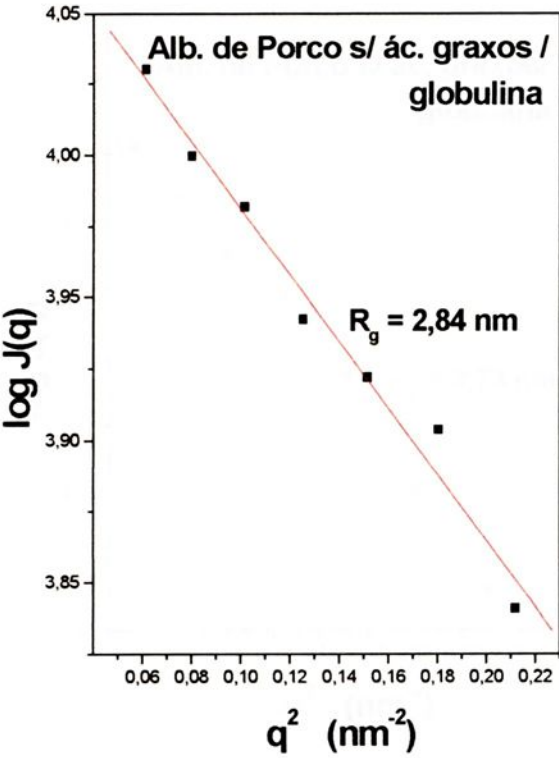
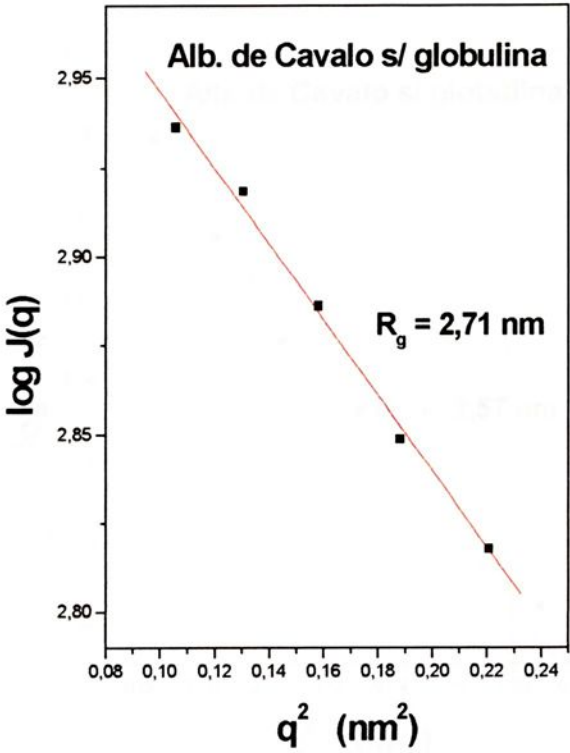
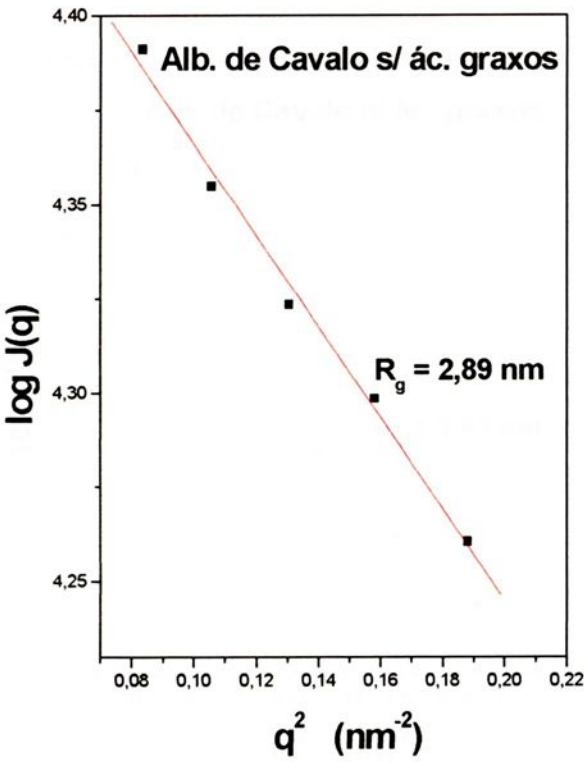


Figura 7.13: gráficos de Guinier, gerados a partir das intensidades de espalhamento sem correção pelo perfil do feixe (ITP), para as albuminas no pH 5,0.

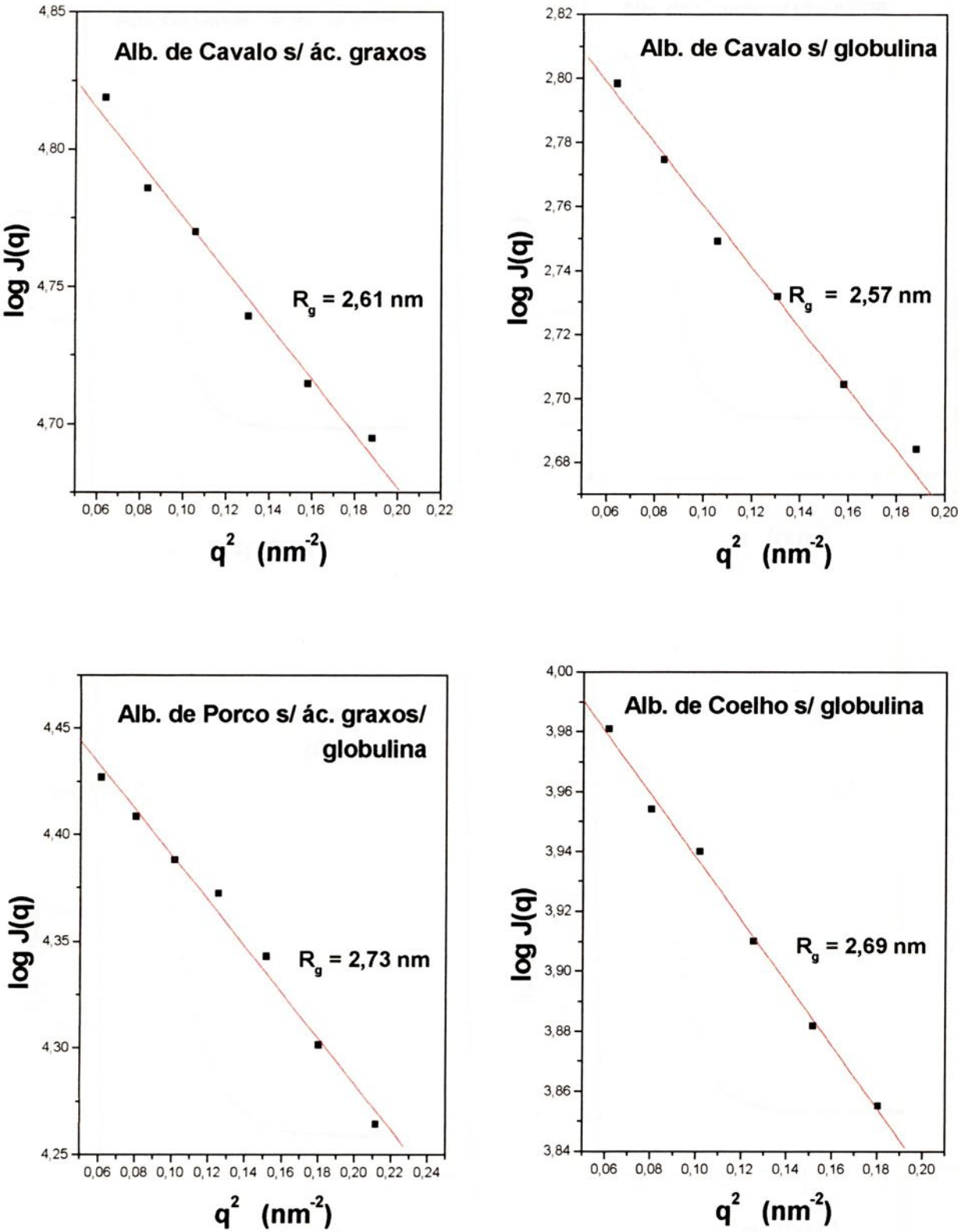


Figura 7.14: gráficos de Guinier, gerados a partir das intensidades de espalhamento sem correção pelo perfil do feixe (ITP), para as albuminas no pH 7,0.

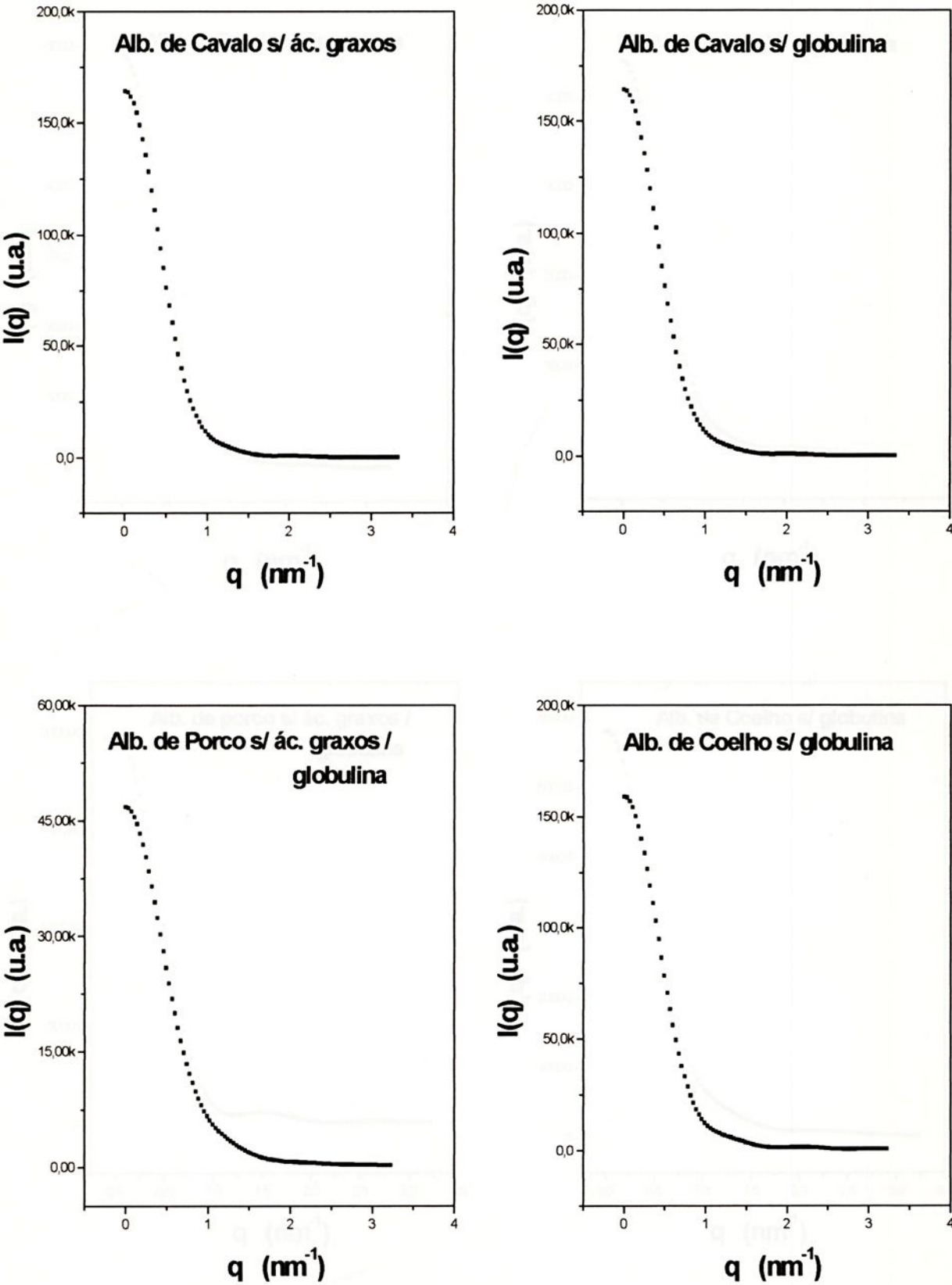


Figura 7.15: intensidades de espalhamento corrigidas pelo ITP, para as várias albuminas no pH 5,0.

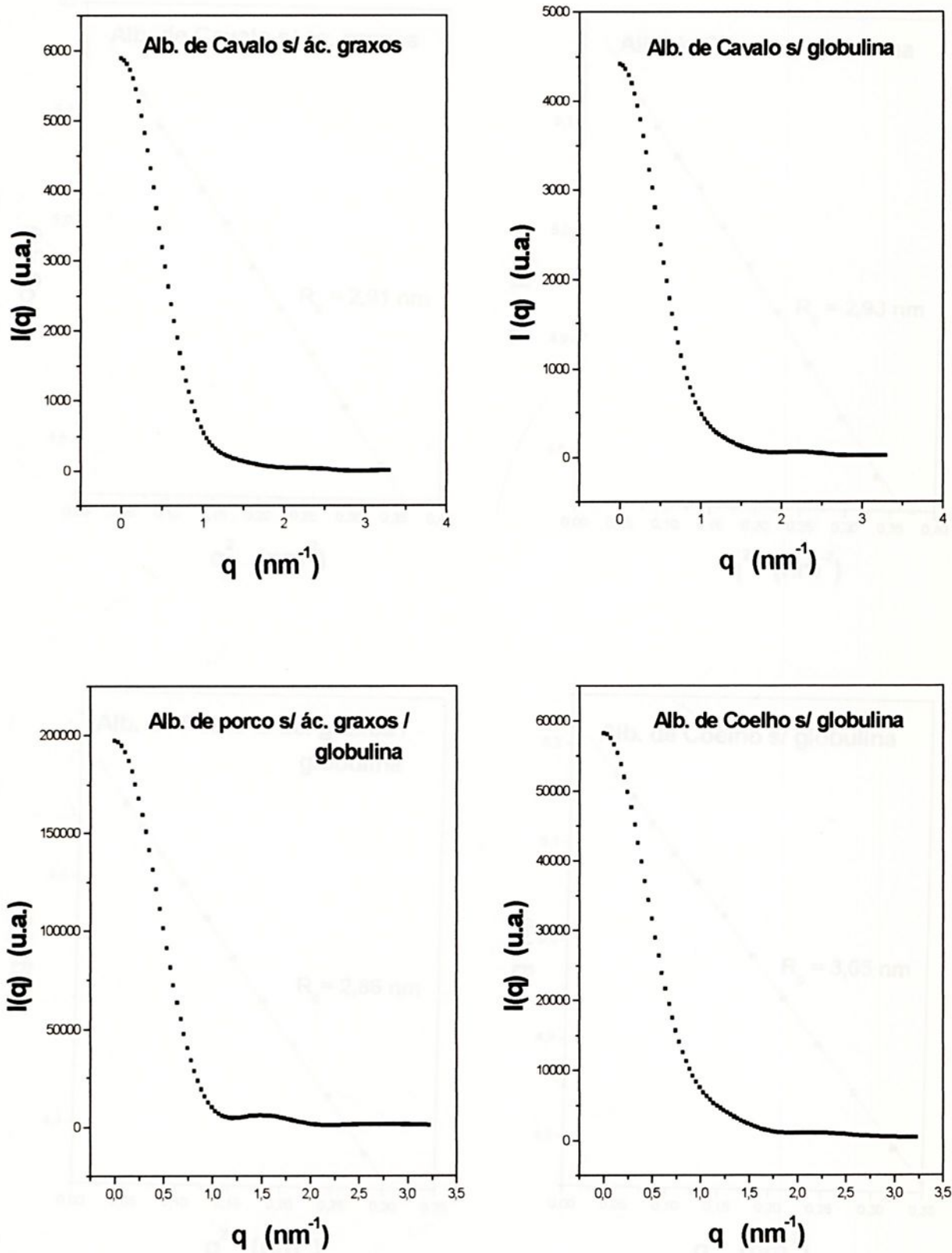


Figura 7.16: intensidades de espalhamento corrigidas pelo ITP, para as várias albuminas no pH 7,0.

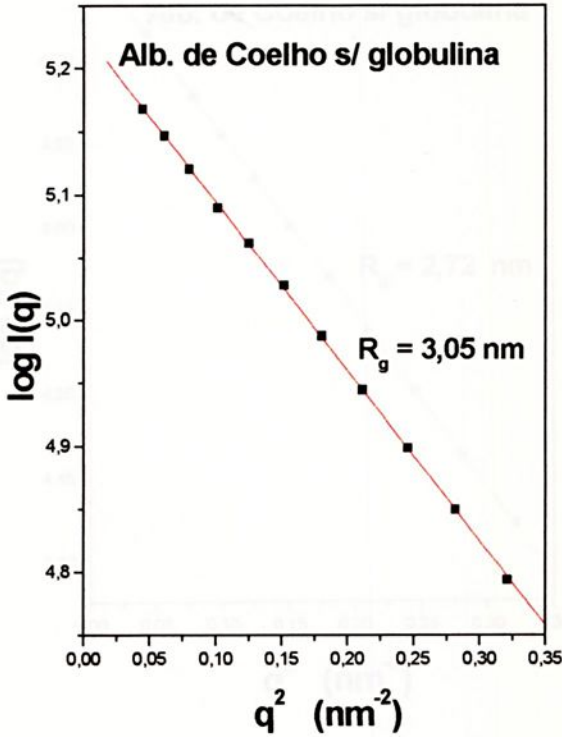
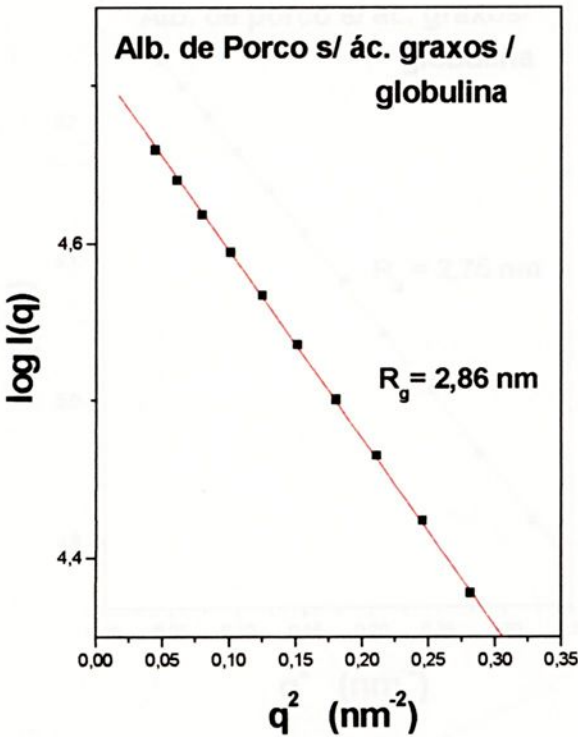
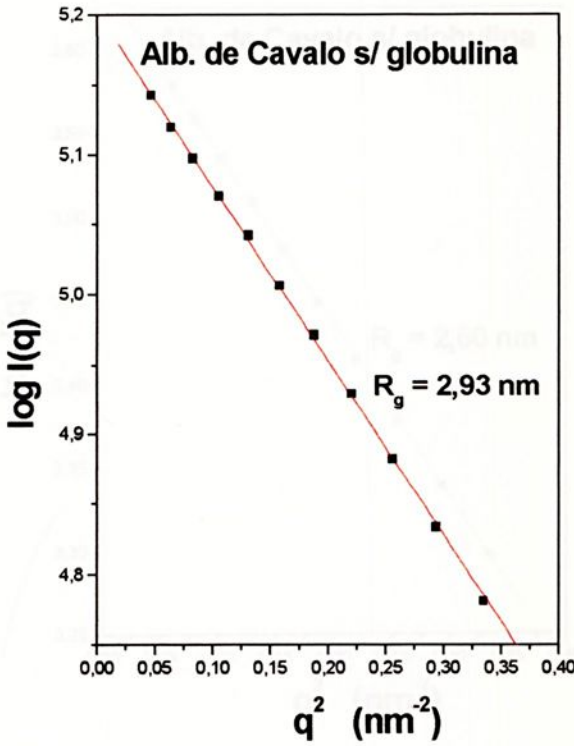
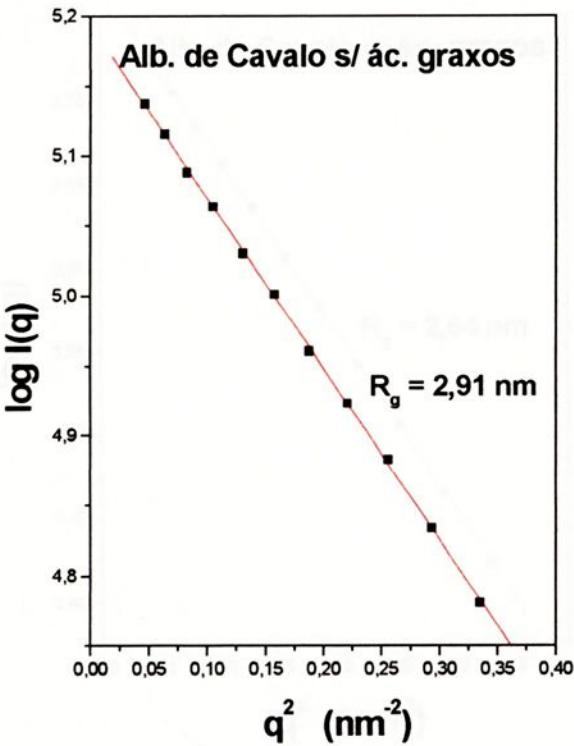


Figura 7.17: gráficos de Guinier, gerados a partir das intensidades de espalhamento corrigidas pelo ITP, para as albuminas no pH 5,0.

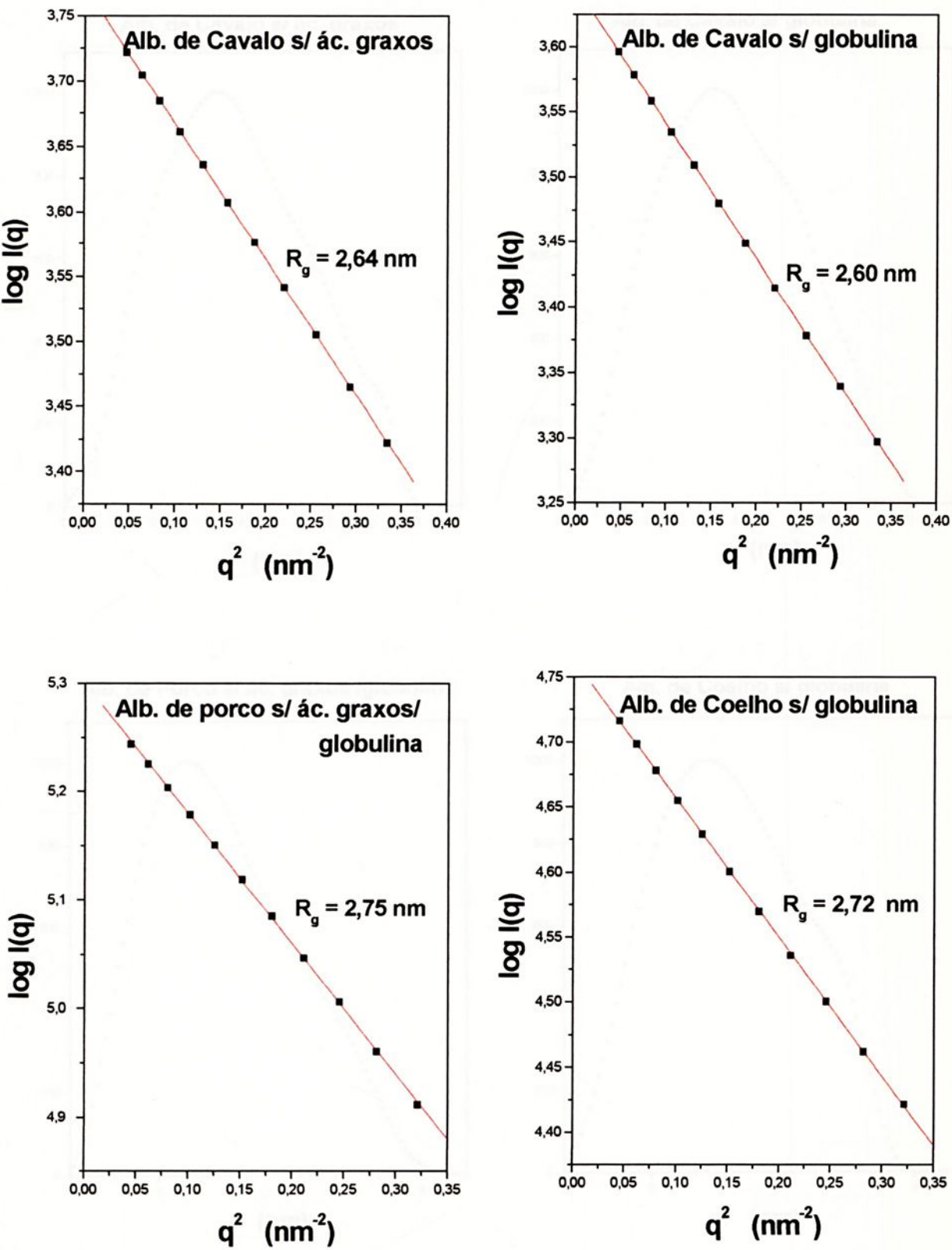


Figura 7.18: gráficos de Guinier, gerados a partir das intensidades de espalhamento corrigidas pelo ITP, para as albuminas no pH 7,0.

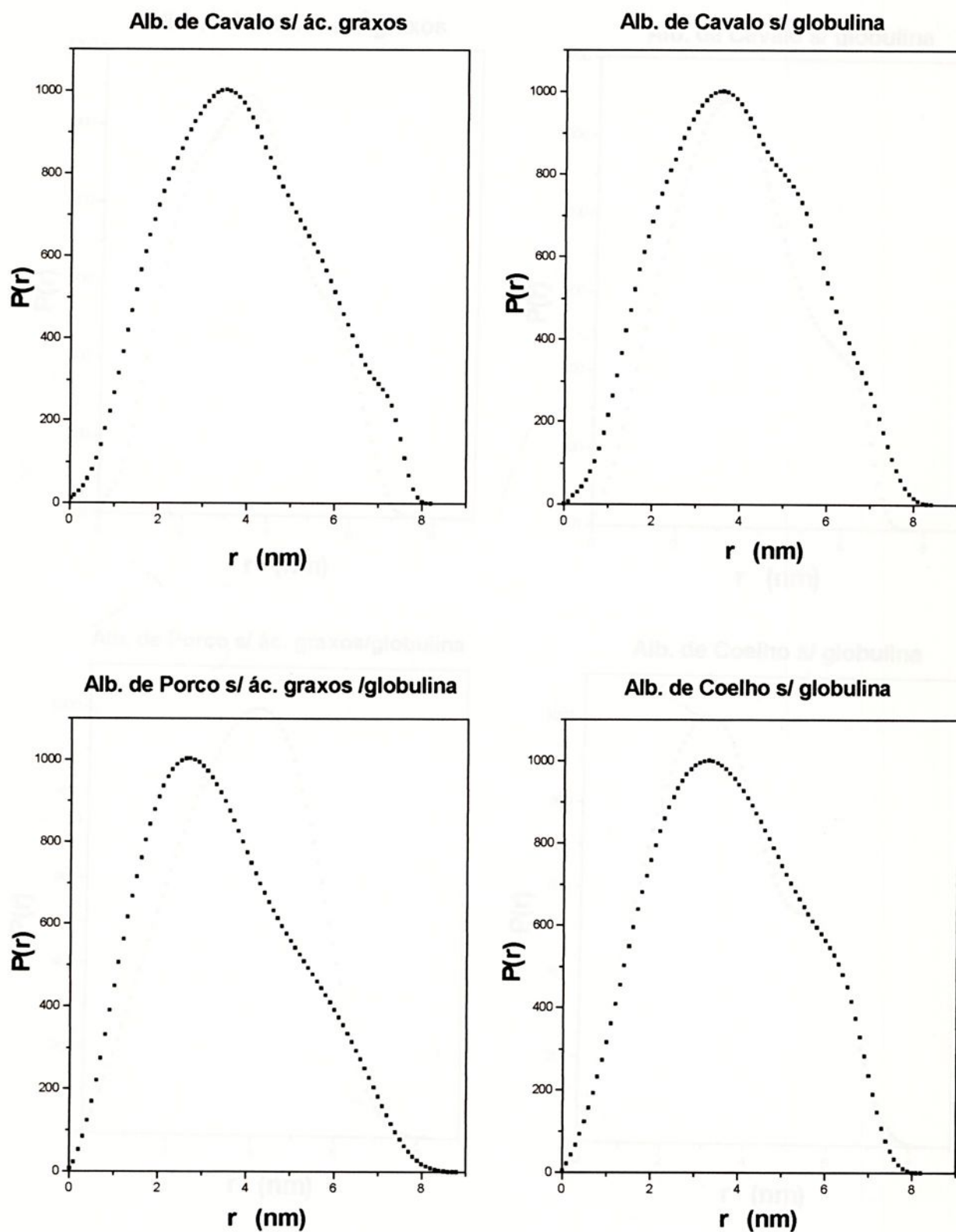


Figura 7.19: funções distribuição de distâncias $P(r)$, para as albuminas no pH 5,0.

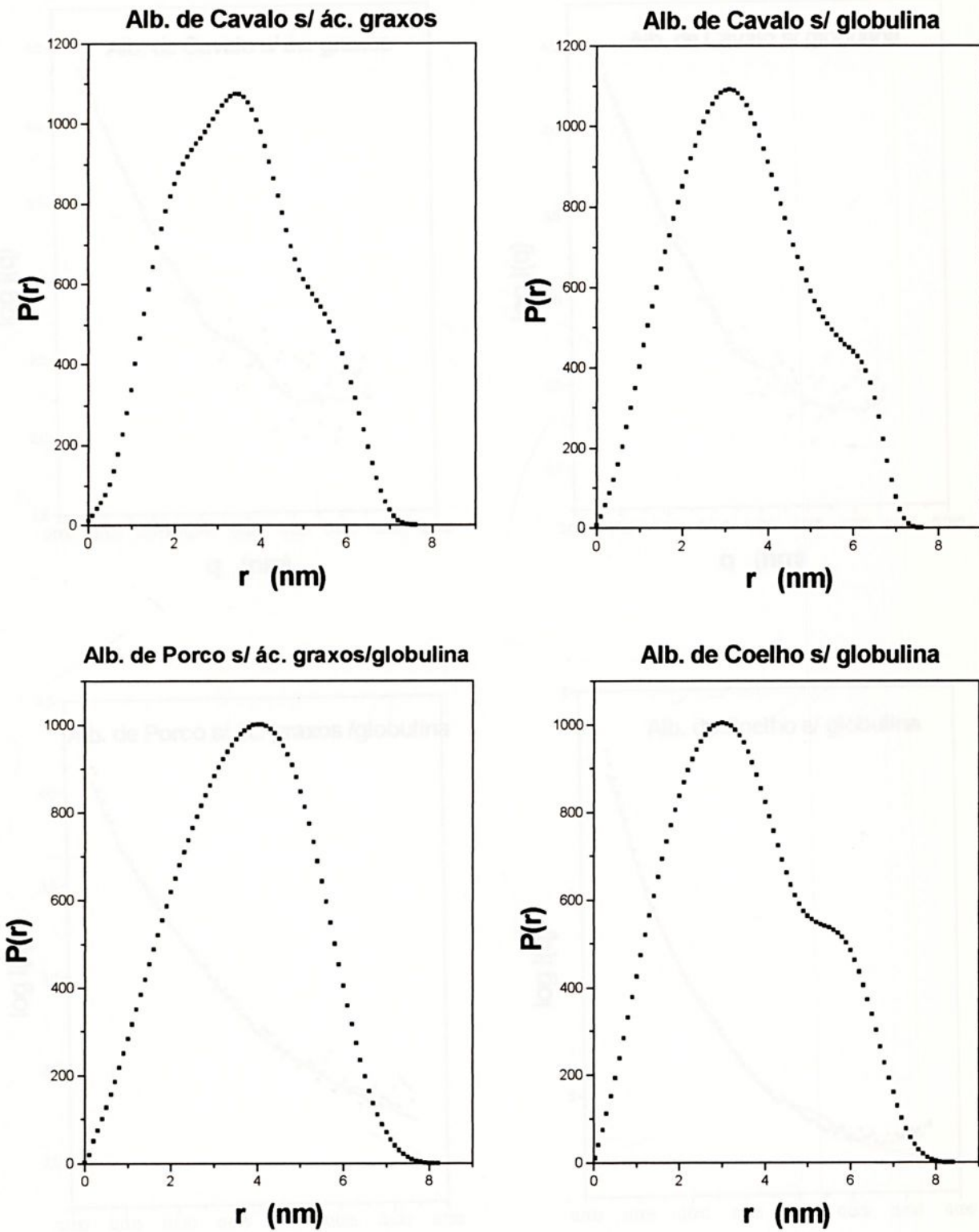


Figura 7.20: funções distribuição de distâncias $P(r)$, para as albuminas no pH 7,0.

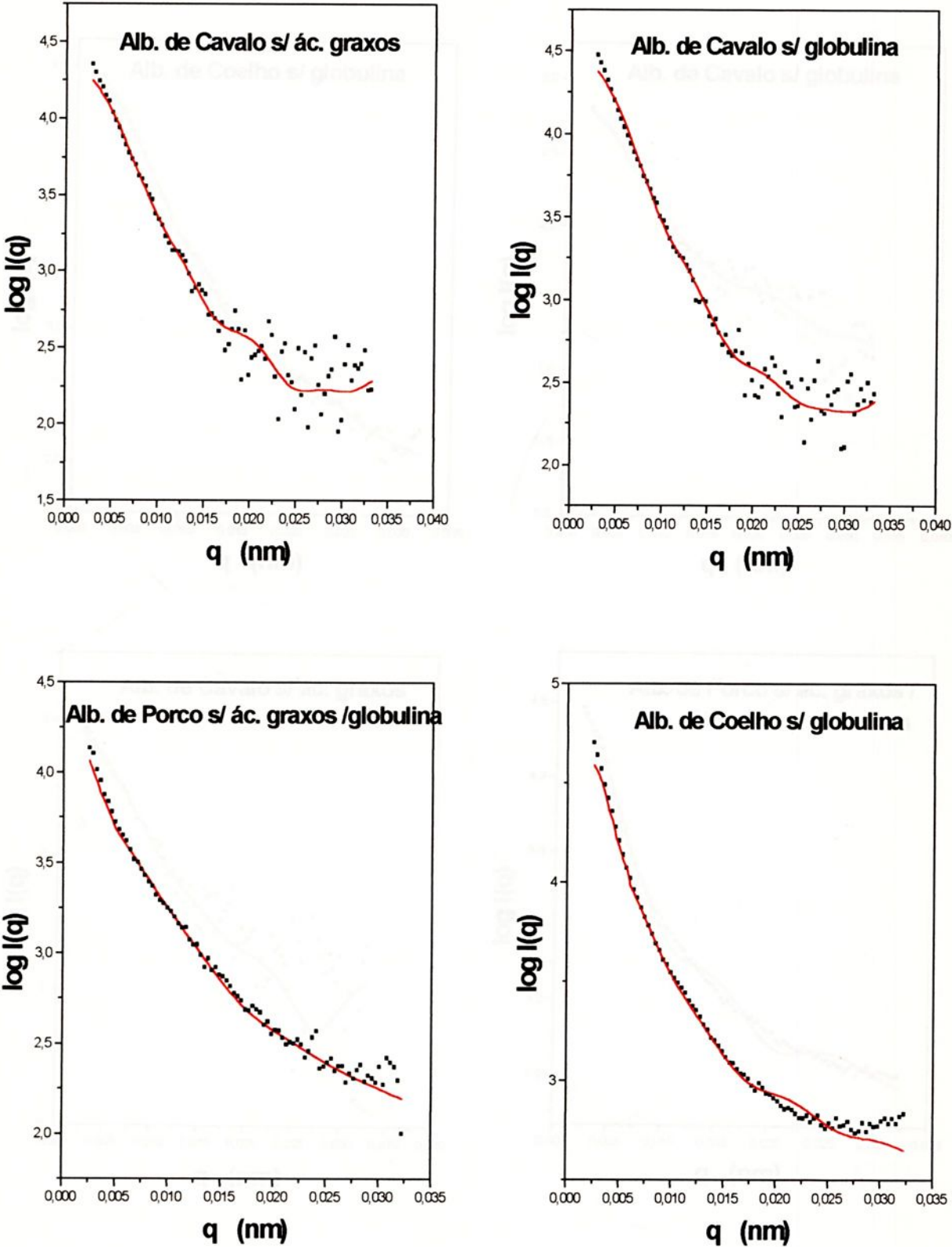


Figura 7.21: comparação entre as curvas teóricas $I_A(q)$ e as curvas experimentais $I(q)$ para o pH 5,0 das diversas albuminas.

8 - Modelos obtidos para as diversas proteínas

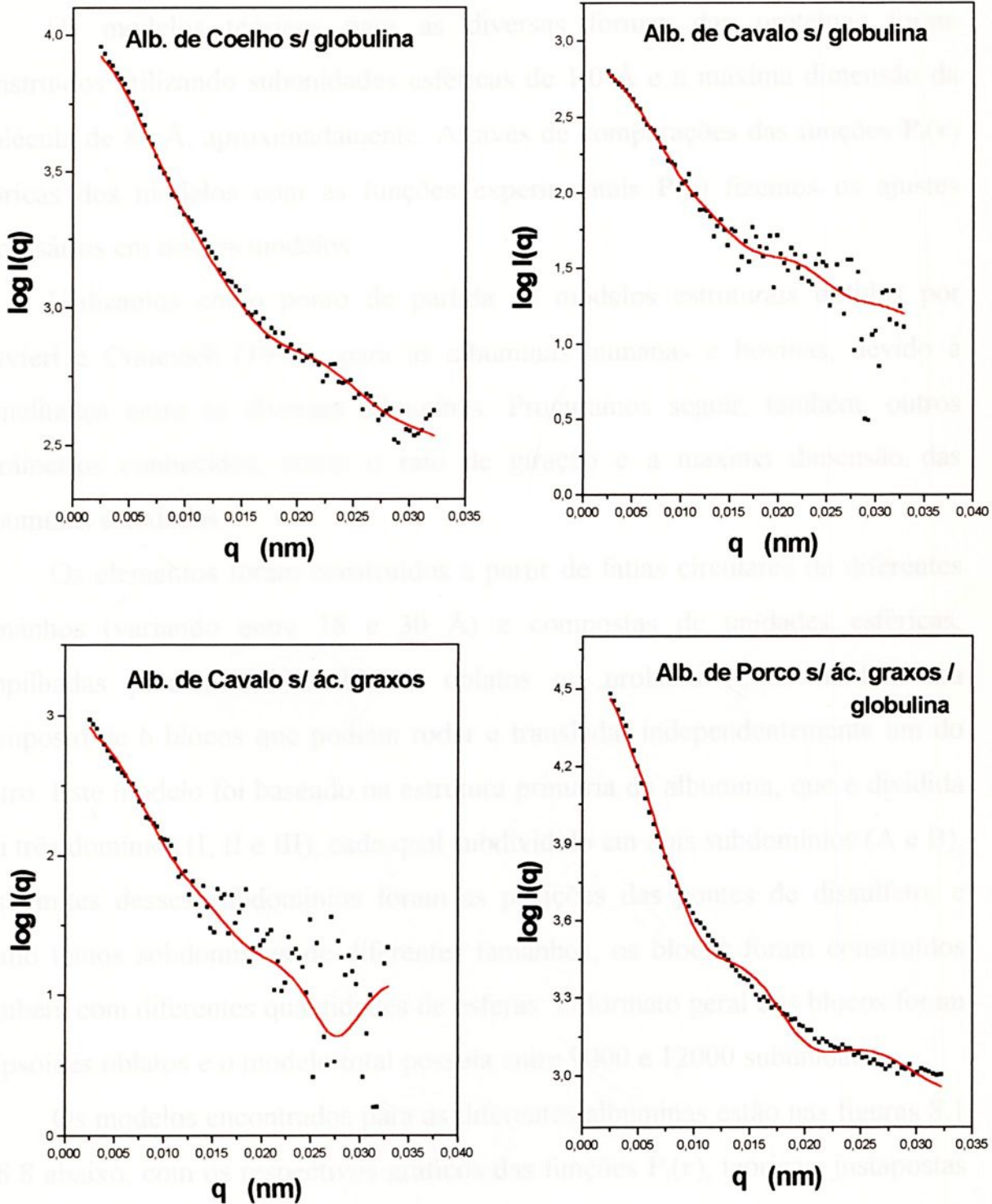


Figura 7.22: comparação entre as curvas teóricas $I_A(q)$ e as curvas experimentais $I(q)$, para o pH 7,0 das diversas albuminas.

8 - Modelos obtidos para as diversas proteínas

Os modelos teóricos para as diversas formas das proteínas foram construídos utilizando subunidades esféricas de 1,0 Å e a máxima dimensão da molécula de 80 Å, aproximadamente. Através de comparações das funções $P_t(\mathbf{r})$ teóricas dos modelos com as funções experimentais $P(\mathbf{r})$ fizemos os ajustes necessários em nossos modelos.

Utilizamos como ponto de partida os modelos estruturais obtidos por Olivieri e Craievich (1995), para as albuminas humanas e bovinas, devido à semelhança entre as diversas albuminas. Procuramos seguir, também, outros parâmetros conhecidos, como o raio de giração e a máxima dimensão das albuminas estudadas.

Os elementos foram construídos a partir de fatias circulares de diferentes tamanhos (variando entre 18 e 30 Å) e compostas de unidades esféricas, empilhadas para formarem blocos oblatos ou prolatos. Cada modelo era composto de 6 blocos que podiam rodar e transladar independentemente um do outro. Este modelo foi baseado na estrutura primária da albumina, que é dividida em três domínios (I, II e III), cada qual subdividido em dois subdomínios (A e B). Os limites desses subdomínios foram as posições das pontes de dissulfeto, e como temos subdomínios de diferentes tamanhos, os blocos foram construídos também com diferentes quantidades de esferas. O formato geral dos blocos foram elipsóides oblatos e o modelo total possuía entre 9000 e 12000 subunidades.

Os modelos encontrados para as diferentes albuminas estão nas figuras 8.1 a 8.8 abaixo, com os respectivos gráficos das funções $P_t(\mathbf{r})$, teóricas, justapostas às funções $P(\mathbf{r})$, experimentais. Devemos, no entanto, considerar que o ajuste não é perfeito, pois os modelos são obtidos por tentativas, além do fato de que a molécula de albumina não é composta por blocos maciços, como os mesmos.



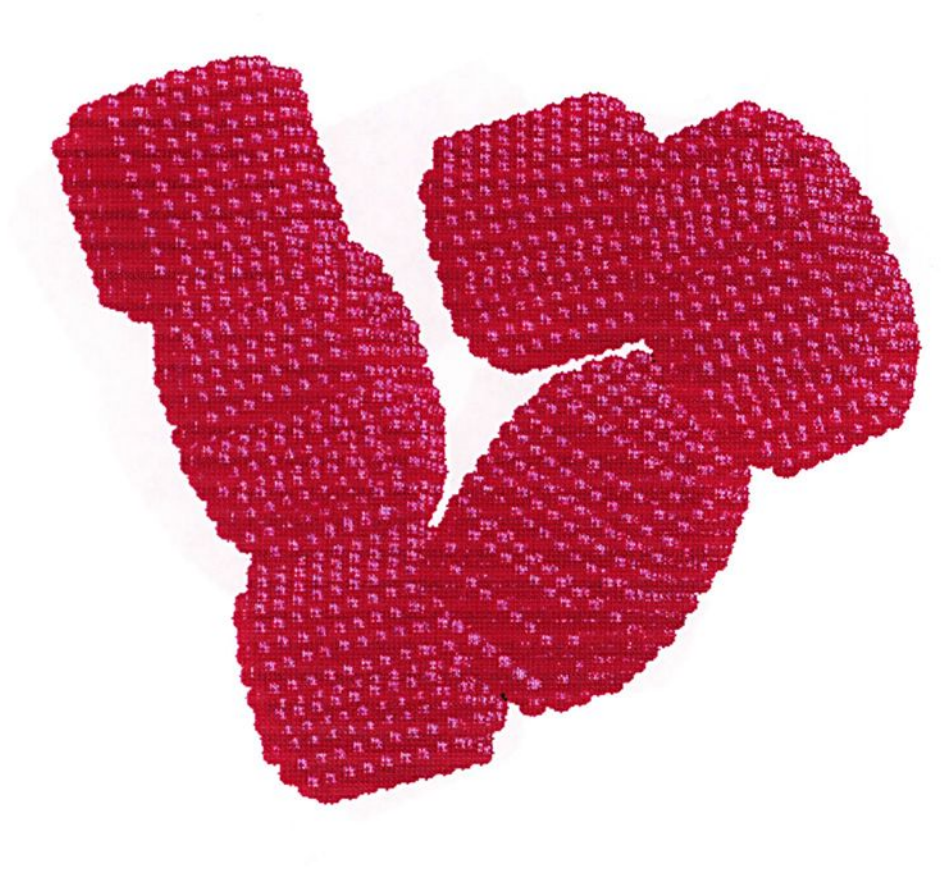
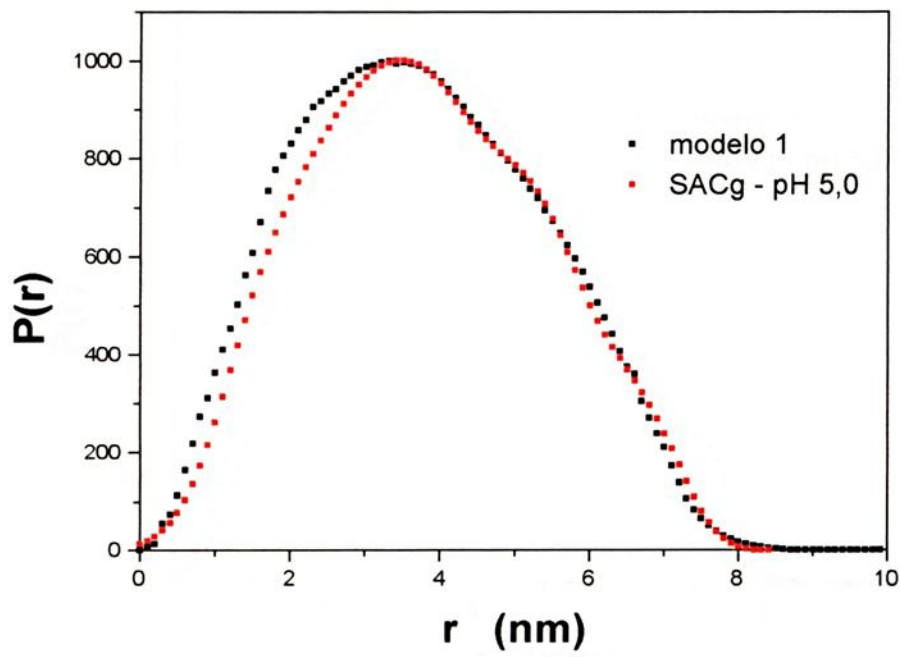


Figura 8.1: modelo obtido para a SACg (Soro Albumina de Cavalo sem globulina), no pH 5,0.

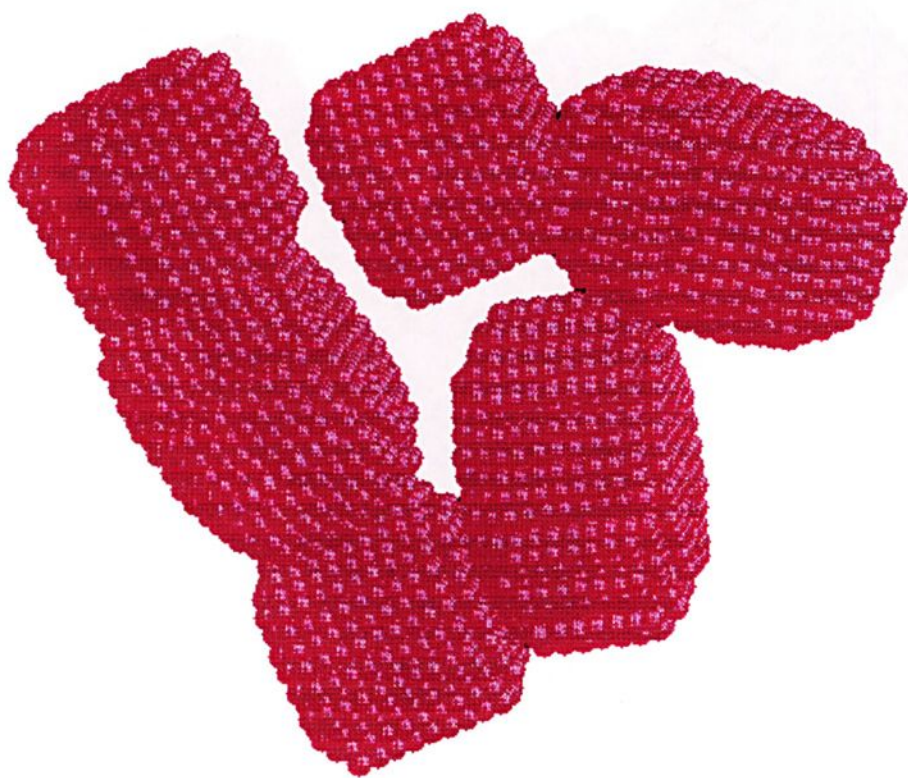
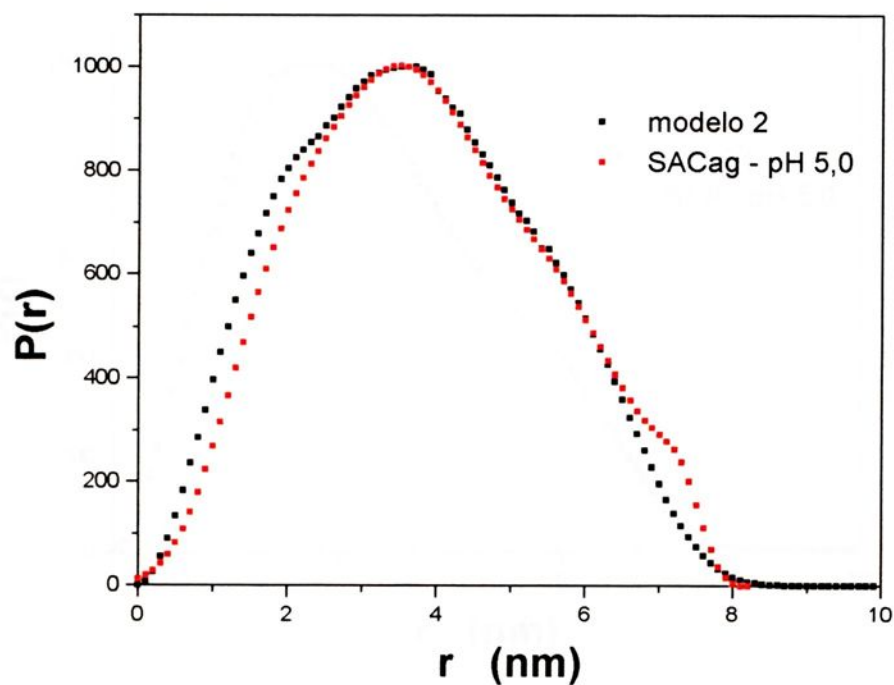


Figura 8.2: modelo obtido para a SACag (Soro Albumina de Cavalo sem ácidos graxos), no pH 5,0.

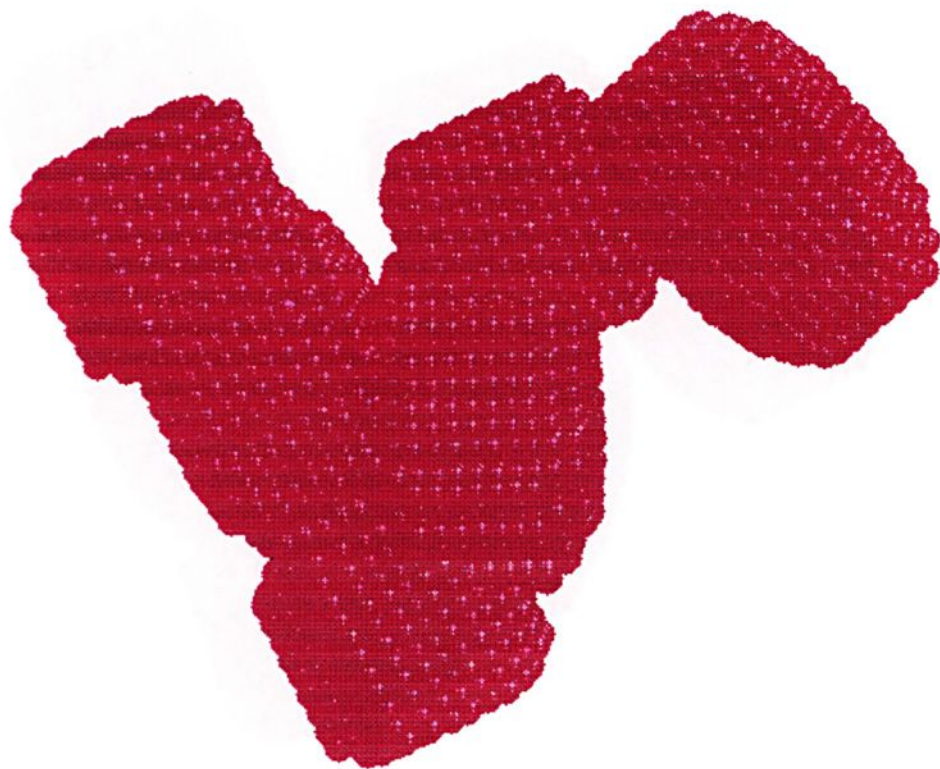
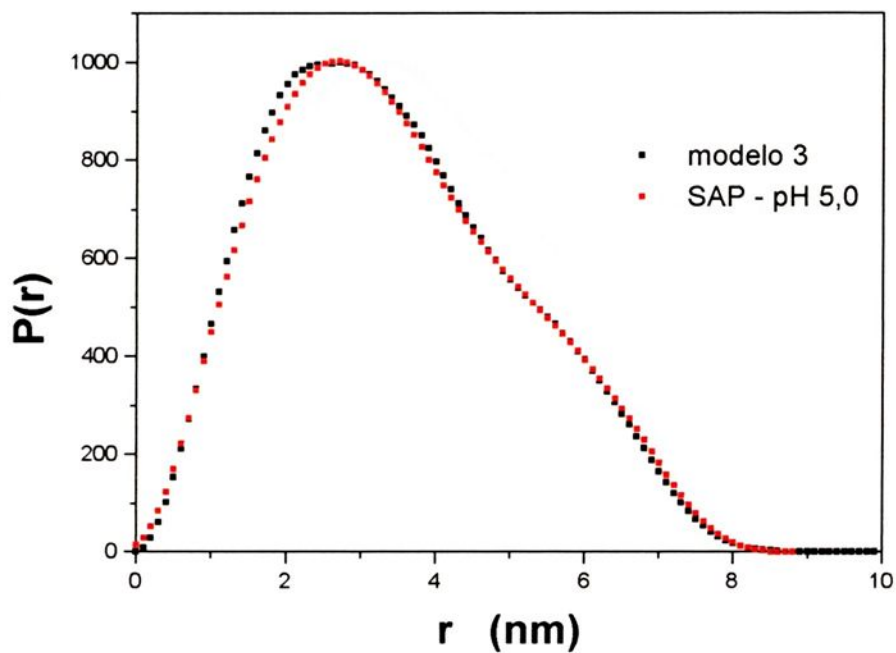


Figura 8.3: modelo obtido para a SAP (Soro Albumina de Porco, sem ácidos graxos e globulina), no pH 5,0.

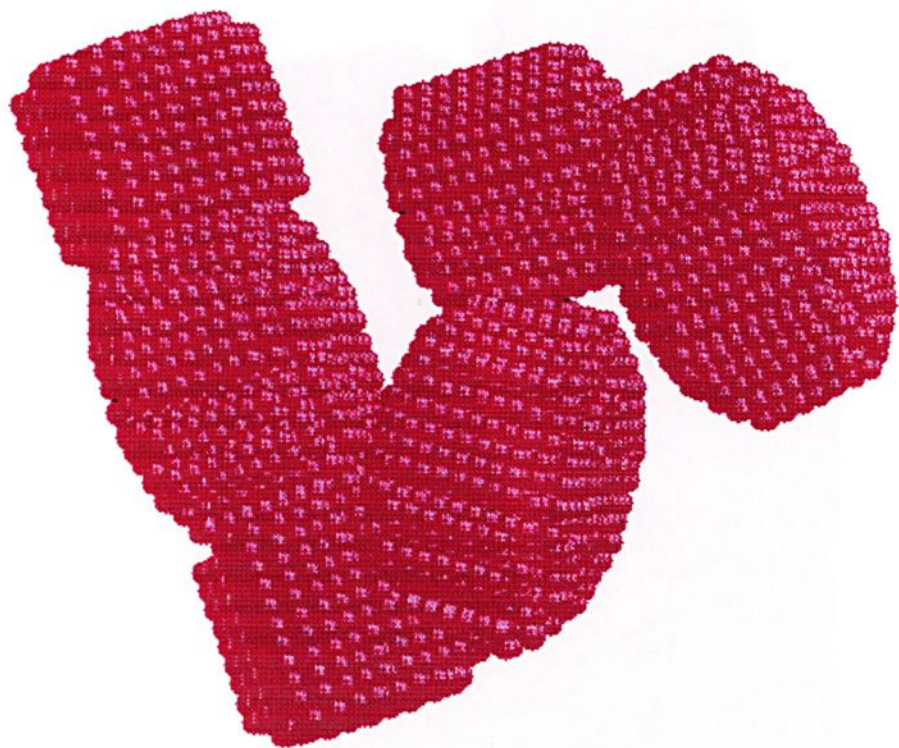
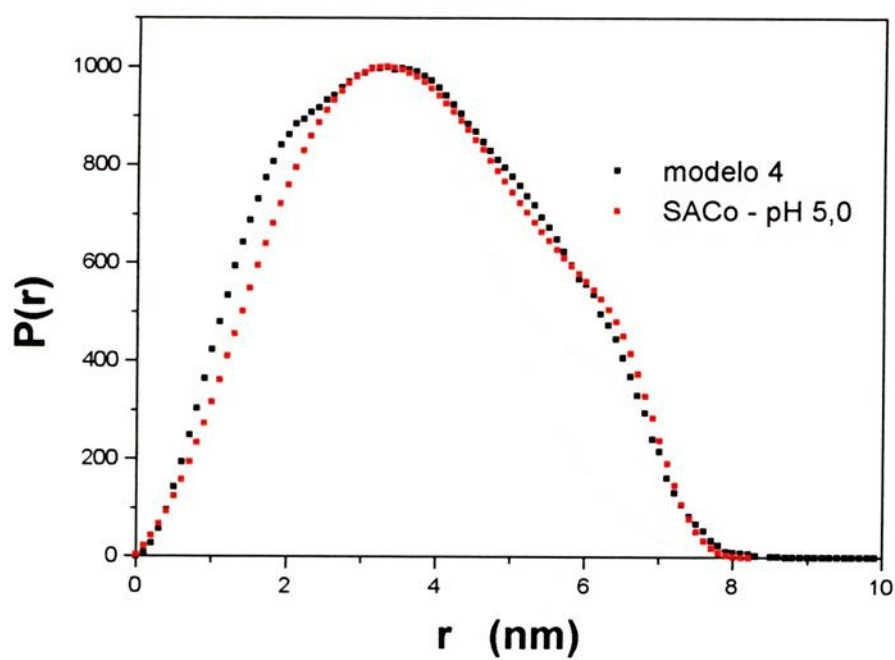


Figura 8.4: modelo obtido para a SACo (Soro Albumina de Coelho, sem globulina), no pH 5,0.

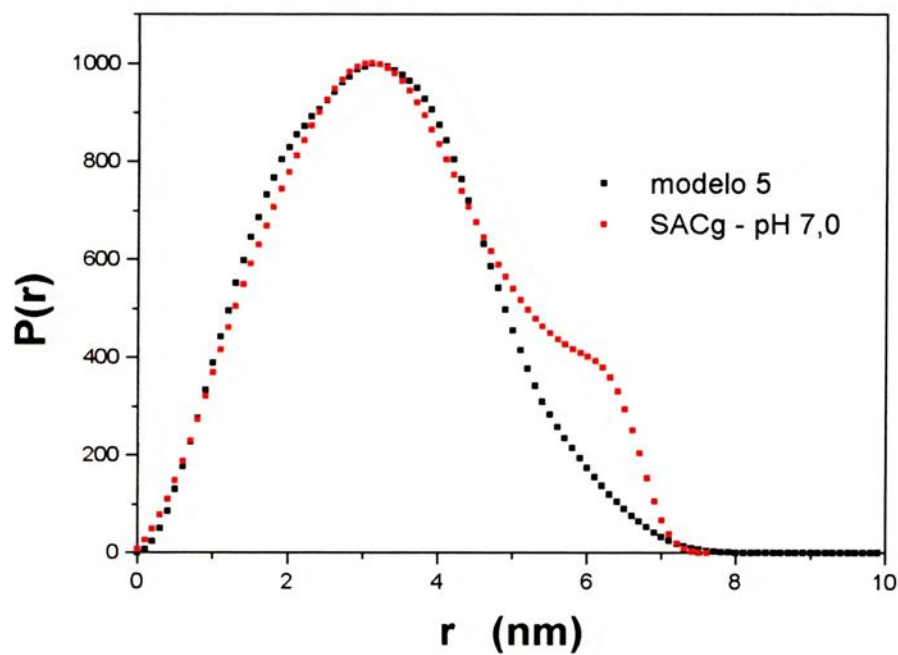


Figura 8.5: modelo obtido para a SACg (Soro Albumina de Cavalo sem globulina), no pH 7,0.

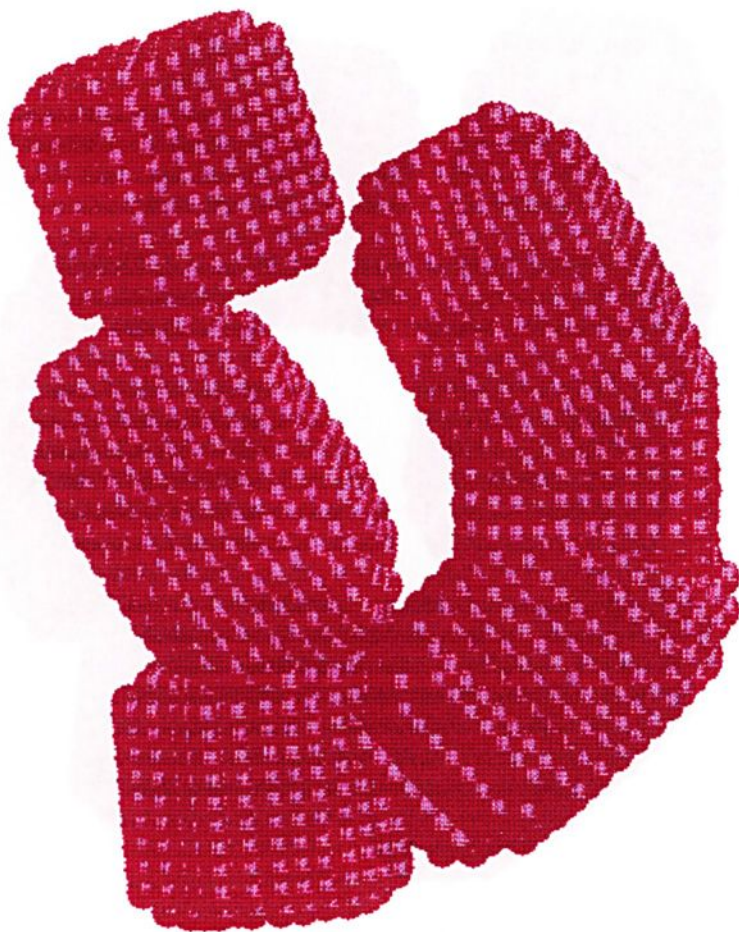
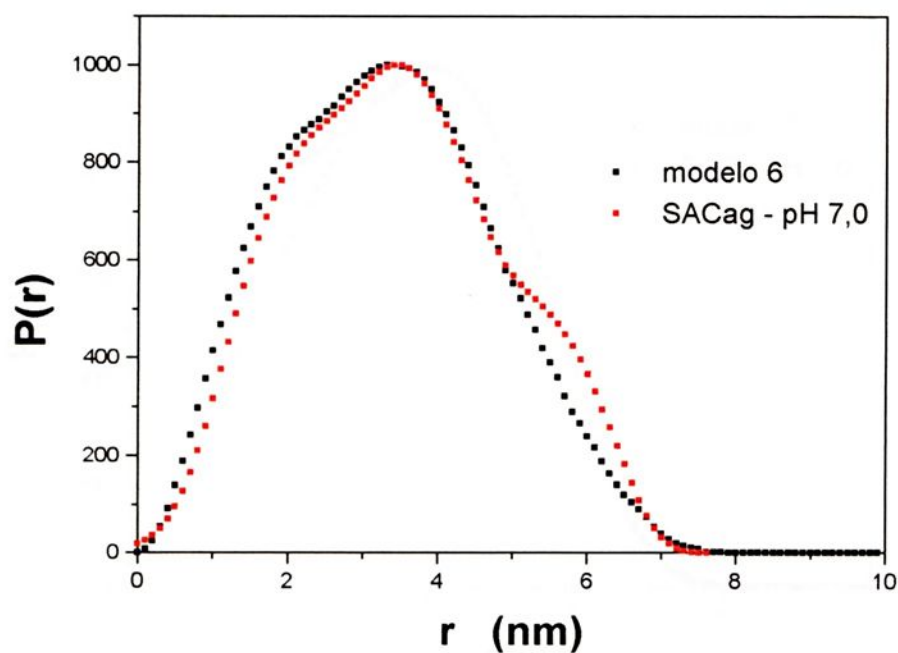


Figura 8.6: modelo obtido para a SACg (Soro Albumina de Cavalo sem globulina), no pH 7.0.

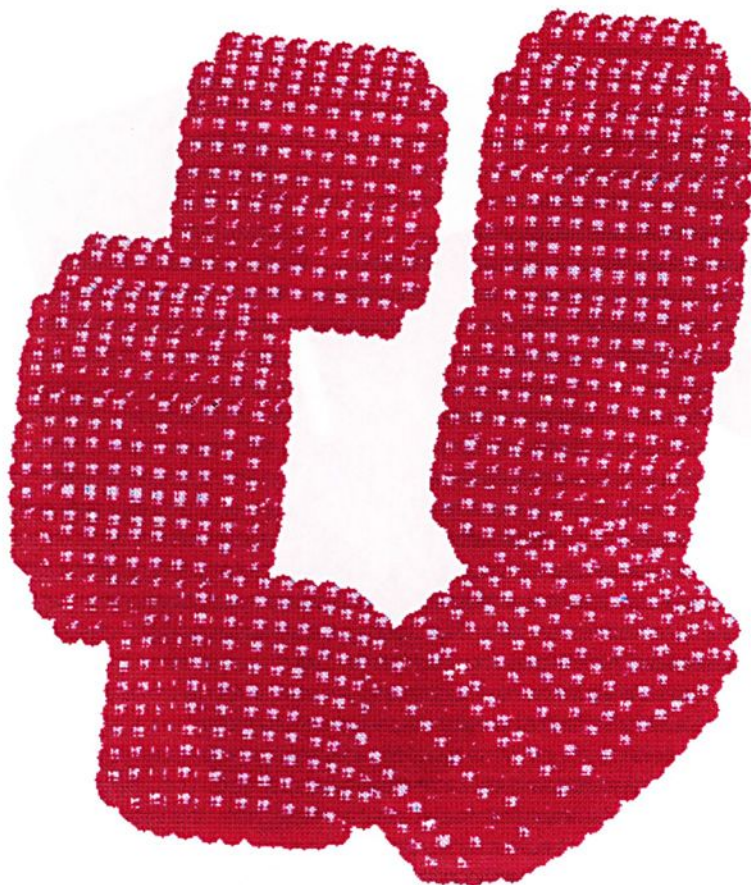
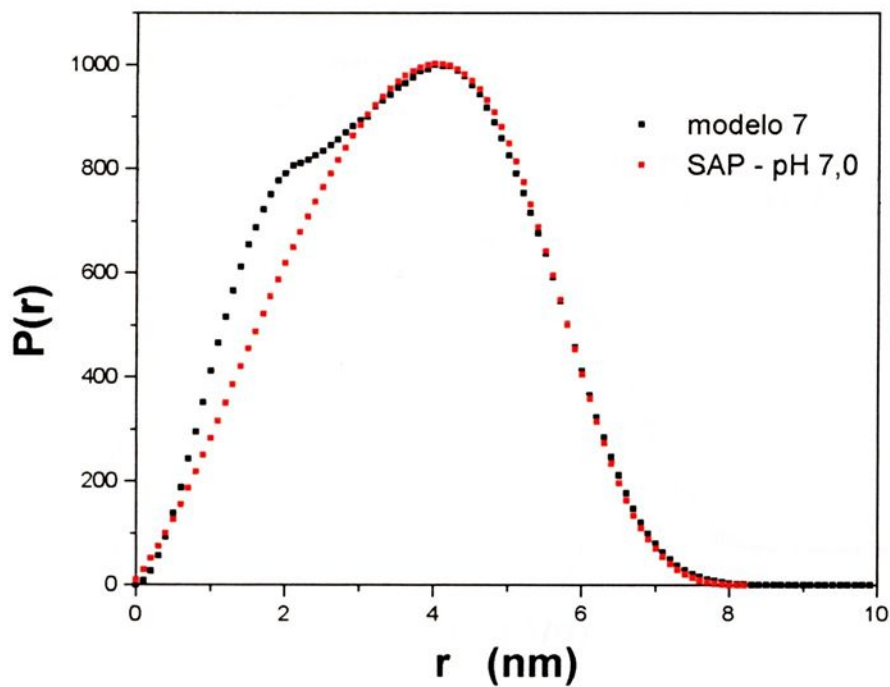


Figura 8.7: modelo obtido para a SAP (Soro Albumina de Porco, sem ác. graxos e globulina), no pH 7,0.

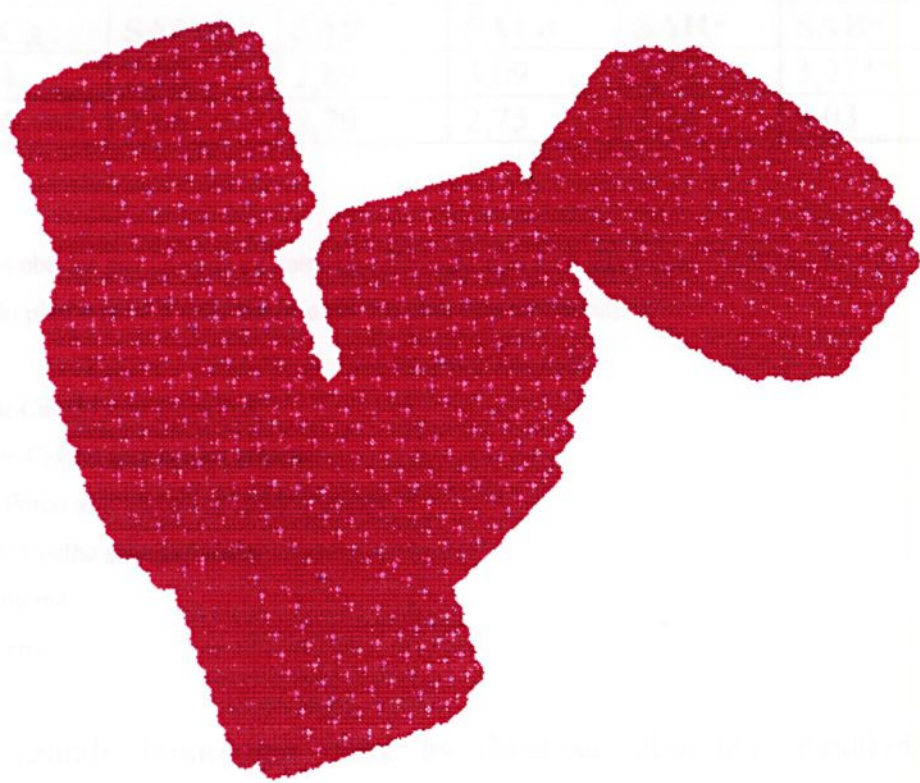
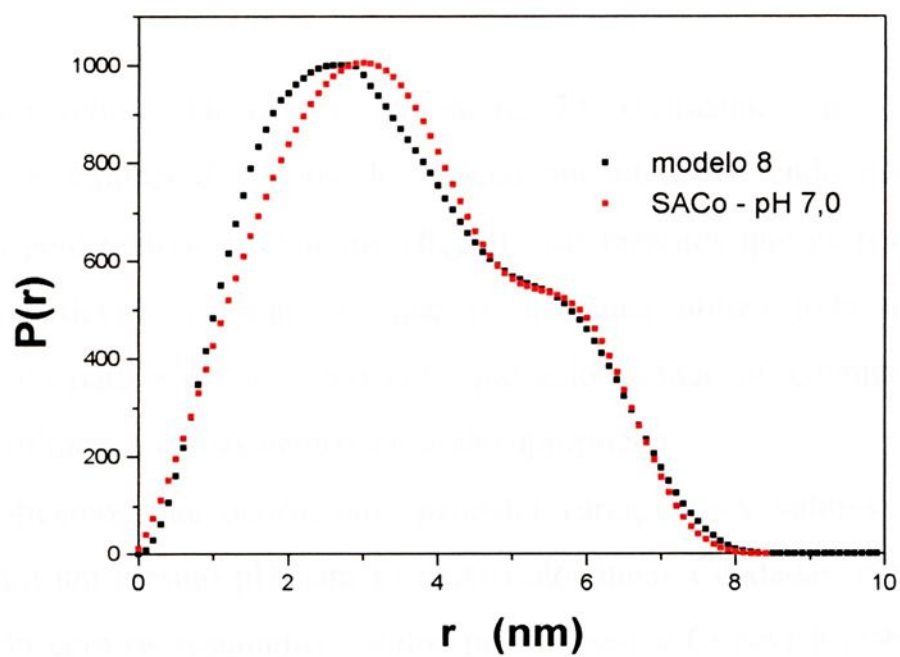


Figura 8.8: modelo obtido para a SACo (Soro Albumina de Coelho, sem globulina), no pH 7,0.



9 - Discussão

Observando a tabela 7.1, da página 79, verificamos que ocorre uma variação nos valores dos raios de giração encontrados, sendo que aqueles calculados pelo método de Guinier ($R_{g\text{Gui}}$) são menores que os resultantes do ITP ($R_{g\text{ITP}}$) devido ao fato de que o programa utiliza toda a curva de espalhamento para o cálculo, enquanto que pelo método de Guinier utilizamos apenas os primeiros canais dentro da região apropriada.

Verificamos que ocorre uma pequena variação nos valores do raio de giração para um mesmo pH para as quatro albuminas estudadas, e também em comparação com os resultados obtidos por Olivieri e Craievich (1995) para as albuminas humana e bovina, conforme tabela 9.1 abaixo:

pH		SACg	SACag	SAP	SACo	SAH*	SAB*
5,0	R_g	2,94	2,98	2,89	3,09	3,12	3,27**
7,0		2,64	2,66	2,79	2,75	3,34	3,03

tabela 9.1: * Resultados obtidos por Olivieri e Craievich (1995) para as soro albuminas Humana e Bovina.
** Resultado para o pH 4,5 (não temos o pH 5,0 para esta albumina).

- SACg : Soro Albumina de Cavalo sem globulina
- SACag : Soro Albumina de Cavalo sem ácidos graxos
- SAP : Soro Albumina de Porco sem globulina/ ácidos graxos
- SACo : Soro Albumina de Coelho sem globulina
- SAH : Soro Albumina Humana
- SAB : Soro Albumina Bovina

Apesar da grande homologia entre as diversas albuminas estudadas verificamos que as mesmas apresentam uma pequena diferença no raio de giração e na forma das funções distribuição de distâncias nos dois valores de pH.

Observamos que todas têm seu raio de giração diminuído do pH 5,0 para o pH 7,0, indicando que pode ter havido uma contração da molécula ou então uma

mudança conformacional que leva a alteração do raio de giração conforme mudamos o pH do solvente.

Notamos que, em relação aos resultados obtidos por Olivieri e Craievich, nossos dados estão compatíveis com a albumina bovina, que também tem o valor do raio de giração diminuído; quanto à albumina humana, temos da literatura que a mesma encontra-se mais distendida no pH 7,0 do que no pH 5,0.

A albumina, como vimos anteriormente, é composta de seis subunidades ou subdomínios, sendo três de cada tamanho. Os gráficos das Funções Distribuição de Distâncias $P(r)$ para as albuminas estudadas apresentam diversos picos (ou ombros), conforme vistos nas figuras 7.20 e 7.21.

Podemos verificar nesses gráficos uma certa semelhança entre elas, quanto à presença de picos (ou ombros), que aparecem ora mais pronunciados como para as albuminas de cavalo e de coelho no pH 7,0, ora mais suaves como as encontradas para o pH 5,0, ora deslocados para a esquerda como para as albuminas de cavalo para o pH 7,0, mas apesar de alguma semelhança, eles são diferentes entre si.

Estes fatos, associados às variações dos valores dos raios de giração encontrados, denunciam mudanças conformacionais na proteína devido aos movimentos de contração e distensão da molécula, que podem ser confirmados observando-se os modelos propostos.

Sabemos que o primeiro pico que aparece por volta de $r = 2$ nm está relacionado às distâncias entre os centros espalhadores dentro de cada um dos subdomínios, e entre os os subdomínios mais próximos, ou vizinhos.

O segundo pico que aparece por volta $r = 3$ a 4 nm está associado às distâncias entre os centros espalhadores de um subdomínio com outros subdomínios. A variação da posição de seu máximo indica a mudança de posição dos subdomínios, que se aproximam ou se afastam um do outro.



O terceiro pico que aparece por volta de $r = 6$ nm também está relacionado com as distâncias entre os subdomínios, mas com os mais afastados, ou seja, os segundos vizinhos. Podem ocorrer picos mais próximos à dimensão máxima da molécula, mas estão relacionados com as flutuações das curvas de intensidade, não tendo relação significativa com a forma da mesma.

A possibilidade de movimentação da molécula de albumina pode estar ligada à posição das pontes de dissulfeto. A quantidade de pontes de dissulfeto formada confere às albuminas uma forte estabilidade, mas a sua localização permite uma maleabilidade e flexibilidade muito grandes, o que possibilita a existência de várias conformações em diferentes valores de pH.

Pelos modelos encontrados para as albuminas no pH 5,0, figuras 8.1 a 8.4, verificamos que ocorre uma pequena abertura entre os blocos, se compararmos com os modelos encontrados por Olivieri e Craievich, para as albuminas humana e bovina, livre de ligantes, conforme a figura 9.1 abaixo.

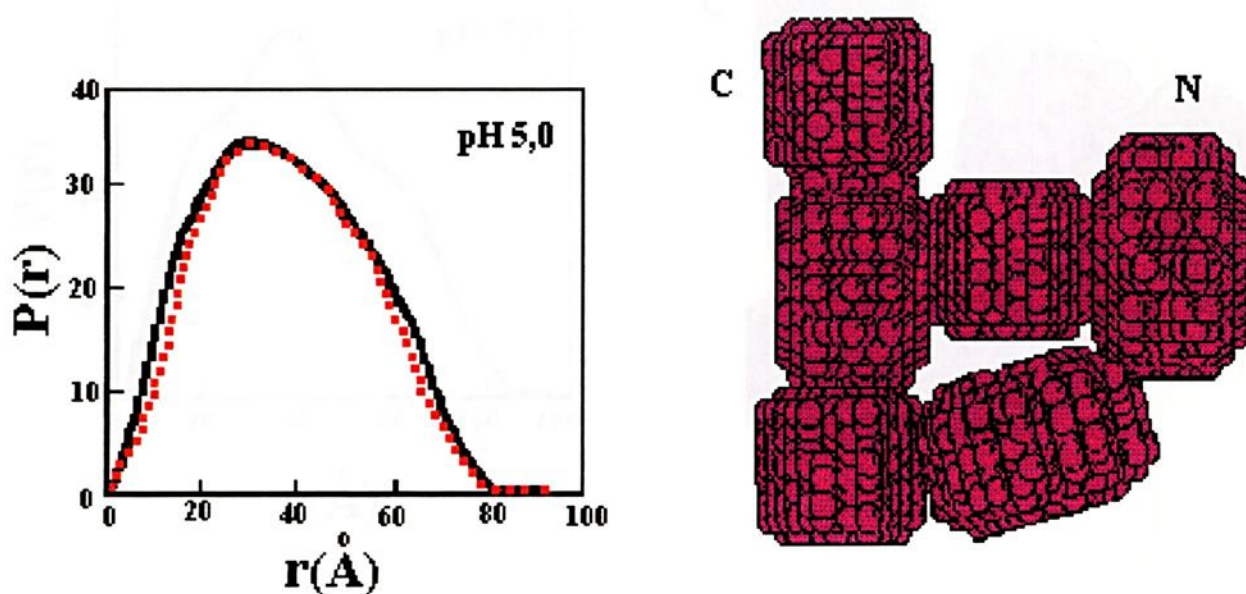


Figura 9.1: modelo de Olivieri e Craievich, para a albumina humana, no pH 5,0.

Estas diferenças na conformação, provavelmente, estão relacionadas com a presença de ligantes; quanto às diferenças nas seqüências de aminoácidos que há entre as diversas albuminas, não devem causar uma alteração tão forte. Sabemos que as proteínas por nós estudadas possuem ligantes, mas não conhecemos, especificamente, quais são; apenas temos que, algumas são essencialmente livres de ácidos graxos e outras, de globulina.

Para as albuminas no pH 7,0, conforme modelos apresentados nas figuras 8.5 a 8.8, observamos que ocorre um fechamento, ou contração, da molécula. Segundo o modelo proposto por Olivieri e Craievich, para a albumina humana livre de ligantes neste pH, acontece o oposto, ou seja, ela apresenta uma certa distensão. Por outro lado, o modelo por eles proposto, para a albumina bovina livre de ligantes neste mesmo pH, apresenta uma boa concordância com os nossos resultados, figuras 9.2 e 9.3.

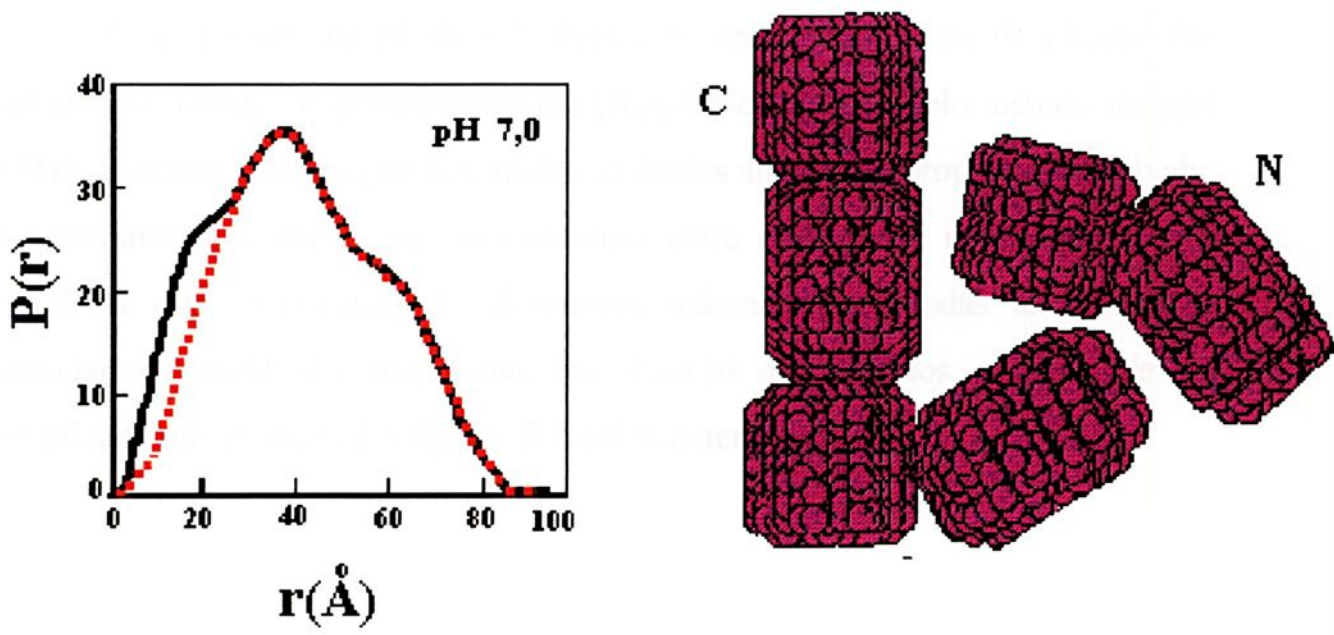


Figura 9.2: modelo de Olivieri e Craievich, para a albumina humana, para o pH 7,0

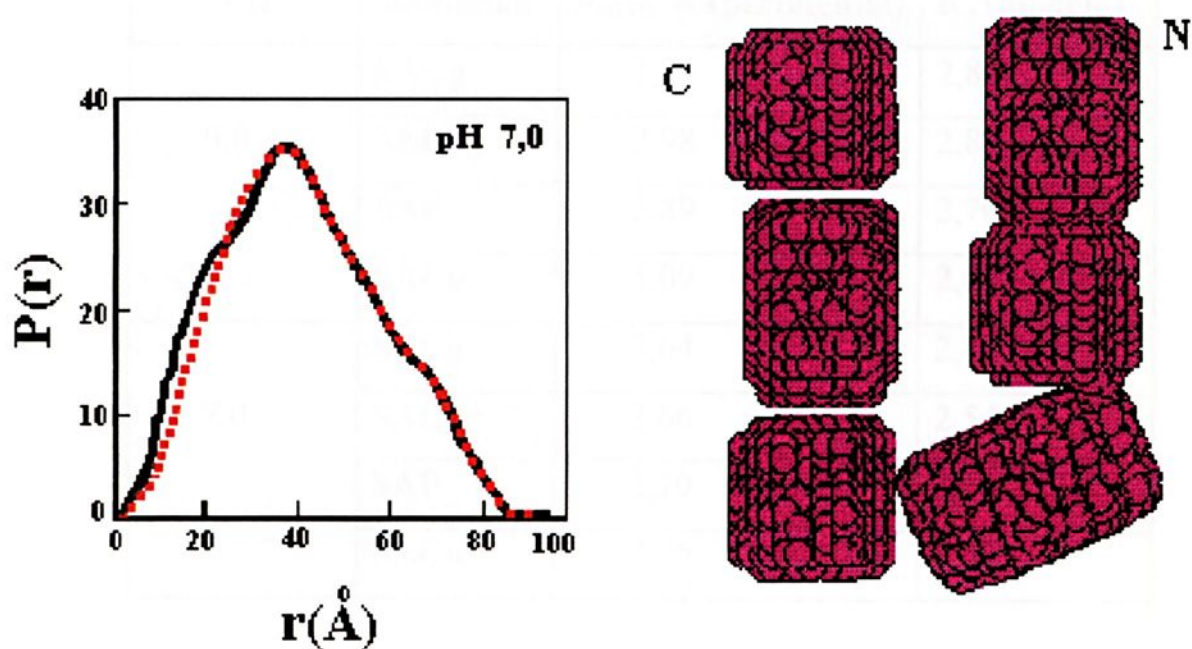


Figura 9.3: modelo de Olivieri e Craievich, para a albumina bovina, para o pH 7,0.

Podemos ver, na tabela 9.2 abaixo, os valores dos raios de giração das albuminas, obtidos experimentalmente (R_{gITP}) e calculados pelo método integral (ITP), e os raios de giração dos modelos obtidos através do programa Multibody. Observamos que existe uma concordância entre eles, o que indica que nossos modelos estão coerentes. As dimensões máximas para todas as albuminas estudadas coincidem relativamente bem com as dos modelos, o que pode ser verificado nos gráficos das figuras 8.1 a 8.8, anteriores.

pH	albumina	R_{gITP} (experimental)	R_g (modelo)
5,0	SACg	2,94	2,86
	SACag	2,98	2,87
	SAP	2,89	2,70
	SACo	3,09	2,88
7,0	SACg	2,64	2,48
	SACag	2,66	2,54
	SAP	2,79	2,76
	SACo	2,75	2,73

Tabela 9.2: comparação entre os valores dos raios de giração experimentais com os modelos.

Apesar dos ajustes dos modelos para o pH 7,0 não estarem muito bons, podemos verificar, pelos valores dos raios de giração das moléculas, obtidos experimentalmente, que ocorre uma diminuição nos mesmos, o que indica que pode estar havendo uma contração na molécula, provavelmente devido à presença de ligantes diferentes que, como vimos na literatura, podem se ligar em diferentes regiões numa mesma molécula, dependendo de haver ou não, uma maior afinidade entre eles.

10 - Conclusões

O estudo das albuminas em questão possibilitou que verificássemos as grandes mudanças conformacionais que ocorrem com as mesmas, tanto em função do pH, como quanto à presença de ligantes. Notamos que, ao contrário do que ocorre com a albumina humana livre de ligantes, as moléculas sofrem uma contração, ou fechamento, quando se altera o pH de 5,0 para 7,0. A causa destas mudanças, considerando o fator pH, parece estar vinculada às cargas livres presentes nos domínios I, II e III. Considerando a presença de ligantes, provavelmente, ocorrem interações da albumina com os diferentes ligantes, fazendo com que a mesma sofra um empacotamento.

E, também, para um mesmo pH, as proteínas apresentam diferenças entre si nas formas apresentadas. Isto pode ser explicado pelo fato de que, apesar da grande homologia entre elas, apresentam diferenças na seqüência dos aminoácidos, assim como os ligantes aos quais encontram-se unidas são diferentes. Como cada ligante tem uma região de ligação específica, as várias formas encontradas podem ser entendidas como resultado destas ligações em diferentes regiões da molécula.

Para se entender melhor o processo que está ocorrendo seriam necessárias novas experiências de SAXS, nas quais adicionaríamos ligantes conhecidos e pré determinados, à albumina livre de ligantes, variando-se os valores do pH; sugerimos utilizar, também, alguma outra técnica, para auxiliar o entendimento.

O trabalho desenvolvido possibilitou, acima de tudo, o aprendizado da técnica de SAXS, o conhecimento dos equipamentos utilizados, seus problemas e soluções, e o domínio dos programas computacionais desenvolvidos para a análise dos dados experimentais.



10 - Anexos

Anexo 1 (Guinier e Fournet, 1955).

Supondo um elétron livre em um feixe paralelo de raios X de intensidade I . Temos uma onda planopolarizada se propagando ao longo do eixo OX , com um vetor campo elétrico $\vec{E}_0$. O elétron encontra-se na origem completamente livre da ação de forças, conforme a figura 1 abaixo:

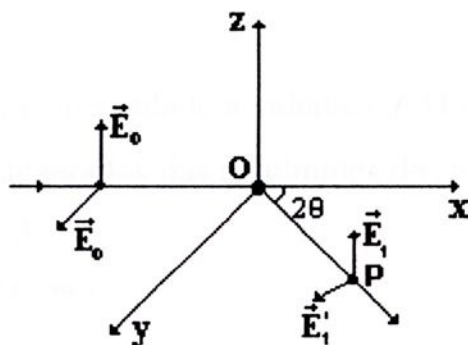


Figura 1: espalhamento de uma onda por um elétron.

Este elétron oscila sujeito a uma aceleração $\gamma = \frac{E_0 e}{m}$. De acordo com a teoria clássica, um elétron acelerado emite radiação eletromagnética cujo vetor campo elétrico no ponto P é dado por:

$$E = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e}{r} \sin \varphi \right) \gamma \quad (\text{volts / m}) \quad (1.1)$$

onde:

r : distância OP (m),

φ : ângulo entre OP e a direção da aceleração do elétron,

$\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7}$ (Tm / A), permeabilidade magnética,

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

O vetor campo elétrico está situado no plano contendo OP e γ . A radiação incidente em P tem a mesma frequência que a onda incidente e amplitude:

$$\mathbf{E} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e^2}{m} \frac{\mathbf{E}_0}{r} \sin \varphi \quad (1.2)$$

onde:

m é a massa do elétron.

A onda espalhada está π radianos fora de fase com a onda incidente.

O plano OXY contém os vetores $\mathbf{OP}$ e $\mathbf{OX}$ e o ângulo de espalhamento é 2θ . Assumindo que $\mathbf{E}_0$ tem direção OZ, temos:

$$\mathbf{E}_\perp = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e^2}{m} \frac{\mathbf{E}_0}{r} \quad (1.3)$$

A razão entre a intensidade incidente em $\mathbf{O}$ e a intensidade espalhada em $\mathbf{P}$ é igual à razão dos quadrados das amplitudes dos campos elétricos:

$$\frac{I_\perp}{I_0} = \frac{E^2}{E_0^2} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{e^4}{m^2 r^2} \quad (1.4)$$

Mas $\left(\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e^2}{m} \right)$ é definido como o raio clássico do elétron, r_e .

Então, o fluxo de energia cruzando uma unidade de superfície por segundo em $\mathbf{P}$ é:

$$I_\perp = I_0 \frac{r_e^2}{r^2}. \quad (1.5)$$

Agora, assumindo que o vetor campo elétrico da onda incidente esteja no plano XOY, temos:

$$\mathbf{E}_\parallel = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e^2}{m} \frac{\mathbf{E}_0}{r} \cos 2\theta, \quad (1.6)$$

e a intensidade de espalhamento será:

$$I_\parallel = I_0 \frac{r_e^2}{r^2} \cos^2 2\theta \quad (1.7)$$

Para um feixe de polarização não especificada, o cálculo é feito pela decomposição do feixe em dois feixes separados cujos vetores campo elétricos

são respectivamente perpendicular e paralelo ao plano de incidência e de espalhamento do raio, na proporção $k_{\perp}$ e $k_{//}$. A intensidade espalhada será então:

$$I_e = \frac{r_e^2}{r^2} I_0 (k_{\perp} + k_{//} \cos^2 2\theta) \quad (1.8)$$

Para um feixe não polarizado temos que $k_{\perp} = k_{//} = \frac{1}{2}$. Daí, chegamos a:

$$I_e = \frac{r_e^2}{r^2} I_0 \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2}, \text{ que é a Fórmula de Thomson.} \quad (1.9)$$

onde:

I_e é a intensidade espalhada por um elétron,

I_0 é a intensidade incidente.

Anexo 2 (Guinier e Fournet, 1955).

A média da função fase é dada por:

$$\begin{aligned} \overline{\cos (\vec{q} \cdot \vec{r})} &= \int_0^{\pi} \cos (\vec{q} \cdot \vec{r}) \frac{\sin \varphi}{2} d\varphi \\ &= \int_0^{\pi} \cos (qr \cos \varphi) \frac{\sin \varphi}{2} d\varphi \\ &= \int_0^{\pi} \cos (qr \cos \varphi) \sin \varphi d\varphi \\ &= -\frac{1}{qr} \int_0^{\pi} \cos (qr \cos \varphi) (-) qr \sin \varphi d\varphi \end{aligned}$$

fazendo: $u = qr \cos \varphi$

$$du = -qr \sin \varphi d\varphi$$

$$\varphi = \frac{\pi}{2} \rightarrow u = qr \cos \frac{\pi}{2} = 0$$

$$\varphi = 0 \rightarrow u = qr \cos 0 = qr$$

$$\begin{aligned}
 &= -\frac{1}{qr} \int_{qr}^0 \cos u \, du \\
 &= -\frac{1}{qr} \sin u \Big|_{qr}^0 = \frac{\sin(qr)}{qr} \\
 \overline{\cos(\vec{q} \cdot \vec{r})} &= \frac{\sin(qr)}{qr}
 \end{aligned}$$

Anexo 3 (Guinier e Fournet, 1955).

$$\begin{aligned}
 \overline{F^2(q)} &= V\rho^2 \int_0^\infty \left(1 - \frac{Sr}{4V}\right) \frac{\sin(qr)}{qr} 4\pi r^2 \, dr \\
 &= \frac{V\rho^2 4\pi}{q^3} \left[\int_0^\infty r^2 \frac{\sin(qr)}{qr} q^3 \, dr - \frac{S}{4V} \int_0^\infty r^3 \frac{\sin(qr)}{qr} q^3 \, dr \right] \\
 &= \frac{V\rho^2 4\pi}{q^3} \left[\int_0^\infty qr \sin(qr) q \, dr - \frac{S}{4Vq} \int_0^\infty q^2 r^2 \sin(qr) q \, dr \right]
 \end{aligned}$$

Fazendo as substituições: $y = qr$, $dy = q \, dr$ e como $\gamma_0(r)$ é igual a zero, além de $r = R_1$, e $u = qR_1$, teremos:

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

Lembrando que:

$$\int_0^u y \sin y \, dy = -u \cos u + \sin u$$

$$\int_0^u y^2 \sin y \, dy = -u^2 \cos u + 2u \sin u + 2 \cos u - 2$$

e resolvendo a equação acima teremos:

$$\overline{F^2(q)} = \frac{V\rho^2 4\pi}{q^3} \left[(-u \cos u + \sin u) - \frac{S}{4Vq} (-u^2 \cos u + 2u \sin u + 2 \cos u - 2) \right]$$

$$\begin{aligned}
\overline{F^2(q)} &= \frac{V\rho^2 4\pi}{q^3} \\
&\left[-qR_1 \cos(qR_1) + \text{sen}(qR_1) - \frac{S}{4Vq} \left(-q^2 R_1^2 \cos(qR_1) + 2qR_1 \text{sen}(qR_1) + 2 \cos(qR_1) - 2 \right) \right] \\
&= \frac{V\rho^2 4\pi}{q^3} \\
&\left[-qR_1 \cos(qR_1) + \text{sen}(qR_1) + \frac{S}{4Vq} q^2 R_1^2 \cos(qR_1) - \frac{S}{4Vq} 2qR_1 \text{sen}(qR_1) - \frac{2S}{4Vq} \cos(qR_1) + \frac{2S}{4Vq} \right] \\
&= \frac{V\rho^2 4\pi}{q^3} \left\{ \frac{2S}{4Vq} + [\cos(qR_1)] \left[-qR_1 + \frac{S q R_1^2}{4V} - \frac{2S}{4Vq} \right] + [\text{sen}(qR_1)] \left[1 - \frac{2S q R_1}{4Vq} \right] \right\} \\
&= \frac{V\rho^2 4\pi}{q^3} \left\{ \frac{S}{2Vq} + \underbrace{\left[-qR_1 + \frac{S q R_1^2}{4V} - \frac{S}{2Vq} \right]}_A [\cos(qR_1)] + \underbrace{\left[1 - \frac{S R_1}{2V} \right]}_B [\text{sen}(qR_1)] \right\} \\
&= \frac{V\rho^2 4\pi}{q^3} \left\{ \frac{S}{2Vq} + A \cos(qR_1) + B \text{sen}(qR_1) \right\} \\
\overline{F^2(q)} &= \frac{2\pi \rho^2 S}{q^4} + \frac{V\rho^2 4\pi}{q^3} [A \cos(qR_1) + B \text{sen}(qR_1)]
\end{aligned}$$

10 - Bibliografia

Aoki, K.; Sato, K.; Nagaoka, S.; Kamada, M.; Hiramatsu, K. *Biochem. Biophys. Acta*, **328**: 323-333, 1973.

Barbosa, A. F. "Gas Position Sensitive X-Ray Detectors". CBPF, Rio de Janeiro, Brasil, 1994.

Barbosa, A. F. "Técnicas de Detecção". CBPF, Rio de Janeiro, Brasil, 1998.

Brognaro, D. P.; Abrego, J. R. "Mudanças Conformacionais da PLA₂ de *Crotalus durissus terrificus* em Solução por SAXS". Dissertação de mestrado. Departamento de Física- IBILCE- UNESP, 1995.

Brown, J. R.; Behrens, P. Q.; Spiekerman, A. M. Structure of human serum albumin. *Fed. Proc.*, **34**: 591, 1975.

Brown, J. R. Structural origins of mammalian albumin. *Fed. Proc.*, **35**: 2141-2144, 1976.

Carter, D. C.; Xiao-Min He; Munsons, H.; Twigg, R. D.; Gernet, K. M.; Broom, M. B.; Miller, T. K. Three-Dimensional Structure of Human Serum Albumin. *Science*, **244**: 1195-1198, 1989.

Carter, D. C.; Xiao-Min He; Munsons, H.; Twigg, R. D.; Gernet, K. M.; Broom, M. B.; Miller, T. K. Structure of Humam Serum Albumin. *Science*, **249**: 302-303, 1990.



Cullity, B. D. "Elements of X-Ray diffraction". Addison-Wesley Publishing Company, California, USA, 1978.

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

Glatter, O. A New Method for the Evaluation of Small-Angle Scattering of X-Rays. *J. Appl. Cryst.*, **10**: 415-421, 1977.

Glatter, O. Computation of Distance Distribution Functions and Scattering Functions of Models for Small Angle Scattering Experiments. *Acta Physica Austriaca*, **52**: 243-256, 1980.

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

Guinier, A. "X-Ray diffraction". W. H. Freeman and Company, USA, 1963.

Gurd, F. R. N.; Rothgeb, T. M. *Adv. Protein Chem.*, **33**: 73-165, 1979.

Ho, J. X.; Holowachuk, E. W.; Norton, E. J.; Twigg, P. D.; Carter, D.C. X-ray and primary structure of horse serum albumin (*Equus caballus*) at 0.27-nm resolution. *European Journal of Biochemistry*, **215**(1): 205-212, 1993.

Kragh-Hansen, U. Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin. *Pharmacological Reviews*, **33**: 17-52, 1981.



- Kragh-Hansen, U. Effects of aliphatic fatty acids on the binding of Phenol Red to human serum albumin. *Biochemistry Journal*, **195**: 603-613, 1981.
- Meloun, B.; Moravek, L.; Kostka, V. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *F.E.B.S. (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* **58**: 134-137, 1975.
- Mc Lachlan, A.D. and Walker, J. E. Evolution of Serum Albumin. *J. Mol. Biol.*, **112**: 543-558, 1977.
- Muller, K.; Glatter, O. Practical Aspects to the Use of Indirect Fourier Transformation Methods. *Makromol.. Chemistry*, **183**: 465-479, 1982.
- Olivieri, J. R.; Craievich, A. F. The Subdomain Structure of Human Serum Albumin in Solution under Different pH Conditions Studied by Small Angle X-Ray Scattering. *European Biophysics Journal*, **24**: 77-84, 1995.
- Olivieri, J. R. "Estudo das variações conformacionais das albuminas humana e bovina em solução por espalhamento de raios X a baixo ângulo". Tese de Doutorado. Instituto de Física e Química de São Carlos - USP, 1992.
- Peters, T. Jr. Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry*, **37**: 161-244, Academic Press, 1985.
- Pilz, I.; Glatter, O.; Kratky, O. Small- Angle X-Ray Scattering. *Methods in Enzimology*, **61**: 148-249, Academic Press, 1979.
- Santos, J. R.; Abrego, J. R. "Estudo das variações conformacionais do Complexo Crotoxina e suas subunidades por Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo. Dissertação de mestrado. Departamento de Física- IBILCE- UNESP, 1998.

Shockley, P.; Schmitt, M. P.; Brown, J. R. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **41**: 1178, 1982.

Squire, P. G.; Moser, P.; O'Konski, C. T. *Biochemistry*, **7**: 4261-4271, 1968.

Svergun, D. I.; Barberato, C.; Koch, M. H. J.; Fetler, L.; Vachette, P. Large Differences Are Observed Between the Crystal and Solution Quaternary Structures of Allosteric Aspartate Transcarbamylase in the R State. *Proteins*, **27**: 110-117, 1997.

Tardieu, A.; Mateu, L.; Sardet, C.; Weiss, B.; Luzzati, V. Structure of Human Serum Lipoproteins in Solution. *J. Mol. Biol.*, **101**: 129-153, 1976.

Trewhella, J. Insights into biomolecular function from small-angle scattering. *Current Opinion in Structural Biology*, **7**: 702-708, 1997.



