UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS

"ESTUDO DAS VARIAÇÕES CONFORMACIONAIS DAS ALBUMINAS HUMANA E BOVINA EM SOLUÇÃO POR ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO"

Johnny Rizzieri Olivieri

Tese apresentada ao Instituto de Física e Química de São Carlos para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Física Aplicada).

Orientador: Professor Doutor Aldo Felix Craievich

Departamento de Física e Ciência dos Materiais

São Carlos

1992

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

**IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
Instituto de Física e Química de São Carlos

Fone (0162) 72-6222
Fax (0162) 72-2218

Av. Dr. Carlos Botelho, 1465
Caixa Postal 369
CEP 13560 - São Carlos - SP
Brasil

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE JOHNNY RIZZIERI OLIVIERI APRESENTADA AO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 22.04.1992

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Aldo Félix Craievich

Prof. Dra. Yvonne Primerano Mascarenhas

Prof. Dra. Iris C. Linares de Torriani

Prof. Dra. Lia Queiroz do Amaral

Prof. Dr. José Ramon Beltran

À

Rute,

Fernanda e Bruno

AGRADECIMENTOS

-Ao Prof. Dr. Aldo Felix Craievich, pela orientação, apoio e estímulo durante esses anos de trabalho conjunto.

-À Profa. Dra. Yvonne Mascarenhas, pela valiosa colaboração nas discussões, idéias e estímulo.

-Ao Prof. Dr. José Ramón Beltran Abrego, pelo apoio e discussão durante todo o trabalho.

-Ao Prof. Dr. Hernan Chaimovich, pelas críticas e sugestões ao trabalho final.

-Aos amigos do Departamento de Física do IBILCE: José Roberto, Chahine, João, Marcelo, Márcio, Eloi e Elso, pela amizade, apoio, palpites e incentivos.

-À Ilva Cecilio Bernardes e à Maria Noêmia Thomazello, pela datilografia e correções desta tese.

-Ao José Geraldo Catarino e ao Carlos A. Trombella, pela colaboração e assistência técnica no laboratório, e à Wanda P. de Jesus, pela colaboração na preparação das amostras.

R E S U M O

Soro Albumina bovina (BSA) e humana (HSA) têm um grande interesse biológico devido às suas propriedades como armazenadoras e transportadoras de outras substâncias. Essas proteínas agem também no controle da pressão osmótica do sangue. Elas têm 585 e 582 resíduos de amino-ácidos e pesam aproximadamente 66500 e 66300 daltons, respectivamente.

Usando Espalhamento de Raio-x a Baixo-Ângulo, estudamos BSA e HSA nos pH's entre 2.5 e 7.0. As medidas de intensidade de espalhamento, normalizadas em relação ao feixe incidente, tempo de exposição e espalhamento devido ao solvente e capilar, e corrigidas devido à concentração e à forma do feixe, mostraram uma forte dependência da forma das albuminas com o pH. O raio de giração encontrado apresentou valores entre 26.7 Å e 35.0 Å e a análise da função distribuição de distâncias $P(r)$ tem mostrado que essas proteínas sofrem uma variação conformacional com o pH.

Diferentes modelos teóricos têm sido propostos e analisados, comparando as funções $P(r)$ calculadas dos modelos com as experimentais. A grande variedade de formas encontradas para ambas proteínas indicam que BSA e HSA são macromoléculas muito flexíveis.

A B S T R A C T

Bovine (BSA) and Human Serum Albumin (HSA) have large biological interest due to their storage and carrier properties of small substances. These proteins act also on the control of the osmotic pressure of the blood. They have 585 and 582 amino-acids residues and weigh 66,500 and 66,300 daltons, respectively.

Here, we report a Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) study of BSA and HSA on pH between 2.5 and 7.0. The measured scattering intensities, normalized in relation to incident beam, exposition time and scattering due to solvent and capilar, and corrected due to concentration and beam shape effects, have shown a strong dependence of the protein shape with pH for both albumins. It was found that the radius of gyration varies between 26.7 Å and 35 Å, and the analyses of the distance distribution function, $P(r)$, indicated that these proteins undergoes conformational changes with pH.

Different theoretical shapes have been proposed and analysed comparing the computed $P(r)$ function generated from the models with the experimental $P(r)$. A large variety of shapes were found in both proteins, indicating that BSA and HSA are very flexibility macromolecules.

I N D I C E

PÁGINA

AGRADECIMENTOS.....	1
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	111
 CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	 1
I.1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	2
I.2. SORO ALBUMINA HUMANA E BOVINA.....	4
I.2.1. ASPECTOS GERAIS.....	4
I.2.2. ESTRUTURA PRIMÁRIA.....	5
I.2.3. ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL.....	9
I.2.4. PROPRIEDADES FÍSICAS E FORMAS...	9
 CAPÍTULO II - MÉTODOS TEÓRICOS.....	 15
II.1. TEORIA DE ESPALHAMENTO DE RAIOS-X	
A BAIXOS ÂNGULOS.....	16
II.1.1. ESPALHAMENTO POR UMA	
PARTÍCULA FIXA.....	16
II.1.2. ESPALHAMENTO POR UMA	
PARTÍCULA MÓVEL.....	19
II.1.3. LEI DE GUINIER E LEI DE POROD...	22
II.1.4. INVARIANTE, VOLUME E	
SUPERFÍCIE ESPECÍFICA.....	25
II.1.5. FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTÂNCIA	
$P(r)$ E O RAIO DE GIRAÇÃO R_g	27

II.1.6.	ESPALHAMENTO POR UM GRUPO DE PARTICULAS.....	28
CAPITULO III -	MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	32
III.1.	DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.....	33
III.1.1.	EQUIPAMENTOS.....	33
III.1.2.	SISTEMA DE COLIMAÇÃO.....	42
III.1.3.	PERFIL DO FEIXE.....	44
III.2.	MÉTODO DE ANÁLISE DOS DADOS EXPERIMENTAIS.	47
III.2.1.	NORMALIZAÇÃO DAS CURVAS DE INTENSIDADES ESPALHADAS.....	47
III.2.2.	EXTRAPOLAÇÃO PARA DILUIÇÃO INFINITA E ELIMINAÇÃO DO BACKGROUND.....	50
III.2.3.	CORREÇÃO DAS CURVAS DE ESPALHAMENTO DEVIDO AO SISTEMA DE COLIMAÇÃO E DIS- TRIBUIÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA .	53
III.3.	MÉTODOS COMPUTACIONAIS.....	57
III.4.	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	60
CAPITULO IV -	RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	62
IV.1.	OBSERVAÇÕES E MEDIDAS PRELIMINARES.....	63
IV.2.	RESULTADOS DA ALBUMINA HUMANA E BOVINA....	64
IV.2.1.	INTENSIDADES DE ESPALHAMENTO, CORREÇÕES E NORMALIZAÇÃO.....	64
IV.2.2.	INTENSIDADE DE ESPALHAMENTO CORRIGIDA E GRÁFICOS DE GUINIER	78
IV.2.3.	FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTÂNCIA E RAIO DE GIRAÇÃO PELO MÉTODO INTEGRAL.....	86

CAPITULO V -	MODELOS ESTRUTURAIS.....	82
V.1.	TÉCNICAS COMPUTACIONAIS.....	93
V.2.	MODELOS OBTIDOS.....	96
CAPITULO VI -	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	106
CAPITULO VII -	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	122
VII.1.	CONCLUSÕES	123
VII.2.	SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	125
BIBLIOGRAFIA.....		126

CAPITULO I

INTRODUCAO

I.1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A primeira idéia de se trabalhar com soro albumina nasceu de uma discussão durante um seminário do Prof. H. Chaimovich no I.F.Q.S.C., de São Carlos - USP.

Inicialmente, foi proposto um estudo sobre as variações conformacionais em função do pH e temperatura de um pequeno fragmento da albumina denominado P-8. (peso molecular ~9000 daltons), que ajuda a induzir a fusão de vesículas.^(1,2,3)

Entretanto, durante o trabalho de preparação do P-8, verificamos que não conseguíamos obter esse fragmento com alto grau de pureza. Testes com eletroforese nos indicavam sempre uma mistura de P-6, P-8 e P-12, e as vezes de outros fragmentos ainda maiores.

Por outro lado, levantamento bibliográfico feito no início sobre a albumina, apesar de imenso, não continha informações sobre a estrutura tridimensional (resolvida posteriormente), e muito poucos e contraditórios sobre as variações conformacionais em diferentes pH's.

A partir daí, passamos a trabalhar tão somente com as albuminas humanas e bovinas, puras, livres de ácidos graxos, metais, e outros ligantes.

A albumina, também denominada de soro albumina ou plasma albumina, é uma das mais abundantes proteínas encontrada no plasma sanguíneo. Com peso molecular ao redor de 66.500 daltons, ela serve para o transporte e armazenamento de numerosas outras substâncias, tais como ácidos graxos, drogas, esteróides, bilirubina, etc.

O soro albumina é também um dos principais componentes do plasma no estabelecimento da pressão osmótica do sangue^(4,5).

A importância biológica e a relativa facilidade para isolar e purificar as albuminas têm levado a bom termo inúmeros trabalhos. Tais investigações vão desde o estudo de interações com outras moléculas e determinação da sequência primária até, recentemente, a resolução da estrutura tridimensional, ainda em baixa resolução^(6,7).

Por outro lado, espalhamento de raio-x a baixos ângulos (SAXS) tem demonstrado nas últimas décadas ser uma técnica muito útil e importante para estudos na área de Ciências dos Materiais. Com uma teoria bem desenvolvida, tem permitido obter vários parâmetros geométricos e estruturais^(8,9). Mais recentemente, com a evolução dos novos detectores e fontes de radiação mais intensas, SAXS tem sido muito aplicado no estudo de macromoléculas em solução, polímeros em solução, etc.^(10,11).

Com isso, tornou-se possível obter raio de giração, volume, superfície, função distribuição de distância, máxima dimensão de proteínas, em situação o mais próximo possível de seu ambiente biológico.

É nosso objetivo neste trabalho avaliar, pela técnica de espalhamento de raio-x a baixos ângulos, o tamanho, e as variações conformacionais em diferentes pH's, as albuminas humana e bovina.

Pretendemos também propor modelos, obtidos a partir de simulações em computador, para as várias conformações observadas das albuminas, nos diferentes pH's.

I. 2. SORO ALBUMINA HUMANA E BOVINA

I. 2.1. ASPECTOS GERAIS

A palavra albumina deriva do latim "albus", que significa branco. Vem do albumen do ovo, que se torna branco após a coagulação.

As características principais das albuminas são de uma proteína estável, muito solúvel e ácida. Seu ponto isoelétrico está ao redor do pH 4.8.

Em pH's entre 6 e 7, a albumina é solúvel em altas concentrações de sulfato de amônia (2.1M). A acidez da albumina pode ser utilizada para separá-la do plasma por eletroforese ou técnicas de troca iônica.

A estabilidade ou a resistência à denaturação tem sido bem determinada⁽¹²⁻¹⁴⁾. A molécula pode suportar temperaturas de até 60°C durante 10 horas (na presença de ácido caprílico). Em pH's entre 1 e 2, a albumina se expande e alonga, mas pode retornar ao estado nativo reversivelmente. A albumina é relativamente estável em pH's 9-11, mas pode sofrer trocas de dissulfeto.

As albuminas ligam-se facilmente a centenas de outras substâncias, pequenas moléculas, ácidos graxos, metais, bilirubina⁽¹⁵⁻²⁰⁾, modificando algumas vezes seu comportamento ou forma, como por exemplo, dando maior estabilidade conformacional ou protegendo contra a denaturação por calor^(48,49,50) ou pela uréia⁽⁴⁷⁾.

A albumina pode ser cristalizada. A primeira foi a de cavalo, por volta de 1894⁽⁵¹⁾, e a cristalização é empregada em escala industrial, como um passo no processo de purificação. Entretanto, só recentemente tem sido levada a cabo a determinação da estrutura tridimensional^(6,7), ainda que em baixa resolução, aproximadamente 4 Å.

I.2.2. ESTRUTURA PRIMÁRIA

A albumina é uma proteína composta de uma única cadeia polipeptídica, com 585 e 582 amino-ácidos, para a humana e a bovina respectivamente. Ela é caracterizada pelo pequeno conteúdo de triptofano e metionina e alto conteúdo de cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e argenina. A composição de amino-ácidos pode ser vista na tabela I.1.

Estudo completo da sequência de amino-ácidos da soro albumina humana foi publicado simultaneamente por Brown⁽²¹⁾ e Meloun⁽²²⁾ e da soro albumina bovina por Brown⁽²¹⁾, sendo a homologia entre as duas muito grande.

Uma característica das albuminas é a presença de pares de cisteínas vizinhas em toda a sequência, como pode ser visto na figura I.1, e que é comum tanto para a humana como para a bovina.

A quantidade de pontes de dissulfeto formada confere às albuminas uma forte estabilidade, mas a sua localização permite, por outro lado, uma maleabilidade e flexibilidade muito grande. Isto é responsável pela existência de várias conformações em diferentes pH's.

TABELA I.1

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

Tabela I.1. Quantidade de amino-ácidos nas albuminas humana e bovina⁽⁴⁾.

Figura I.1. Sequência de amino-ácido da albumina humana⁽²³⁾.

Ela apresenta também uma sisteína livre, que possivelmente deve estar protegida da oxidação devido à forma da cadeia.

Baseado na distribuição das pontes de dissulfeto ao longo da cadeia de amino-ácidos, é possível dividir as albuminas em três domínios (I, II, III), cada um deles tendo dois subdomínios (A e B), como mostra a figura I.2.

Figura I.2. Diagrama da estrutura primária da albumina.

mostrando os domínios I, II, III e os subdomínios A e B⁽⁴⁾.

I.2.3. ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

Em recentes trabalhos, D.C. Carter e outros^(6,7) resolveram a estrutura da albumina humana, por difração de raio-x, com resolução de 6 Å e 4 Å. Segundo os autores, os mapas de densidade eletrônica são de alta qualidade e mostram a estrutura com uma predominância de α -hélice.

Isso vem confirmar os trabalhos de outros autores^(23,24), feitos por dispersão rotatória ótica e por dicroísmo circular, que previram um conteúdo de α -hélice de aproximadamente 54% e 68%, respectivamente.

Ela apresenta um formato parecido com um coração, sendo a máxima dimensão de aproximadamente 83 Å (num plano xy) e a profundidade da molécula de 30 Å (ao longo do eixo z).

Entretanto, a estrutura definitiva, com a posição espacial de todos os átomos ainda não foi determinada.

I.2.4. PROPRIEDADES FÍSICAS E FORMAS

A molécula de albumina não é uniformemente carregada ao longo de seu comprimento. A carga elétrica líquida em pH 7.0 para a albumina bovina é de -10e -8e e 0 nos domínios I, II e III. Para a albumina humana, os valores são -9e, -8e e +2e para os mesmos domínios⁽⁴⁾. Podemos dizer então que a cabeça, ou seja, o terminal amino (região I) é altamente negativa, enquanto que o terminal carboxil (região III) é aproximadamente neutro.

Com o conhecimento preciso da sequência de amino-ácidos, é possível determinar o peso molecular das duas albuminas, podendo também ser comparado com os valores calculados por medidas hidrodinâmicas.

De estudos de equilíbrio de sedimentação Squire e outros⁽²⁶⁾, propuseram o valor de 66.700 ± 400 daltons (Da) para a albumina bovina. Para a albumina humana, o valor encontrado foi 69.000 Da.

Os resultados obtidos pela composição de amino-ácidos são de 66.267 Da e 66.439 Da, respectivamente para a bovina e humana.

Quanto à forma da molécula, existem diferentes propostas, variando conforme a técnica utilizada ou o pH em que se trabalhou. O mesmo Squire⁽²⁶⁾, baseado em estudo de velocidade de sedimentação, dispersão dielétrica, sedimentação e birrefringência elétrica, propôs que a molécula de albumina tem a forma de um elipsóide prolato de revolução, com eixos medindo 40 e 140 Å.

Trabalhando com espalhamento de raio-x a baixos ângulos, Laggner e outros⁽²⁷⁾ encontraram um raio de giração variando entre 32 Å e 38 Å quando o pH é abaixado de 7.0 e 5.1 para 3.7. Eles perceberam uma transição da estrutura e propuseram que a molécula passasse de um modelo de elipsóide prolato com razão axial 0.66:1:2 em pH 3.7 para um prisma chato com razão de lados 0.25:1:1.

Em um outro trabalho, também usando SAXS, com albumina bovina, desenvolvido por Anderegg e outros⁽²⁸⁾, encontrou-se um raio de giração $R_g = 29.8$ Å e duas sugestões para a forma. A primeira, um prisma reto com $106 \times 21.5 \times 50$ Å ou um

paralelepípedo com dimensões $82.5 \times 27.5 \times 63 \text{ \AA}$. A escolha final entre um modelo e outro não foi possível, segundo os autores.

A mesma molécula também foi investigada por Champagne, Luzzati e Nicolaieff⁽²⁹⁾, e Luzzati, Witz e Nicollaeff⁽³⁰⁾. As propostas foram de uma partícula com $R_g = 30.6 \pm 0.4 \text{ \AA}$, peso molecular de $81.200 \pm 3200 \text{ Da}$ e tendo formato de um elipsóide de revolução. Entretanto não foi possível distinguir entre uma forma de oblato e um prolato.

MacClure e Craven⁽²⁵⁾ cristalizaram a albumina humana e a albumina de cavalo, e encontraram cristais monoclinicos, com celas unitárias de dimensões de $127 \times 39 \times 135 \text{ \AA}$.

No recente trabalho desenvolvido por Carter e outros^(6,7), eles também cristalizaram a albumina humana em pH variando entre 5.5 e 7.2 e encontraram cristais tetragonais com cela unitária de $186.5 \times 186.5 \times 81.0 \text{ \AA}$. A forma proposta para a macromolécula é a de um coração com as máximas dimensões de 83 e 70 $\text{\AA}$ e a distância do terminal amino para o terminal carboxil de 82 $\text{\AA}$. A profundidade da molécula é de aproximadamente 30 $\text{\AA}$. Um esboço da molécula pode ser visto na figura I.3.

Figura I.3: Visão estereoscópica da molécula de albumina humana, que apresenta o formato de um coração, conforme proposta de Carter⁽⁷⁾.

Como podemos observar no resumo mostrado na tabela I.2, a albumina foi tratada por diferentes técnicas e diferentes autores, e, apesar disso, não existe ainda uma proposta final sobre seu comportamento em solução. Na verdade, como veremos mais adiante, essa molécula, por ser altamente flexível, vai mudando sua forma com a variação do pH.

TABELA I.2

<u>Autor</u>	<u>pH</u>	<u>Técnica</u>	<u>Rg. (Å)</u>	<u>Dimensões (Å)</u>	<u>Forma</u>
Squire	5.2	Sedimentação e outras		140 x 40	elipsóide prolato
Laggner	7.5 5.1 3.7	SAXS	32-38	0.66:1:2 • 0,25:1:1	elipsóide prolato ou prisma chato
Anderegg	4.6	SAXS	29.8	106x21.5x50 82.5x27.5x63	Prisma reto paralele- pípedo
Luzzatti	5.3	SAXS	30.6		elipsóide oblato ou prolato
MacClure		Cristais		127x39x135	
Carter	5.2 7.2	Cristais, estrutura 3-D		83;82;70;30	coração

Tabela I.2: Resumo das diversas propostas para a forma e tamanho da albumina.

Estudos feitos com rotação óptica mostraram também que a albumina muda de forma com a variação do pH. Essas formas são denominadas de E, F, N, B e A, conforme mostra o esquema abaixo^(4,14):

	E	↔	F	↔	N	↔	B	↔	A
pH de transição		2.7		4.3		8		10	
% de α -Hélice	35%		45%		55%		48%		46%

Esse trabalho mostra a molécula de albumina numa posição mais esticada (ou desenrolada) em torno do pH 2.7, passando depois pelo ponto de maior enrolamento ao redor do pH 4.3 e se tornando novamente mais desenrolada do pH 7.0 para cima.

CAPITULO II

METODOS TEORICOS

II.1. TEORIA DE ESPALHAMENTO DE RAIO-X A BAIXOS ÂNGULOS

II.1.1. ESPALHAMENTO POR UMA PARTICULA FIXA

Espalhamento de Raios-x a baixos ângulos (SAXS) é uma técnica muito usada para estudos das características estruturais de partículas de tamanho coloidal. Como todo processo de espalhamento, ele é caracterizado pelo inverso da relação entre ângulo de espalhamento e tamanho da partícula.

Os raios-x são espalhados por elétrons e SAXS é sempre observado quando existe inhomogeneidade na densidade eletrônica das amostras.

O processo de espalhamento pode ser visualizado da seguinte maneira: os elétrons vibram com a frequência do raio-x, passando através do objeto, e emitem ondas coerentes que interferem umas nas outras. A intensidade das ondas espalhadas pelos elétrons é dada pela forma de Thomson^(e):

$$I_{\theta} = I_p \cdot 7,9 \cdot 10^{-26} \cdot (1 + \cos^2 2\theta) / 2a^2 \quad (\text{II-1})$$

na qual I_p é a intensidade primária; a , a distância entre o objeto e o detector; 2θ , o ângulo de espalhamento e o fator numérico é o quadrado do clássico raio do elétron.

Consideremos uma partícula fixa de estrutura atômica qualquer e um feixe de radiação monocromática, incidindo segundo uma direção definida pelo vetor unitário $\hat{S}_0$, como mostra a figura II.1 abaixo.

A amplitude da radiação espalhada na direção $\vec{S}_f$ pelo ponto M_k é dada por:

$$A_k = A_e f_k \exp [-i \vec{K} \cdot \vec{OM}_k] \quad (\text{II-2})$$

sendo que A_e é a amplitude espalhada por um eletrão, f_k o fator de espalhamento e $\vec{K} = \frac{2\pi(\vec{S}_f - \vec{S}_0)}{\lambda}$. É comum também expressar a amplitude em termos do vetor $\vec{S} = \frac{\vec{S}_f - \vec{S}_0}{\lambda}$, que se relaciona com h por $\vec{K} = 2\pi\vec{S}$.

Figura II.1. Espalhamento por uma partícula

Se o ângulo de espalhamento for 2θ , então h pode ser escrito como $h = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$, no qual λ é o comprimento de onda.

A amplitude total espalhada pela partícula será:

$$A(\vec{R}) = A_0(\vec{R}) \sum_k f_k \exp[-i \vec{R} \cdot \vec{OM}_k] \quad (\text{II-3})$$

Quando uma pequena partícula (um átomo por exemplo) está sendo considerado, o ponto M_k refere-se a um elemento de volume dv_k e o fator de espalhamento é então igual a $f_k = \rho_k dv_k$, onde ρ_k é a densidade eletrônica da partícula nas vizinhanças do ponto M_k .

A amplitude de espalhamento total pode ser escrita como:

$$A(\vec{R}) = A_0(\vec{R}) \sum_k \rho_k e^{-i \vec{R} \cdot \vec{OM}_k} dv_k \quad (\text{II-4})$$

Se considerarmos a partícula como sendo centrosimétrica, e simplificarmos a expressão acima para:

$$A(\vec{R}) = A_0(\vec{R}) \sum_k \rho_k \cos(\vec{R} \cdot \vec{OM}_k) dv_k \quad (\text{II-5})$$

poderemos definir, então, o fator de estrutura da partícula como a razão entre a amplitude total espalhada e a amplitude de radiação espalhada por um elétron. Assim:

$$F(\vec{R}) = \frac{A(\vec{R})}{A_0(\vec{R})} = \sum_k \rho_k \cos(\vec{R} \cdot \vec{OM}_k) dv_k \quad (\text{II-6})$$

E como a intensidade de espalhamento é o módulo da amplitude ao quadrado, usando $I_0(h) = A_0^2(h)$, teremos:

$$I(\vec{R}) = |A(\vec{R})|^2 = I_0(\vec{R}) \cdot F^2(\vec{R}) \quad (\text{II-7})$$

II.1.2. ESPALHAMENTO POR UMA PARTICULA MÓVEL

Em grande parte dos trabalhos em baixos ângulos, as partículas podem se movimentar. O movimento de translação não afeta a intensidade espalhada, mas a rotação intervém no cálculo da intensidade média. Levando isso em consideração, podemos reescrever a equação (II-7) como:

$$\overline{I(\vec{h})} = I_0(h) \overline{F^2(\vec{h})} \quad (\text{II-8})$$

Para o caso de uma partícula esfericamente simétrica, temos que $\overline{F^2(\vec{h})} = \overline{F(h)^2}$. Considerando o conjunto de pontos definidos por $|\vec{OM}_k| = r$ e $\overline{\cos(\vec{h}, \vec{r})} = \frac{\sin hr}{hr}$, podemos escrever:

$$\overline{F(h)} = \int_0^\infty \rho(r) \frac{\sin hr}{hr} \cdot 4\pi r^2 dr \quad (\text{II-9})$$

A partir da equação acima e considerando a partícula com um volume V , definida por uma densidade eletrônica $\rho(M_k)$, teremos:

$$\overline{F^2(h)} = \int_V \int_V \rho(M_k) \rho(M_j) \frac{\sin hr}{hr} dv_k dv_j \quad (\text{II-10})$$

Escrevendo o elemento de volume dv_j em coordenadas esféricas centradas no ponto M_k como $dv_j = r^2 dw dr$, teremos:

$$\overline{F^2(h)} = \int_v \left\{ \rho(\vec{M}_k) \int_v \rho(\vec{M}_j) \frac{\sin hr}{hr} r^2 d\omega dr \right\} dv_k \quad (\text{II-11})$$

Estendendo para todo o espaço, a expressão acima ficará:

$$\overline{F^2(h)} = \int_v \left\{ \rho(\vec{OM}_k) \int_0^\infty \int_0^{4\pi} \rho(\vec{OM}_k + \vec{r}) \frac{\sin hr}{hr} r^2 d\omega dr \right\} dv_k \quad (\text{II-12})$$

sendo que $\rho(\vec{OM}_k + \vec{r})$ é igual a ρ se $(\vec{OM}_k + \vec{r})$ está dentro da partícula e zero fora dela.

Tomando agora a partícula e fazendo um deslocamento $\vec{r}$ sobre si mesmo, conforme mostra a figura (II-2) abaixo,

Figura II.2. Deslocamento da partícula sobre si mesma, para calcular $V(r)$

O volume $V(\vec{r})$ comum às duas "imagens" pode ser definido como:

$$V(\vec{r}) = \frac{1}{\rho^2} \int_V \rho(\vec{OM}_k) \rho(\vec{OM}_k + \vec{r}) dv_k \quad (\text{II-13})$$

E o seu valor médio será:

$$\overline{V(\vec{r})} = \frac{1}{4\pi} \int_0^{4\pi} V(\vec{r}) d\omega \quad (\text{II-14})$$

Definindo uma nova função, $\gamma_o(r)$, denominada função característica, como:

$$\gamma_o(r) = \frac{\overline{V(\vec{r})}}{V} \quad (\text{II-15})$$

e usando as equações (II-12)...(II-15) teremos:

$$\overline{F^2(h)} = V \rho^2 \int_0^\infty \gamma_o(r) \frac{\text{sen } hr}{hr} \cdot 4\pi r^2 dr \quad (\text{II-16})$$

γ_o representa a probabilidade que um ponto a uma distância r numa direção arbitrária de um dado ponto na partícula também pertença à partícula.

Em primeira aproximação, pode-se escrever que $\gamma_o = 1 - \frac{S \cdot r}{4V} + \dots$, onde S é a superfície externa da partícula e V seu volume.

II.1.3. LEI DE GUINIER E LEI DE POROD

É interessante analisar duas situações envolvendo a equação (II-16), que são as leis de Guinier e Porod.

Substituindo o valor de γ_0 acima na expressão (II-16), teremos:

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

(II-17)

fazendo as substituições: $y = hr$, $dy = h dr$ e como $\gamma_0(r)$ é zero, além de $r = R_1$, $u = hR_1$, teremos:

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

(II-18)

e resolvendo a equação acima teremos:

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

e que:

$$\overline{F^2(h)} = \frac{V\rho^2 4\pi}{h^3} \left[(hR_1 \cos hR_1 + \operatorname{sen} hR_1 - \frac{S}{h^4 V} (h^2 R_1^2 \cos hR_1 + \right. \\ \left. + 2hR_1 \operatorname{sen} hR_1 + 2 \cos h_1 - 2) \right] \quad (\text{II-19})$$

$$\overline{F^2(h)} = \frac{V\rho^2 4\pi}{h^3} \left[\frac{2S}{h^4 V} + A \cos hR_1 + B \operatorname{sen} hR_1 \right] \quad (\text{II-20})$$

Para valores grandes de h , apenas o primeiro termo é relevante, onde então teremos a chamada Lei de Porod:

$$\overline{F^2(h)} = \frac{2\pi S\rho^2}{h^4} \quad (\text{II-21})$$

Por outro lado, para valores de h pequenos, podemos escrever a seguinte expansão:

$$\frac{\operatorname{sen} hr}{hr} = 1 - \frac{h^2 r^2}{6} + \frac{h^4 r^4}{120} + \dots \quad (\text{II-22})$$

• usando a equação (II-18) com a expansão acima teremos:

$$\begin{aligned}\overline{F^2(h)} &= V\rho^2 \int_0^\infty \gamma_0(r) \frac{\sin hr}{hr} \cdot 4\pi r^2 dr = \\ &= V\rho^2 \left\{ \int_0^\infty \gamma_0 \cdot 4\pi r^2 dr \left(1 - \frac{h^2 r^2}{6} + \frac{h^4 r^4}{120} + \dots\right) \right\} \quad (\text{II-23})\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\overline{F^2(h)} &= V\rho^2 \left\{ \int_0^\infty \gamma_0 \cdot 4\pi r^2 dr - \int_0^\infty \gamma_0 \frac{h^2 r^4 \cdot 4\pi}{6} dr + \int_0^\infty \gamma_0 \frac{h^4 r^6 \cdot 4\pi}{120} dr + \dots \right\} \\ &\quad (\text{II-24})\end{aligned}$$

A primeira integral nada mais é do que o próprio volume V , e, ficando apenas com os dois primeiros termos da expansão, teremos:

$$\overline{F^2(h)} = V^2 \rho^2 \left\{ 1 - \frac{h^2}{6V} \int_0^\infty 4\pi r^4 \gamma_0 dr \right\} \quad (\text{II-25})$$

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

$$R_g^2 = \frac{1}{2V} \int_0^\infty \gamma_0 \cdot 4\pi r^4 dr = \frac{\int_0^\infty \gamma_0 r^4 dr}{2 \int_0^\infty \gamma_0 r^2 dr} \quad (\text{II-26})$$

teremos:

$$\overline{F^2(h)} = V^2 \rho^2 \left(1 - \frac{h^2 R_g^2}{3} \right) \quad (\text{II-27})$$

ou:

$$\overline{F^2(h)} = V^2 \rho^2 \cdot e^{-\frac{h^2 R_g^2}{3}} \quad (\text{II-28})$$

que é a Lei de Guinier, válida somente para h pequenos.

II.1.4. INVARIANTE, VOLUME E SUPERFICIE ESPECIFICA

Definindo a função correlação $\gamma(r)$ como sendo:

$$\gamma(r) = \rho^2 \gamma_0(r) \quad (\text{II-29})$$

Considerando o espalhamento por um elétron $I_e = 1$ e usando as equações (II-8 e II-18), podemos escrever que:

$$I(h) = V \int_0^\infty \gamma(r) \frac{\sin hr}{hr} \cdot 4\pi r^2 dr \quad (\text{II-30})$$

Assim, a sua transformada de Fourier inversa será:

$$V\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty I(h) \frac{\sin hr}{hr} h^2 dh \quad (\text{II-31})$$

Para $h=0$ e $r=0$ as equações II-30 e II-31 acima podem ser escritas como:

$$I(0) = V \int_0^{\infty} \gamma(r) 4\pi r^2 dr \quad (\text{II-32})$$

$$V\gamma(0) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} I(h) h^2 dh \quad (\text{II-33})$$

A equação II.33 acima mostra que a integral da intensidade sobre o espaço recíproco é diretamente relacionada à média do quadrado da densidade eletrônica, independente de especiais características da estrutura. Se parte do sistema for cortado ou deformado, o modelo de difração poderia ser alterado consideravelmente, mas a integral da equação II.33 permaneceria invariante, o qual é definido por:

$$Q = \int_0^{\infty} h^2 I(h) dh \quad (\text{II-34})$$

o volume V pode ser escrito como:

$$V = \frac{2\pi^2 \cdot I(0)}{Q} \quad (\text{II-35})$$

Um outro parâmetro que também pode ser obtido é a superfície específica. A partir da lei de Porod (eq. II-21) e do invariante (eq. II-34), podemos escrever para h muito grande ($h \rightarrow \infty$):

$$S = \frac{\pi \cdot V}{Q} \cdot \lim_{h \rightarrow \infty} I(h) h^4 \quad (\text{II-36})$$

II.1.5. FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTANCIA $P(r)$ E O RAIO DE GIRAÇÃO R_g

Uma outra função muito útil e que contém toda informação a respeito do meio espalhador é a função distribuição de distância $P(r)$. Ela representa o número de pares de elétrons separados pela distância r , os quais são encontrados pela combinação de qualquer elemento de volume i com outro k da mesma partícula. A função distribuição de distância pode ser obtida a partir de $I(h)$:

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} \gamma(r) \cdot r^2 \frac{\sin hr}{hr} dr \quad (\text{II-37})$$

ou que:

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} P(r) \frac{\sin hr}{hr} dh \quad (\text{II-38})$$

no qual $P(r) = \gamma(r) \cdot r^2$, e a transformada de Fourier inversa será:

$$P(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} I(h) \cdot (hr) \sin hr \cdot dh \quad (\text{II-39})$$

e o raio de giração R_g pode ser escrito como:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^\infty P(r)r^2 dr}{2 \int_0^\infty P(r) dr} \quad (\text{II-40})$$

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

II.1.6. ESPALHAMENTO POR UM GRUPO DE PARTICULAS

É conveniente relembrar que todo o desenvolvimento feito até agora é para espalhamento por uma única partícula.

Vamos descrever a seguir o espalhamento produzido por um grupo de partículas idênticas, levando-se em conta duas hipóteses: A primeira é que todas as partículas, cada uma possuindo um centro de simetria, pode com igual probabilidade ter todas as possíveis orientações. A segunda é que o conhecimento das posições relativas de duas partículas de nenhuma maneira modifica a probabilidade de suas diferentes orientações.

Vamos designar o vetor que liga os centros k -ésima com j -ésima partícula por $(\vec{R}_k - \vec{R}_j)$. Chamando de $\vec{r}_{kl}$ o vetor extendido do centro da k -ésima partícula até o ponto l do fator de espalhamento f_{kl} na mesma partícula.

A amplitude da radiação espalhada por um grupo de partículas será:

$$\begin{aligned}
 A(\vec{h}) &= A_0(h) \sum_k \sum_l f_{kl} e^{-i\vec{h} \cdot (\vec{R}_k + \vec{r}_{kl})} = \\
 &= A_0(h) \sum_k e^{-i\vec{h} \cdot \vec{R}_k} \sum_l f_{kl} \cos(\vec{h} \cdot \vec{r}_{kl}) \quad (\text{II-41})
 \end{aligned}$$

onde o termo $\sum_l f_{kl} \cos(\vec{h} \cdot \vec{r}_{kl})$ é o fator de estrutura da k-ésima partícula. Nestas condições, a intensidade de espalhamento pode ser escrita como:

$$\begin{aligned}
 I(\vec{h}) &= I_0(h) \sum_k \sum_j \left[\sum_l f_{kl} \cos(\vec{h} \cdot \vec{r}_{kl}) \right] \left[\sum_m f_{jm} \cos(\vec{h} \cdot \vec{r}_{jm}) \right] \times \\
 &\quad \times \cos \left[\vec{h} \cdot (\vec{R}_k - \vec{R}_j) \right] \quad (\text{II-42})
 \end{aligned}$$

Os índices k e j referem-se a partículas e os índices l e m referem-se a diferentes pontos de espalhamento nas partículas k e j, respectivamente.

A intensidade de espalhamento média, sobre as orientações e sobre as posições das partículas pode ser escrita como:

$$\overline{I(\vec{R})} = I_0(h) \left[\overline{N F^2(\vec{R})} + \overline{F(\vec{R})^2} \frac{\sum_k \sum_{j \neq k} \cos[\vec{R} \cdot (\vec{R}_k - \vec{R}_j)]}{N} \right]$$

(II-43)

onde $\overline{N}$ é o número médio de partículas no volume irradiado V . Definindo o volume médio oferecido a cada partícula como $V_1 = \frac{V_0}{N_0}$, onde N_0 é o número de partículas dentro do volume total V_0 oferecido às partículas. Resolvendo o termo em somatória da expressão II-43 acima:

$$\begin{aligned} \overline{\sum_k \sum_{j \neq k} \cos[\vec{h} \cdot (\vec{R}_k - \vec{R}_j)]} &= \int_V \int_V \frac{\sin hr_{kj}}{hr_{kj}} g(r_{kj}) \frac{dV_k}{V_1} \frac{dV_j}{V_1} = \\ &= \int_V \int_V \frac{\sin hr_{kj}}{hr_{kj}} \frac{dV_k}{V_1} \frac{dV_j}{V_1} - \int_V \int_V \frac{\sin hr_{kj}}{hr_{kj}} [1 - g(r_{kj})] \frac{dV_k}{V_1} \frac{dV_j}{V_1} = \\ &= \int_0^\infty \frac{\sin hr}{hr} \cdot [1 - g(r)] \frac{4\pi r^2}{V_1} dr \end{aligned} \quad \text{(II-44)}$$

onde $g(r)$ chamada de função correlação, define a configuração estatística das partículas e tende a 1 (um) para valores grandes de r . Ela representa a probabilidade de se encontrar uma partícula a uma distância r da partícula situada na origem.

Se as partículas são esfericamente simétricas, temos que $\overline{F^2(h)} = \overline{F(h)^2}$ e então a expressão da intensidade de espalhamento será:

$$\overline{I(h)} = I_0(h) N \overline{F^2(h)} \left\{ 1 + \frac{1}{V_1} \int_0^\infty [g(r) - 1] \frac{\sin hr}{hr} \cdot 4\pi r^2 dr \right\}$$

(II-45)

ou simplificando

$$\overline{I(h)} = I_0(h) \cdot N \cdot \overline{F^2(h)} \cdot S(h) \quad (II-46)$$

$$\text{onde } S(h) = \left\{ 1 + \frac{1}{V_1} \int_0^\infty [g(r) - 1] \frac{\sin hr}{hr} 4\pi r^2 dr \right\} \quad (II-47)$$

$S(h)$ é denominada função interferência e descreve a distribuição espacial dos espalhadores individuais. Ela é a transformada de Fourier da função correlação $g(r)$.

Se as partículas estão suficientemente afastadas uma das outras, então $S(h) \rightarrow 1$.

CAPITULO III

METODOS EXPERIMENTAIS

III.1. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

III.1.1- EQUIPAMENTOS

Em todas as medidas de espalhamento de Raio-x foi utilizada uma fonte geradora "RIGAKU DENKI", um tubo "PHILIPS" com ânodo de cobre ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) de foco largo e potência de 2,7kw. Para eliminar aproximadamente 95% da radiação K_{β} , usamos um filtro de Ni de 20 μm de espessura⁽⁸¹⁾, colocado logo na saída do tubo.

O alinhamento do feixe de raio-x foi feito com um sistema de colimação por blocos (que será detalhado mais adiante) e usamos também um porta amostra e um tubo cilíndrico com sistema de vácuo para diminuir o espalhamento e a absorção do raio-x pelo ar. E, finalmente, no extremo, o detector com sua eletrônica. O esquema dessa montagem pode ser visto na figura III-1.

As intensidades de espalhamento foram registradas através de um detector sensível à posição. Como as amostras biológicas em solução apresentam geralmente um espalhamento muito pequeno, é necessário ou aumentar o tempo de exposição ou a radiação incidente.

Em nosso caso, a única alternativa era pelo tempo de exposição, que foi de aproximadamente 6 horas por amostra.

O uso então, de um detector sensível à posição, que registra ao mesmo tempo as intensidades espalhadas em 256 pontos angulares, foi de vital importância.

Fonte: Tubo "Philips"

- A : filtro de Ni de 20 μm .
- B : sistema de colimação do feixe
- C : porta amostra
- D : sistema com vácuo
- E : anteparo do feixe direto ("beam stop")
- F : detector sensível à posição
- G : eletrônica do detetor
- S : plataforma de suporte

Figura III-1. esquema do sistema de equipamentos para experiência com SAXS.

O detector por sua vez está acoplado a um conjunto eletrônico composto de pré-amplificadores, amplificadores, analizador, discriminador, somador de ondas e um micro processador para armazenamento dos dados, que estão ligados ao computador VAX-780 para o qual são finalmente transferidos os dados coletados. Todo esse conjunto pode ser observado na figura III-2.

Figura III-2. Detector proporcional sensível à posição e sua eletrônica

O detector é constituído por um filamento de quartzo, revestido de carbono, que está envolvido por uma mistura de gases (O_2 , N_2 , Metano) denominado P10, sob uma pressão de 75 PSI. O fotón espalhado pela amostra ioniza o gás que irá descarregar no filamento.

O sinal gerado é enviado para cada um dos lados do detector, chegando em tempos diferentes. Estes sinais são então amplificados e em seguida disparam um pulso (start e stop). Como eles chegam em tempos diferentes ao conversor, a posição de entrada do fotón é determinada em função dessa diferença. A presença do "delay" é para garantir que o sinal de start sempre chegue primeiro.

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 fotón inicial. O discriminador foi calibrado para selecionar os picos produzidos no detector pelos fotóns da radiação $CuK\alpha$ e para eliminar o ruído de fundo. A seguir, o sinal proporcional à intensidade é enviado ao canal correspondente no multicanal. As condições de trabalho foram:

Tensão no detector..... 2.57 KV

resolução do detector..... 200 μm

discriminador: base $E = 1.9 V$

altura da janela $\Delta E = 2.2 V$

Para se usar corretamente o Detector sensível à posição (D.S.P.), é necessário um levantamento sobre a sua linearidade e sensibilidade, além, é claro, da relação entre ângulo de espalhamento e o número do canal.

Inicialmente, foi colocado o detector sobre uma plataforma, que permitiu controlar milimetricamente o seu movimento em qualquer direção, e a uma distância $D = 333$ mm do porta amostra, como indica o esquema da figura III-3.

I_0 - feixe incidente

A - porta amostra

I - feixe espalhado

D - distância da amostra ao detector = 333 mm

DSP - detector sensível à posição

2θ - ângulo de espalhamento

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

Figura III-3. esquema de posicionamento do detector em relação ao feixe incidente e ao porta amostra.

A seguir, usando baixa intensidade para o feixe incidente (20 KV e 10mA), filtros atenuadores e uma fenda no lugar do porta amostra, deslocou-se o detector de 5 em 5 mm. A curva levantada pode ser observada na figura III-4.

O coeficiente angular da reta obtida na figura III-4 nos fornece a relação:

$$K = 0,30 \text{ mm/canal} \quad (\text{III.1.a})$$

ou

$$\frac{1}{K} = 3,333 \text{ canais/mm} \quad (\text{III.1.b})$$

Observando o desenho da figura III-3 e com o valor de K obtido acima, podemos relacionar o n° do canal (NC) com o ângulo de espalhamento (2θ):

$$2\theta \text{ (radianos)} = \frac{Y}{D} = \frac{K \cdot NC}{D} \quad (\text{III.2})$$

Para $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$, $\sin \theta \sim \theta$ e $h = 2\pi S = \frac{2\pi(2\theta)}{\lambda}$
teremos:

$$2\theta = 0,0009 \cdot NC \text{ (radianos)}$$

$$2\theta = 0,0516 \cdot NC \text{ (graus)}$$

$$S = 0,000584 \cdot NC \text{ (\AA}^{-1}\text{)}$$

$$h = 0,00367 \cdot NC \text{ (\AA}^{-1}\text{)}$$

Após essa calibração, foi colocado um "beam-stop" no canal zero para proteção de detector. A seguir, foi feito um levantamento da sensibilidade do detector.

Figura III-4. Curva de calibração do detector

Para isso, usamos uma amostra de carvão vítreo padrão, e cobrimos todo o feixe espalhado, com exceção de uma fenda de 10 mm x 0,5 mm colocada em um ângulo 2 θ .

Em seguida, deslocamos o detector com velocidade constante ao longo do eixo y (perpendicular à direção do feixe), permitindo portanto que apenas o canal que estivesse passando na frente da fenda recebesse radiação. E como a velocidade de deslocamento era constante, todos os canais receberam a mesma quantidade de raio-x.

A curva assim obtida pode ser vista na figura III-5, e podemos dizer que o detector é homogêneo na ordem de 10%.

Figura III-5. Curva de sensibilidade do detector.

Um outro aspecto importante também a ser verificado é quanto à estabilidade do feixe de raio-x durante os longos períodos de exposição. Para isso foram feitas medidas com carvão vitro em intervalos regulares, durante 24 horas. Os resultados indicaram uma boa estabilidade do feixe e podem ser observados na figura III-6.

Figura III-6. Gráfico da curva de estabilidade do feixe de raio-x ao longo de 24 horas de exposição.

III.1.2. SISTEMA DE COLIMAÇÃO

Sistemas de colimação de raio-x que produzem feixes incidentes de secção puntual ainda são poucos utilizados em experiência de espalhamento a baixos ângulos, principalmente se o material a ser estudado for macromoléculas em solução, devido as baixas intensidades obtidas. O uso de feixe puntual é usado principalmente em laboratórios com radiação sincrotron.

Normalmente, utilizam-se feixes com secção transversal na forma de retângulos com altura de aproximadamente 10 mm e largura de 1.0 a 1.5 mm.

Para se obter esse tipo de geometria do feixe, é necessário usar ou um sistema de fendas ^(8,22,23) ou um sistema de blocos ⁽⁹⁾. O sistema de fendas proporciona um perfil do feixe do tipo gaussiano, enquanto que o de blocos nos dá um perfil linear e infinito.

Em nossas experiências, usamos o sistema de colimação por blocos, também chamado de "sistema de colimação Kratky", ou simplesmente "câmara de Kratky". Ele tem a vantagem de reduzir quase totalmente o espalhamento parasita, além de permitir medidas em ângulos mais próximos de zero. O esquema dessa colimação é mostrado na figura III-7.

Fonte: fonte de Raio-x
 B_1 , B_2 , B_3 : blocos com superfície polida
 D: distância da amostra ao D.S.P. (333 mm)
 D.S.P.: detector sensível à posição
 bS: "beam-stop"
 2θ : ângulo de espalhamento
 A: Amostra

Figura III-7. Desenho esquemático do sistema de colimação Kratky

III.1.3. PERFIL DO FEIXE

Como já dissemos, o sistema de colimação por blocos fornece um feixe cujo perfil chamamos de linear e infinito. Entretanto, a teoria de espalhamento a baixos ângulos foi desenvolvida para um feixe puntual, então correções nos valores experimentais da intensidade de espalhamento precisam ser feitas levando-se em conta esse perfil.

Para determinar o perfil horizontal, retiramos o "beam-stop", colocamos um filtro de cobre de 100 μm de espessura na saída da fonte de raio-x e usamos baixa potência (20 KV e 10 mA). Os valores da intensidade encontrada estão no gráfico da figura III-8.

Este gráfico permite também a determinação da posição do que chamaremos de canal zero ou ângulo zero. Os valores assim encontrados serão utilizados no programa de computação para correção do feixe, como veremos mais adiante.

Quanto ao perfil vertical, usamos as mesmas condições anteriores e, deslocando a plataforma do detector ao longo do eixo vertical em intervalos de 2 mm, medimos as intensidades, sempre no mesmo canal zero. O resultado pode ser observado no gráfico da figura III-9 a seguir.

Figura III-8. Perfil horizontal do sistema de colimação por blocos

Figura III-9. Gráfico do perfil vertical da colimação por blocos.

As condições para a obtenção do feixe linear e infinito são: 1) apresente um patamar de intensidade constante (gráfico III-9). 2) O limite angular máximo dado por ⁽⁵²⁾:

$$h_m \leq \frac{\pi (Z - \Delta J)}{D \cdot \lambda} \quad \text{III.3}$$

onde:

h_m : é o valor de h para o qual o espalhamento produzido pelo sistema é desprezível, ou seja, $I(h_m) \ll I(0)$

Z : altura do feixe no plano do detector

ΔJ : altura da janela do detector

D : distância da amostra ao detector

λ : comprimento de onda

Em nosso caso, tínhamos os seguintes valores: $Z = 50\text{mm}$, $\Delta J = 5\text{mm}$, $D = 333\text{mm}$ e $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$. Nestas condições resulta $h_m < 0.28 \text{ \AA}^{-1}$.

Todo o processo de calibração, ajuste dos equipamentos e determinação dos perfis foram feitos em colaboração com os professores José Ramon B. Abrego e Dimas Voillet.

III.2. METODOS DE ANÁLISE DOS DADOS EXPERIMENTAIS

III.2.1. NORMALIZAÇÃO DAS CURVAS DE INTENSIDADE DE ESPALHAMENTO

Quando se trabalha com macromoléculas em solução, utiliza-se comumente como porta-amostras capilares de vidro Lyndemann, que são poucos absorvedores dos raios-x. O diâmetro médio dos capilares usados é da ordem de 1,0 mm.

Para se obter a intensidade de espalhamento devido somente à macromolécula, é necessário subtrair a contribuição do capilar e do solvente. A expressão da intensidade normalizada será dada por⁽⁵²⁾:

$$J_n(h) = \frac{A_c J_c(h)}{x \cdot J_d \cdot \Delta t} - \frac{(1-\omega)A_s J_s(h)}{x \cdot J_d \cdot \Delta t} \quad (\text{III.4})$$

onde:

- $J_c(h)$: Intensidade de espalhamento da solução
- $J_s(h)$: Intensidade de espalhamento do solvente
- A_c : Atenuação da solução
- A_s : Atenuação do solvente
- x : Espessura da amostra
- J_d : Intensidade do feixe direto
- Δt : Tempo de exposição
- ω : Fração do volume total ocupado pelo soluto

As medidas da intensidade do feixe direto são difíceis de serem feitas, pois sempre trazem o risco de danificar o detector devido as altas intensidades. Uma das maneiras para contornar essa dificuldade é usar uma amostra padrão de alto poder espalhador, como por exemplo carvão vítreo (CV), pois a intensidade espalhada por essa amostra é proporcional à intensidade do feixe direto. As medidas com CV foram sempre no mesmo ângulo, feitas antes e depois das medidas com as amostras de proteínas e o valor utilizado foi calculado pela média aritmética delas.

Quanto à atenuação, ela é definida como a razão entre a intensidade do feixe incidente pela intensidade do feixe transmitido pela amostra. Novamente aqui se apresenta o problema da medida da intensidade do feixe direto, e a solução adotada também foi o uso de uma amostra padrão (carvão vítreo), que tem um poder de espalhamento muito maior do que o das proteínas.

Então, a atenuação pode ser calculada pela razão entre a intensidade espalhada pelo CV num ângulo fixo $J_{CV}(h_1)$ e a intensidade espalhada pelo CV, mais a amostra no mesmo ângulo $J_{CVA}(h_1)$, ou seja⁽⁵²⁾:

$$A = \frac{J_{CV}(h_1)}{J_{CVA}(h_1)} \quad (III-5)$$

Esta equação é uma aproximação de uma expressão mais geral dada por:

$$A = \frac{J_{CV} - J_k/A_{CV}}{J_{CVA} - J_A/A_{CV}} \quad (III-6)$$

onde J_k é a intensidade de espalhamento sem a amostra e sem o carvão vítreo. J_A é a intensidade com amostra e sem o carvão vítreo e A_{cv} é a atenuação do carvão vítreo. É preciso lembrar que todas as medidas de espalhamento das equações III - 6 são feitas no mesmo ângulo h_i .

Entretanto, como $J_{cv} \gg J_k/A_{cv}$ e $J_{cva} \gg J_A/A_{cv}$, a equação III.5 acima é válida.

A espessura x da amostra pode ser determinada a partir da relação⁽⁵⁹⁾:

$$J_T = J_i e^{-\mu x} \quad (\text{III-7})$$

onde J_T é a intensidade transmitida, J_i a intensidade incidente e μ o coeficiente de absorção da amostra. Reescrevendo a equação acima, podemos relacionar a espessura com a atenuação:

$$x = \frac{1}{\mu} \ln \frac{J_T}{J_i} = \frac{1}{\mu} \ln \frac{J_{cv}}{J_{cva}} \propto \ln A \quad (\text{III-8})$$

O tempo de exposição Δt variou de 4 a 6 horas para cada amostra. Geralmente, a amostra mais concentrada apresenta uma maior intensidade de espalhamento, permitindo portanto um menor tempo de exposição. Isto é feito para que as intensidades obtidas pelas amostras apresentem aproximadamente o mesmo erro relativo. Sabe-se que intensidade e o desvio associados a uma medida com N contagem são dados por $N \pm \sqrt{N}$, e portanto o erro relativo será $E_R = \frac{\sqrt{N}}{N} = 1/\sqrt{N}$

Quanto à fração W , ela é definida como a razão entre o volume total do soluto pelo volume total da solução. O

valor usado foi 0.1 e é aproximadamente o mesmo para diferentes macromoléculas⁽⁵⁵⁾.

Com os valores de $J_n(h)$ assim obtidos, é possível uma comparação entre as diferentes curvas de espalhamento das diversas amostras.

III.2.2. EXTRAPOLAÇÃO PARA DILUIÇÃO INFINITA E ELIMINAÇÃO DO BACKGROUND

Para se eliminar os efeitos de interferência inter-partículas, devem ser realizadas 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 da intensidade de espalhamento para uma concentração zero (ou diluição infinita).

Isto é necessário, pois toda teoria de espalhamento foi feita levando-se em conta a não interferência entre o espalhamento produzido por cada partícula^(a).

É possível extrapolar também parâmetros individuais, tais como o raio de giração R_g , a intensidade em ângulo zero $I(0)$ ou mesmo a função distribuição de distância $P(r)$.

O critério aqui adotado é a extrapolação para a concentração zero da curva de intensidade normalizada em relação à própria concentração $J_n(h)/C$, usando para isso um programa computacional com o método dos mínimos quadrados. A extrapolação é feita para cada um dos pontos angulares nas diferentes concentrações.

Em nossas experiências, fizemos em média quatro diluições para cada amostra, e sempre mantendo uma relação entre uma e outra menor que um fator 2.

A teoria de espalhamento por partículas é baseada num modelo que supõe duas fases com densidades eletrônicas diferentes, mas sem flutuações dentro de cada uma delas.

Na realidade, as soluções de proteínas são compostas de duas fases (soluto e solvente) que apresentam flutuações de densidade eletrônica dentro de cada uma delas, que dão origem a um espalhamento essencialmente constante, independente de h .

Para utilizar o modelo de duas densidades eletrônicas, é necessário, portanto, subtrair do espalhamento experimental a contribuição dessas flutuações^(24,25).

Como já foi mostrado no capítulo II, a intensidade de espalhamento em ângulos grandes pode ser escrita como:

$$I(h) = \frac{A}{h^4} + I_b(h) \quad (\text{III-9})$$

ou, se usarmos a intensidade de espalhamento sem correção por efeito do perfil do feixe (como será discutido adiante), teremos:

$$J(h) = \frac{A}{2\pi h^3} + J_b(h) \quad (\text{III-10})$$

onde A é a constante de Porod.

Dentro dessa região angular, podemos considerar $J_b(h) = J_b$ como sendo uma constante. Se multiplicarmos a equação III.10 por h^3 teremos:

$$J(h) h^3 = \frac{A}{2\pi} + J_b h^3 \quad (\text{III-11})$$

E, a partir da curva do gráfico de $J(h) h^3 \times h^3$, podemos determinar o valor de J_b , que é o coeficiente angular da reta, como mostra o desenho da figura III.10.

A constante de Porod pode também ser determinada no mesmo gráfico, a partir da intersecção da reta com o eixo das ordenadas.

Figura III-10. Esquema de um gráfico de $J(h) h^3 \times h^3$, mostrando o afastamento da lei de Porod, causada pelas flutuações da densidade eletrônica dentro do soluto e do solvente.

III.2.3. CORREÇÃO DAS CURVAS DE ESPALHAMENTO DEVIDO AO SISTEMA DE COLIMAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA.

Como as fendas ou blocos usados para colimar o feixe de raio-x não definem um feixe incidente de secção puntiforme, as curvas de espalhamento sofrem uma modificação que pode ser apreciável. As intensidades experimentais precisam portanto ser corrigidas dos efeitos causados pelo perfil do feixe.

O objetivo principal no tratamento dos dados é obter a intensidade de espalhamento corrigida $I(h)$ e a função distribuição de distância $P(r)$, a partir da curva de espalhamento experimental $J_N(h)$.

O método usado é o desenvolvido por Glatter⁽³⁰⁾, denominado Método de Transformação Indireta de Fourier (ITP), que corrige as curvas experimentais dos efeitos acima descritos.

Vamos denominar as transformações de T_1 , T_2 , T_3 e T_4 , onde :

T_1 : É a transformada de Fourier da função correlação $\gamma(r)$ e a intensidade $I(h)$, que é dada por:

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} P(r) \frac{\sin hr}{hr} dr \quad (\text{III-12})$$

$$\text{onde } P(r) = \gamma(r) \cdot r^2$$

T_2 : A curva de espalhamento observada $I_m(h)$, medida com radiação policromática está relacionada com a curva $I(h)$ pela integral:

$$I_m(h) = \int_0^{\infty} W(\lambda') I(h/\lambda') d\lambda' \quad (\text{III-13})$$

onde $\lambda' = \frac{\lambda}{\lambda_0}$, e $W(\lambda')$ representa a função distribuição de comprimento de onda da radiação policromática e λ_0 é o comprimento de onda da radiação monocromática.

T_3 e T_4 : Representam as correções correspondentes aos perfis vertical $V(y)$ e horizontal $H(x)$.

As equações desenvolvidas pela teoria de SAXS são válidas para feixes de secção puntiforme. Se o feixe possui uma secção linear, existe uma distribuição de intensidade, $V(t)$, ao longo de sua altura.

A intensidade espalhada observada, $J_v(h)$, será então o resultado da contribuição de todo o espalhamento procedente da amostra banhada por este feixe e pode-se escrever que⁽⁸⁾:

$$J_v(h) = 2 \int_0^{+\infty} I(h^2 + t^2)^{1/2} V(t) dt \quad (\text{III-14})$$

Em nosso trabalho, a função $V(t)$ usada foi uma constante e seu valor foi calculado por mínimos quadrados a partir do patamar do gráfico da figura III.9.

A correção devido à largura do feixe (perfil horizontal) segue o mesmo princípio, e, se existe uma distribuição de intensidade $H(x)$ ao longo de sua largura, então a intensidade de espalhamento observada $J_H(h)$ será dada por⁽⁸⁾:

$$J_H(h) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(h^2 + x^2)^{1/2} H(x) dx \quad (\text{III-15})$$

A função $H(x)$ utilizada nos cálculos pode ser observada no gráfico da figura III.8.

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

$$I_{\text{exp}}(h) = 8\pi \int_{-\infty}^{\infty} dx \int_0^{\infty} dt \int_0^{\infty} d\lambda' \int_0^{\infty} dr \cdot H(x) \cdot V(t) \cdot W(\lambda') \cdot P(r) \sin \beta/\beta$$

$$\text{e } \beta = r[(h-x)^2 + t^2]^{1/2}/\lambda' \quad (\text{III-16})$$

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 supondo um valor para a máxima dimensão da partícula (D), para a qual a função $P(r) = 0$, quando $r \geq D$. Porém, para os valores de r , entre 0 e D , ela pode ser aproximada por uma combinação linear de um certo número N de funções ϕ_ν :

$$P(r) = \sum_{\nu=1}^N C_\nu \phi_\nu(r) \quad (\text{III-17})$$

onde $\phi_\nu(r)$ 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_ν são desconhecidos.

O próximo passo é aplicar as transformações T_1 , T_2 , T_3 e T_4 às funções $\phi_\nu(r)$. O resultado pode ser escrito como:

$$\chi_\nu(h) = T_4 T_3 T_2 T_1 \phi_\nu(r) = T_4 T_3 T_2 \psi_\nu(h) \quad (\text{III-18})$$

$$\text{onde } \psi_\nu(h) = T_1 \phi_\nu(r) \quad (\text{III-19})$$

Os coeficientes C_ν são agora determinados pelo método dos mínimos quadrados, tal que ele representa uma ótima aproximação dos dados experimentais, ou seja ⁽²⁰⁾:

$$\sum_{i=1}^M \left[I_{\text{exp}}(h_i) - \sum_{\nu=1}^N C_\nu X_\nu(h_i) \right]^2 / \sigma^2(h_i) = \text{mínimo} \quad (\text{III-20})$$

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

A curva de espalhamento corrigida é definida então por:

$$I(h) = \sum_{\nu=1}^N C_\nu \psi_\nu(h) \quad (\text{III-21})$$

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

$$R_g^2 = \frac{\int_0^D P(r) r^2 dr}{2 \int_0^D P(r) dr} \quad (\text{III-22})$$

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

III.3. MÉTODOS COMPUTACIONAIS

Para o desenvolvimento e análise dos nossos resultados experimentais, foi necessário o uso de vários programas computacionais, devido à complexidade de alguns cálculos e da quantidade de dados envolvidos.

Um dos principais programas é o que calcula a função distribuição de distância $P(r)$ a partir das intensidades experimentais, usando o método das transformações indiretas^(38,39,40,41) descrito no item III.2. Essa rotina inclui também as operações de alisamento pelo método dos mínimos quadrados pesados, transformação com mínimos efeitos de terminação, e fornece, ainda, o erro propagado.

Se o sistema em estudo for monodisperso, podem ser calculadas:

- a) função distribuição de distâncias da partícula total;
- b) função distribuição de distâncias de intramolecular distâncias entre duas subunidades marcadas;
- c) função distribuição de distâncias da seção transversal de uma partícula cilíndrica;
- d) função distribuição de distâncias da seção transversal de uma partícula em forma lamelar.

Para um sistema polidisperso, é possível a determinação da função distribuição de tamanhos ou volumes.

O programa é composto de um corpo principal e mais 19 subrotinas, com as seguintes funções:

1. rotina para inversão de matriz
2. cálculo das funções B-Spline
3. transformação de Fourier tridimensional
4. transformação de Hankel para partículas cilíndricas
5. transformação de Fourier-Cosseno para partículas lamelares
6. cálculo da função Bessel de ordem zero
7. rotina para entrada do perfil do feixe (altura)
8. rotina para entrada do perfil do feixe (largura)
9. rotina para entrada do perfil do comprimento de onda
10. correção das intensidades de espalhamento pelo efeito de altura da fenda
11. correção das intensidades de espalhamento pelo efeito de largura da fenda
12. correção das intensidades de espalhamento pelo efeito de comprimento de onda
- 13.4 rotinas de interpolações
14. rotinas para o gráfico de estabilidade
15. transformação para sistemas polidispersos
16. transformação para distribuição de tamanhos de partículas não esféricas

Esse programa exige uma memória mínima de 32 Kwords, e foi fornecido por Otto Glatter ao Laboratório de Cristalografia do IFQSC. Os aspectos práticos para o seu uso podem ser encontrados na referência (37).

Em complemento a essa rotina, existe um outro programa que serve para compilar e imprimir todos os arquivos dos dados gerados acima.

Modelos teóricos para as formas das proteínas estão sendo propostos. As comparações com a parte experimental são feitas através das curvas de intensidade de espalhamento $I(h)$ e funções distribuições de distância $P(r)$. Essas curvas são geradas pelo método dos elementos finitos, onde o modelo é representado por muitas pequenas subunidades esféricas (também podem ser cubos)^(42,43,44), e a intensidade de espalhamento de um conjunto de N partículas é dada pela expressão II.45 do capítulo II. Para uma única esfera de raio R , podemos escrever a expressão (Rayleigh-1914)^(a):

$$I_E(h) = \left[\frac{3(\text{sen } hR - hR \cos hR)}{h^3 R^3} \right]^2 \quad (\text{III-23})$$

Esses cálculos foram feitos em um programa de computação desenvolvido por O. Glatter^(45,54), no qual fizemos várias modificações, principalmente na parte que gera as coordenadas dos modelos teóricos. Essa rotina também é muito extensa e, dependendo do número de elementos (esfera) utilizada, pode demandar várias horas de C.P.U., dependendo do computador.

Desenvolvemos também alguns programas mais simples e complementares para ajudar na manipulação dos arquivos de dados, transformações, etc.

Parte desse trabalho computacional foi feito no VAX-780 do D.F.Q.S.C.; mas, a grande maioria foi realizada na estação de trabalho (SUN-SPARC 330) do Departamento de Física da UNESP - São José do Rio Preto.

III.4 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras tanto de soro albumina humana (SAH) como de soro albumina bovina (S.A.B) foram preparadas a partir de albumina P.A. liofilizadas livres de ácidos graxos, globulina e outros ligantes. A albumina humana usada foi da Sigma, cod. A-3782, lote 127F-9310 e a albumina bovina foi da Calbiochemical, lote 62204.

Elas foram pesadas em uma balança analítica e diluídas em tampão formiato de amônia 0,1 M nos diferentes pH's: 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0 e 7.0.

O tampão foi preparado a partir da diluição de 0,2 ml de ácido fórmico em 50 ml de H₂O destilada e deionizada. O ajuste do pH foi feito com NH₄OH 1:3.

→ Foram preparadas 50 amostras de albumina humana e bovina em várias concentrações, conforme mostra a tabela III.1

TABELA III.1

ALBUMINA HUMANA

pH	concentração em mg/ml			
	100	70	40	
2.5	100	70	40	
3.0	100	70	40	30
3.5	100	70	40	30
4.0	100	70	40	20
4.5	100	70	40	
5.0	100	70	40	20
7.0	100	70	40	20

ALBUMINA BOVINA

pH	concentração em mg/ml			
	100	70	40	
2.5	100	70	40	
3.0	100	70	40	
3.5	100	70	40	
4.0	100	70	40	20
4.5	70	40	10	5
6.0	100	70	40	
7.0	100	70	40	20

As amostras assim preparadas foram colocadas em capilares de Vidro Lyndemann de 1.0 mm de diâmetro interno e a seguir levadas para a difração.

A temperatura na sala estava controlada por aparelhos de ar condicionado em aproximadamente 20°C.

CAPITULO IV

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

IV.1. OBSERVAÇÕES E MEDIDAS PRELIMINARES

O nosso principal objetivo é observar, através da técnica de espalhamento de raio-x a baixos ângulos, as variações conformacionais da albumina em diferentes condições de pH. Isto para albumina humana (SAH) e para albumina bovina (SAB).

Devido às características das macromoléculas biológicas em geral, devemos tomar alguns cuidados, tanto na preparação das soluções, quanto nas coletas de dados:

a) Como a diferença entre a densidade eletrônica da proteína e a densidade eletrônica do solvente não é muito grande, a solução espalha muito pouco, o que nos leva a longos tempos de exposição ao raio-x, para se obter uma boa estatística.

b) Toda a teoria de espalhamento foi feita levando-se em conta a não interferência entre partículas. Portanto, os efeitos de concentração devem ser eliminados, e, para isso, fazemos medidas com concentrações decrescentes (entre 100 mg/ml até 10 mg/ml) e extrapolamos os resultados para concentração zero.

c) As curvas de espalhamento obtidas da solução têm contribuições também do solvente e do próprio capilar. Deve-se, portanto, subtrair dos resultados os espalhamentos do solvente e capilar.

d) Cuidados especiais devem ser tomados para saber os efeitos da radiação sobre a macromolécula. Foram feitos, então, testes de longa exposição (40 horas) com medidas a cada 30 minutos. Os resultados não indicaram qualquer dano da radiação sobre as albuminas, ou seja, os valores do raio de giração obtidos a partir das experiências permaneceram constantes.

e) Devido ao longo tempo de exposição, é necessário também um controle sobre a estabilidade do feixe incidente. Mudanças nas condições ambientais, como temperatura, podem influenciar as medidas. Para contornar esse problema, trabalhamos sempre com ar condicionado ligado e os testes de estabilidade feitos não mostraram mudança significativa na intensidade do feixe de raio-x.

IV.2. RESULTADOS DAS ALBUMINAS HUMANA E BOVINA

IV.2.1. INTENSIDADES DE ESPALHAMENTO, CORREÇÕES E NORMALIZAÇÕES

As intensidades de espalhamento de raio-x obtidas do soro albumina humana em pH's 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 e 7.0 e em concentrações variando entre 100 mg/ml e 20 mg/ml podem ser vistas nas figuras IV.1 e IV.2. Essas intensidades foram normalizadas segundo a equação IV.1 abaixo, e que já foi discutida no capítulo III.2.1:

$$J(h) = \frac{A_c J_c(h)}{x \cdot J_{cd} \cdot \Delta t} - \frac{A_s J_s(h)}{x \cdot J_{sd} \cdot \Delta t} \quad (\text{IV.1})$$

Para a soro-albumina bovina, essas curvas de espalhamento são apresentadas na figura IV.3 nos pH's 2.5, 3.0, 4.0, 4.5, 6.0 e 7.0.

Podemos observar nessas figuras que nem sempre as curvas coincidem na região de ângulos (h) grandes. Isso se deve à existência de flutuações internas na densidade eletrônica da partícula e do solvente. É preciso lembrar que a lei de Porod, válida na região de altos ângulos, foi desenvolvida para partículas com superfícies bem definidas e densidade eletrônica como uma função escada. O não cumprimento dessas condições ideais leva a um afastamento da lei de Porod^(24,25).

Como já discutimos na seção III.2.2, podemos eliminar os efeitos, ou ao menos diminuí-los sensivelmente, subtraindo o espalhamento devido às flutuações da densidade, da intensidade $J(h)$.

Os gráficos de Porod $J(h) \cdot h^3 \times h^3$, correspondentes a alguns pH's, podem ser vistos na figura IV.4 para as albuminas humanas e bovinas. Notamos nesses gráficos um desvio angular sempre positivo da lei de Porod.

Denominando as intensidades devido às flutuações acima citadas por J_b , calculamos:

$$J_n(h) = J(h) - J_b \quad (\text{IV.2})$$

Os valores de J_0 são dados pelo coeficiente angular da reta dos gráficos de Porod na região de altos ângulos.

Os gráficos de $J_n(h) \times h$ já corrigidos, estão apresentados nas figuras IV.5 e IV.6 para as albuminas humanas e em IV.7 para as bovinas. Podemos notar aqui, que o final das curvas de espalhamento estão coincidindo, indicando uma minimização do desvio da lei de Porod.

O próximo passo foi a normalização em relação à concentração e à extrapolação para a concentração zero pelo método dos mínimos quadrados, aplicado a cada posição angular nos diferentes pH's, ou seja, para um determinado pH, toma-se os valores das intensidades para cada concentração num mesmo h e extrapola-se para a concentração zero.

Esses resultados podem ser vistos nas figuras IV.8, e IV.9 e IV.10 respectivamente para as albuminas humanas e bovinas.

Com as intensidades extrapoladas à concentração zero, com as quais iremos efetivamente trabalhar, calculamos novamente $J_n \phi(h) \cdot h^3 \times h^3$, para uma verificação final. Os resultados obtidos indicaram um bom acordo com a lei de Porod. Na figura IV.11 mostramos algumas dessas curvas, tanto para albumina humana quanto para a bovina.

A dispersão observada para h grande é de uma certa forma consequência das oscilações devido às baixas intensidades de espalhamento obtidas nessa região, e ao multiplicar $J(h)$ por h^3 essas oscilações tendem a se acentuar.

Figura IV.1. Intensidade de espalhamento do soro albumina humana normalizada $J(h)$ para várias concentrações em diferentes pH's

* 100 mg/ml

+ 40 mg/ml

□ 30 mg/ml

Δ 70 mg/ml

x 20 mg/ml

Figura IV.2 Intensidade de espalhamento do soro albumina humana normalizada $J(h)$ para várias concentrações e diferentes pH's

* 100 mg/ml	+ 40 mg/ml	□ 30 mg/ml
Δ 70 mg/ml	x 20 mg/ml

Figura IV.3 Intensidade de espalhamento do soro albumina bovina normalizada $J(h)$ para várias concentrações e diferentes pH's

* 100 mg/ml

+ 40 mg/ml

x 20 mg/ml

Δ 70 mg/ml

○ 10 mg/ml

◇ 5 mg/ml

Figura IV.4 À esquerda alguns gráficos de Porod $J(h) \cdot h^3 \times h^3$ da albumina humana e à direita alguns da albumina bovina.

Figura IV.5 Intensidade de espalhamento da albumina humana, $J_n(h)$, para várias concentrações e diferentes pH's já eliminado o background

* 100 mg/ml + 40 mg/ml x 20 mg/ml
 Δ 70 mg/ml $\square$ 30 mg/ml

Figura IV.6 Intensidade de espalhamento da albumina humana, $J_n(h)$, para várias concentrações e diferentes pH's já eliminado os efeitos de flutuação da densidade eletrônica

* 100 mg/ml	+ 40 mg/ml	□ 30 mg/ml
Δ 70 mg/ml	x 20 mg/ml

Figura IV.7 Intensidade de espalhamento $J_n(h)$, da albumina bovina, com os efeitos das flutuações da densidade eletrônica já eliminados.

* 100 mg/ml	+ 40 mg/ml	x 20 mg/ml
Δ 70 mg/ml	O 10 mg/ml	$\diamond$ 5 mg/ml

Figura IV.8 Intensidade normalizada em relação à concentração e extrapolação à concentração zero para as albuminas humanas. pH's variando em 2.5, 3.0, 3.5 e 4.0.

* 100 mg/ml + 40 mg/ml □ 30 mg/ml
 Δ 70 mg/ml x 20 mg/ml — zero

Figura IV.9 Intensidade de espalhamento normalizada em relação à concentração e extrapolada para concentração zero para albumina humana pH's de 4.5, 5.0 e 7.0

* 100 mg/ml + 40 mg/ml □ 30 mg/ml
 Δ 70 mg/ml × 20 mg/ml — zero

Figura IV.10 Intensidade de espalhamento normalizada em relação à concentração e extrapolada para concentração zero para a albumina bovina. * 100 mg/ml + 40 mg/ml O 10 mg/ml
 Δ 70 mg/ml x 20 mg/ml ◇ 5 mg/ml — zero

Figura IV.11 Gráfico de $J_{n0}(h)h^3 \times h^3$ de intensidade extrapolada para concentração zero. A esquerda albumina humana e à direita albumina bovina.

IV.2.2 INTENSIDADE DE ESPALHAMENTO CORRIGIDA E GRÁFICOS DE GUINIER

Partindo das intensidades de espalhamento extrapoladas à concentração zero $J_n \phi(h)$ e usando o programa de computação do método das transformações indiretas de Fourier (capítulo III.3), calculamos as intensidades corrigidas $I(h)$ (capítulo III.2.3). Como já vimos, essas intensidades são corrigidas devido ao sistema de colimação e perfil do feixe.

As curvas assim obtidas podem ser vistas na figura IV.12.

Nós vimos no capítulo II que na região de $h \rightarrow 0$ podemos aproximar a curva de intensidade de espalhamento (equação II.28) por:

$$I(h) = I(0) \exp \left[- \frac{h^2 R_g^2}{3} \right] \quad (\text{IV.3})$$

O método de Guinier para determinar o raio de giração (R_g) das partículas é bastante simples. Primeiro calculamos o logaritmo da expressão acima:

$$\log I(h) = \log I(0) + \frac{h^2 R_g^2}{3} \cdot \log e \quad (\text{IV.4})$$

simplificando teremos:

$$\log I(h) = 0,1448 R_g^2 h^2 + \text{cte}$$

e a partir da inclinação (α) do gráfico de $\log I(h)$ x h^2 teremos:

$$R_g = 2.028 \sqrt{-\alpha} \quad (\text{\AA}) \quad (\text{IV.5})$$

ou em unidades de S e 2θ :

$$(\text{SD}) \longrightarrow R_g = 0,4183 \sqrt{-\alpha} \quad (\text{\AA}) \quad (\text{IV.6})$$

$$(2\theta) \longrightarrow R_g = 0,645 \sqrt{-\alpha} \quad (\text{\AA}) \quad (\text{IV.7})$$

Entretanto, alguns cuidados devem ser tomados em relação aos dados experimentais. Para uma partícula com raio de giração R_g , existe um limite h_L acima do qual a lei de Guinier não é válida. Para partículas esféricas, esse limite é dado por $h_L R_g = 1.3$, e para partículas cilíndricas, teremos $h_L R_g = 0.7^{(a)}$.

Como veremos mais adiante, nosso sistema não se encaixa perfeitamente em nenhum dos dois casos. Entretanto, se tomarmos esses valores como limites e sendo o raio de giração médio das albuminas (calculado por outro método) ao redor de 30 $\text{\AA}$, teremos $0,023 \text{ \AA}^{-1} < h_L < 0,043 \text{ \AA}^{-1}$. Mesmo se tomarmos o limite superior, significa que não devemos ultrapassar $h_L = 0,043 \text{ \AA}^{-1}$ ou $h_L^2 = 0,0019 \text{ \AA}^{-2}$.

Os gráficos de Guinier podem ser vistos nas figuras IV.13 e IV.14 para albumina humana e IV.15 para albumina bovina.

Um resumo dos resultados obtidos para o R_g pelo método de Guinier está na tabela IV.1, tanto para as albuminas humanas, como para as bovinas.

Se observarmos essa tabela, vemos uma pequena discrepância entre os resultados da S.A.H. e da S.A.B. que deveriam em princípio ser parecidos se comparados no mesmo pH.

Figura IV.12 Intensidades de espalhamento corrigida $I(h)$. Em cima albumina humana, em baixo albumina bovina.

* pH 2.5	□ pH 4.0	○ pH 6.0	+ pH 3.5
Δ pH 3.0	x pH 4.5	♀ pH 7.0	◇ pH 5.0

Figura IV.13 Gráfico de Guinier para os pH's 2.5, 3.0 e 3.5 e 4.0 da albumina humana.

Figura IV.14 Gráficos de Guinier nos pH's 4.5, 5.0 e 7.0 para albumina humana.

Figura IV.15 Gráficos de Guinier da albumina bovina nos pH's 2.5, 3.0, 4.0, 4.5, 6.0, 7.0.

TABELA IV.1

pH	$R_g(\text{\AA})$	$R_g(\text{\AA})$
	ALBUMINA HUMANA	ALBUMINA BOVINA
2.5	34,5	29,3
3.0	31,9	32,6
3.5	26,1	
4.0	31,3	33,4
4.5	32,3	32,4
5.0	31,3	
6.0		
7.0	32,8	30,2

Tabela IV.1 Valores do raio de giração (R_g) calculados pelo método de Guinier para o soro albumina humana (SAH) e bovina (SAB), em diferentes pH's.

IV.2.3. FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTANCIA ($P(r)$), E RAIO DE GIRAÇÃO PELO MÉTODO INTEGRAL

O programa de computação do método das transformações indiretas de Fourier (ITP) também fornece a função distribuição de distância $P(r)$ (equações II.39) e o raio de giração R_g (equação II.40). As funções $P(r)$ para a albumina humana nos diversos pH's estão nas figuras IV.16 e IV.17. Essas mesmas funções para as albuminas bovinas podem ser vistas nas figuras IV.18 e IV.19.

Uma simples observação dessas figuras já nos mostra que as albuminas humanas e bovinas sofrem uma grande variação conformacional com a mudança do pH.

Apesar de toda essa variação, algumas características permanecem constantes em todos os pH's. Uma delas é a existência de um pico ao redor de 20 Å, às vezes mais intenso, como nos pH's 2.5, 3.0, 3.5, e outras aparecendo mais como um ombro.

Uma outra característica que se nota é o valor da máxima dimensão, sempre ao redor de 90 Å. Quanto ao pico que aparece por volta dos 82 Å, ele estaria ligado às flutuações quase periódicas que ocorrem nas intensidades de espalhamento, principalmente na região de grandes ângulos. Nos próximos capítulos, discutiremos com maiores detalhes o significado de cada um dos picos em face dos modelos estruturais propostos.

Figura IV.16 Função distribuição de distâncias $P(r)$ da albumina humana nos pH's 2.5, 3.0, 3.5 e 4.0.

Figura IV.17 Função distribuição de distâncias $P(r)$ da albumina humana nos pH's 4.5, 5.0, 7.0.

Figura IV.18 Função distribuição de distâncias $P(r)$ da albumina bovina nos pH's 2.5, 3.0 e 4.0

Figura IV.19 Função distribuição de distâncias $P(r)$ da albumina bovina nos pH's 4.5 e 7.0

Com as variações conformacionais observadas, é de se esperar que ocorram também variações no raio de giração (R_g). Os valores encontrados podem ser observados na tabela IV.2, para as albuminas humanas e bovinas. Para distingui-los do raio de giração calculados por Guinier, chamaremos de R_g (ITP).

TABELA IV.2

pH	R_g (ITP) Å	R_g (ITP) Å
	ALBUMINA HUMANA	ALBUMINA BOVINA
2.5	35,0	30,2
3.0	32,8	32,7
3.5	26,7	
4.0	31,6	33,7
4.5	32,6	32,7
5.0	31,2	
7.0	33,4	30,3

Tabela IV.2 Valores do raio de giração calculados pela equação II.40. Os resultados são para soro albumina humana (S.A.H.) e soro albumina bovina (S.A.B.).

CAPITULO V

MODELOS ESTRUTURAIS

V.1. TÉCNICAS COMPUTACIONAIS

Para interpretar melhor os resultados experimentais, é necessário uma comparação com intensidades de espalhamento e função distribuição de distâncias de modelos teóricos.

Esses modelos são construídos a partir de pequenas subunidades de tamanho muito menor que o da albumina, com formatos de esferas ou cubos^(42,43,44,45).

Em nosso trabalho, optamos por esferas, que têm sobre os cubos algumas vantagens. A principal delas está na precisão dos cálculos computacionais, que não dependem da estrutura do modelo (alongado, ovalado, esférico, etc...) e permite determinar as funções $I(h)$ e $P(r)$ dos agregados por equações analíticas.

Para o cálculo computacional de $I(h)$ e $P(r)$, é mais conveniente reescrever as equações II-39 e II-45 em termos de somatória, devido aos limites de integração tenderem ao infinito. Teremos então:

$$I(h) = \sum_{i=1}^n v_i^2 \rho_i^2 \phi_i^2(h) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n \rho_i \rho_k v_i v_k \phi_i(h) \phi_k(h) \frac{\sin(h \cdot d_{ik})}{h \cdot d_{ik}} \quad (V-1)$$

onde 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. O termo ϕ_i é dado por:

$$\phi_i(h) = \frac{3[\text{sen}(hR_i) + (hR_i) \cos(hR_i)]}{(hR_i)^3} \quad (V-2)$$

sendo R_i o raio de i -ésima esfera.

Quanto à função distribuição de distância $P(r)$, podemos escrevê-la na mesma forma que a equação $I(h)$ acima, ou seja:

$$P(r) = \sum_{i=1}^n \rho_i^2 p_0(r, R_i) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n \rho_i \rho_k \bar{p}(r, d_{ik}, R_i, R_k) \quad (V-3)$$

onde $p_0(r, R_i)$ é a função distribuição de distância de uma esfera de raio R_i e densidade eletrônica igual à unidade. O termo cruzado $\bar{p}(r, d_{ik}, R_i, R_k)$ é a função distribuição de distância entre a esfera i e a esfera k .

Considerando as esferas como tendo raios iguais a R e a distância entre os seus centros igual a d [$d > 2R$], então os valores de p_0 e $\bar{p}$ serão:

$$p_0(r, R) = \frac{4}{3} \pi R^3 r^2 - \pi R^2 r^3 + \frac{\pi}{12} r^3 \quad (V-4)$$

e para $d > 2R$, $\bar{p}(r, d, R)$ assumirá os valores:

0 $0 \leq r \leq d - 2R$

$P_A(r)$ $d - 2r \leq r \leq d - R$

$P_B(r)$ $d - R \leq r \leq d + R$

$P_A(r)$ $d + R \leq r \leq d + 2R$

0 $d + 2R < r$

onde

$$P_A(r) = \frac{\pi r}{6d} \left[\frac{8}{5} R^5 - 2R^3(d-r)^2 + 8R^2(d-r)^3 + \frac{(d-r)^5}{20} \right] \quad (V-5)$$

$$P_B(r) = \frac{\pi r}{6d} \left[\frac{8}{5} R^5 - 2R^3(d-r)^2 \right] \quad (V-6)$$

e Δ é um pequeno incremento.

Esse programa computacional, dependendo do número de subunidades usadas, pode demorar de alguns minutos de CPU até várias horas.

Usamos em nosso trabalho subunidades esféricas de raio 1.0 Å e a máxima dimensão da molécula de 105 Å.

Os elementos foram construídos a partir de fatias circulares de diferentes tamanhos e compostas de unidades esféricas, empilhadas para formarem pequenos blocos oblatos ou prolatos. As fatias possuíam diâmetros variando entre 18 e 30 Å.

Os modelos eram compostos de 6 blocos que podiam rodar e transladar independentemente um do outro. A escolha por 6 blocos está relacionada à própria estrutura primária da albumina. Se observarmos o diagrama da estrutura mostrada na figura I.2 (p.8), vemos que ela pode ser dividida em 3 domínios (I, II, III), sendo cada um deles composto de 2 subdomínios (A, B).

Os modelos foram baseados nessa estrutura, por isso a escolha de 6 blocos, cada um representando um subdomínio.

Os limites desses subdomínios foram as posições das pontes de dissulfeto, e como temos subdomínios de diferentes tamanhos, também os blocos foram construídos com diferentes

quantidades de esferas.

O formato geral desses blocos foram elipsóides oblato e o modelo total possuía entre 9000 e 12000 subunidades esféricas.

V.2. MODELOS OBTIDOS

Os primeiros modelos estudados foram propostos a partir de sugestões existentes na literatura, como cilindros⁽²⁷⁾, elipsóides prolato⁽⁴⁾, prisma reto e paralelepípedo retangular^(4a).

O modelo de um prolato pode ser visto na figura V.1 junto à função distribuição de distância $P(r)$, obtida a partir dele.

Na figura V.1 temos ainda 2 prolato juntos, formando um ângulo de aproximadamente 30° entre si.

Vários outros modelos foram tentados, inclusive a partir da proposta de Carter e outros⁽⁷⁾. Alguns desses resultados e as respectivas funções $P(r)$ estão nas figuras V.2.

As funções distribuição de distância $P(r)$ de alguns desses modelos às vezes se aproximava razoavelmente bem das obtidas experimentalmente. Entretanto, isso acontecia só para um determinado pH, sendo impossível uma sequência de variações do modelo em função da mudança do pH.

Baseados em um modelo composto de 6 blocos, como já descrito anteriormente, conseguimos obter todas as mudanças estruturais, variando as posições de cada um dos blocos. Dessa maneira foi possível simular a forma da albumina nos diferentes

pH's.

Os resultados encontrados podem ser vistos nas figuras V.3, V.4, V.5, V.6 e V.7. No próximo capítulo, iremos comparar e discutir esses resultados com os obtidos experimentalmente e mostrados no capítulo IV.

Figura V.1. Modelos de um e dois elipsóides prolatos e suas respectivas funções distribuição de distância $P(r)$.

Figura V.2. Alguns modelos e suas respectivas funções distribuição de distância $P(r)$.

Modelo H_1

Modelo H_2

Figura V.3. Modelos H_1 e H_2 e suas respectivas curvas de distribuição de distância $P(r)$.

Modelo H_2

Modelo H_4

Figura V.4. Modelos H_2 e H_4 e função distribuição de distância $P(r)$

Modelo H₅

Modelo H₆

Figura V.5. Modelos H₅ e H₆ e as funções distribuição de distância $P(r)$

Modelo H₈

Modelo H₇

Figura V.6. Modelos H₇ e H₈ e as respectivas funções distribuição de distância P(r)

Figura V.7. Modelo H_p com sua função distribuição de distância $P(r)$.

O programa calcula também o raio de giração dos modelos, $R_g(\text{Mod})$, a partir da integração da equação:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^\infty P(r) r^2 dr}{2 \int_0^\infty P(r) dr} \quad (\text{V.7})$$

Os resultados obtidos para os diferentes modelos estão na tabela V.1 abaixo.

TABELA V.1

MODELO	$R_g (\text{MOD}) \text{ \AA}$
H_1	34.2
H_2	27.8
H_3	29.2
H_4	30.0
H_5	28.0
H_6	31.3
H_7	31.2
H_8	34.3
H_9	29.7

No próximo capítulo, iremos discutir e comparar estes resultados com os obtidos experimentalmente, tanto pelo método de Guinier como pelo método integral.

CAPITULO VI

DISCUSSAO DOS RESULTADOS

A primeira discussão que se faz necessária, é sobre os diferentes resultados obtidos para o raio de giração. A tabela VI.1 apresenta um quadro geral de todos os resultados. O que notamos primeiramente são os valores menores para o $R_g(\text{GUI})$ em comparação com $R_g(\text{ITP})$, isto para ambas albuminas. Esse tipo de resultado é comumente observado na literatura, e ele está ligado ao fato de o $R_g(\text{ITP})$ utilizar a curva de espalhamento total para o seu cálculo, através da equação II.40, ao contrário do $R_g(\text{GUI})$ que é calculado usando apenas a parte inicial da curva de espalhamento.

Ainda observando a tabela VI.1, notamos uma diferença nos valores do raio de giração entre as albuminas humana e bovina para o mesmo pH. O gráfico da figura VI.1 mostra essa variação do $R_g(\text{ITP})$ em função do pH, e notamos aí um comportamento diferente entre elas. No pH 3.0 elas se apresentam aproximadamente do mesmo tamanho (32,8 Å e 32,7 Å), mas ao passar para o pH 2.5, a S.A.H. aumenta o raio de giração (35,0 Å) enquanto que a S.A.B. diminui (30,2 Å). O mesmo acontece novamente no pH 7,0, apenas com uma diferença menor (33,4 Å e 30,3 Å).

Quanto ao valor encontrado no pH 3.5 para a albumina humana, infelizmente não podemos compará-lo com a bovina, pois não temos medidas de espalhamento nesse pH para ela.

Se observarmos os valores calculados do $R_g(\text{ITP})$ para S.A.H., vemos que ele começa elevado, diminui, passando por um mínimo, e depois torna a subir, indicando que houve uma contração da molécula ou então uma mudança conformacional que leva a uma alteração do raio de giração conforme mudamos o pH do solvente.

A albumina bovina também apresenta variações do raio de giração, mas de uma maneira um pouco diferente (figura VI.1).

Outro ponto a se destacar é o razoável acordo entre o $R_g(\text{ITP})$ e o $R_g(\text{Mod})$, indicando que os modelos sugeridos apresentam uma boa confiabilidade.

Figura VI.1. Gráfico da variação do raio de giração (R_g) em função do pH.

— albumina humana

---- albumina bovina

TABELA VI.1

pH	Rg(GUI) Å	Rg(ITP) Å	Rg(Mod) Å
albumina humana			
2.5	34.5	35.0	34.2
3.0	31.9	32.8	-
3.5	26.1	26.7	27.8
4.0	31.3	31.6	29.2
4.5	32.3	32.6	30.0
5.0	31.3	31.2	28.0
7.0	32.8	33.4	31.3
albumina bovina			
2.5	29.3	30.2	-
3.0	32.6	32.7	34.3
4.0	33.4	33.7	-
4.5	32.4	32.7	31.2
7.0	30.2	30.3	29.7

Tabela VI.1. A notação usada é Rg(GUI) para o raio de giração pelo método de Guinier, Rg(ITP) para o método integral, e Rg(Mod) para o raio de giração dos modelos teóricos.

Espalhamento de raio-x a baixos ângulos possibilita uma direta determinação de vários parâmetros, como raio de giração, máxima dimensão e volume. Mas quanto à forma da partícula só pode ser determinada indiretamente. A técnica mais comum é propor um modelo teórico e comparar a função distribuição de distâncias $P(r)$ ou a intensidade de espalhamento $I(h)$ deste modelo com as medidas experimentais. A comparação é mais conveniente no espaço real [$P(r)$] do que no espaço recíproco [$I(h)$], pois no espaço real observamos diretamente a máxima dimensão, distâncias entre partículas, etc.

Nas figuras VI.2, VI.3 e VI.4 é mostrada uma comparação entre os resultados teóricos e experimentais nos diferentes pH's para as albuminas humana e bovina.

A primeira observação a ser feita é sobre a presença em alguns gráficos de um pequeno pico em $r = 80 \text{ \AA}$. Essa distância já é quase a máxima dimensão da partícula e não tem ligação com a sua forma. Ele na realidade está vinculado a flutuação quase periódica mais fortes que ocorrem no final da curva de intensidade de espalhamento de algumas amostras.

O primeiro pico que aparece nas curvas experimentais (***) em $r \sim 20 \text{ \AA}$ está relacionado às distâncias entre os centros espalhadores dentro de cada um dos 8 subdomínios que a molécula de albumina apresenta. Procuramos portanto construir nossos modelos com blocos que apresentassem essa característica, daí a presença dos picos em $r \sim 20 \text{ \AA}$ também nas curvas teóricas.

Quanto ao segundo pico que aparece na região de $38 < r < 41 \text{ \AA}$ ele está associado às distâncias entre os

centros espalhadores de um subdomínio com outros subdomínios (ou blocos no modelo teórico). A variação da posição de seu máximo indica a mudança de posição dos subdomínios, ora um se aproximando do outro, ora se afastando.

Em algumas situações esses subdomínios chegam a se envolverem um no outro, como no pH 3.5 para a albumina humana, fazendo com que o modelo fique com praticamente 5 blocos. O resultado disso obviamente é uma redução no raio de giração, como podemos observar na tabela VI.1, passando de 32.8 Å para 26.7 Å e novamente voltando para 31.6 Å.

O terceiro pico que em alguns pH's aparece por volta de $r \sim 80$ Å também está relacionado com as distâncias entre os subdomínios (blocos), mas com os mais afastados, ou seja, entre os segundos vizinhos. Como a molécula apresenta um movimento de distensão e contração pronunciados, isto explica o desaparecimento ou o deslocamento, em alguns pH's, deste terceiro pico.

A possibilidade de movimentação da molécula de albumina está relacionada às posições das pontes de dissulfeto, que apesar de numerosas, permitem uma grande flexibilidade.

A causa da variação conformacional com a mudança do pH parece estar vinculada às cargas livres que aparecem nos domínios I, II e III. Quando a molécula está num meio com um pH abaixo do seu ponto isoelétrico (P.I. = 4.8), ou seja, num meio ácido ela tende a esticar-se. Variando o pH notamos que ela se apresenta mais fechada perto do seu ponto isoelétrico e novamente se abre para pH's perto de 7.0.

Figura VI.2. Gráfico da função distribuição de distância $P(r)$ dos modelos teóricos (—) e experimentais (****) nos pH's 2.5, 3.5, 4.0, para a albumina humana.

Figura VI.3. Gráficos da função $P(r)$ nos pH's 4.5, 5.0, 7.0 para a albumina humana, dos modelos teóricos (—) e experimentais (****).

Figura VI.4. Gráfico da função distribuição de distância $P(r)$ das albuminas bovina nos pH's 3.0, 4.5 e 7.0. Modelo Teórico (—) e experimental (****).

também foi observada por outras técnicas, como mostramos no capítulo I.2.4.

Em uma análise mais detalhada dos gráficos de $P(r) \times r$, vemos que não está havendo uma perfeita sobreposição das curvas teóricas com as experimentais. Isto entretanto se deve à não perfeição do modelo proposto, que apresenta uma certa descontinuidade entre um bloco e outro, que apesar de razoavelmente arredondado nas bordas, está ainda distante da forma de uma molécula verdadeira.

Uma comparação dos modelos teóricos e experimentais em termos da intensidade de espalhamento $I(h)$, apesar de mais difícil de analisar, também foi feita e pode ser vista nas figuras VI.5, VI.6 e VI.7.

Por maior conveniência, graficamos $\log I(h) \times \log h$, pois as comparações nesses gráficos dependem somente da forma da macromolécula e são independentes do seu tamanho.

Notamos nessas figuras também um razoável acordo na maioria dos pH's entre o modelo proposto e o experimentado. As diferenças observadas podem ser devidas à presença de subestruturas bem definidas dentro da macromolécula.

De uma maneira geral, nossos resultados para o raio de giração estão de acordo com os obtidos por outros autores^(27,28,29,30), conforme mostra a tabela I.2 (p. 13). Quanto à forma das macromoléculas, aqueles autores propuseram sempre modelos mais simples, como elipsóides ou prismas, mas apenas para um determinado pH, não explicando dessa maneira as variações que ocorriam no raio de giração com a mudança do pH.

Por outro lado, nossos resultados diferem bastante

dos obtidos por Squire ⁽²⁶⁾ sobre as dimensões (140 Å x 40 Å) e também quanto ao formato da molécula de albumina em solução (elipsóide prolato).

Observamos que nossos resultados com diferentes modelos para diferentes pH's confirmam a grande plasticidade conformacional da albumina, responsável por sua capacidade de se ligar a muitas outras moléculas.

Se por um lado as mudanças de pH produzem uma variação conformacional na molécula, esta variação também pode ser induzida pela presença de ligantes. Essas mudanças têm sido observadas por diversas técnicas, tais como Dispersão Rotatória Óptica ^(56,57), Espectroscopia Fluorescente ⁽⁵⁸⁾, Espectroscopia de Ultravioleta ^(58,59).

A albumina possui diversos sítios de ligação ⁽⁴⁵⁾ e sua localização ao longo da cadeia de aminoácido pode ser observada na figura VI.8. Essas posições também podem ser vistas em um dos nossos modelos propostos, também na figura VI.8.

As posições 1-AG, 2-AG, 3-AG e 4-AG são sítios de ligação de ácidos graxos, e suas localizações estão nas interfaces entre os subdomínios, que é a região de maior flexibilidade de molécula. Entre os domínios II e III, existe um bolso hidrofóbico ⁽⁶⁰⁾ e a ligação com ácidos graxos nesse local (sítio 2-AG) estabilizaria a albumina numa forma mais compacta. Essa forma poderia ser a do modelo H₂(pH 4.0) ou H₄(pH 4.5).

Outro sítio importante é o da bilirubina (B), que está localizado no subdomínio II-A. Devido à sua posição ser muito profunda na molécula de albumina, a ligação com a bilirubina deve levar a uma abertura (alongamento) da molécula, ou seja, é

possível que a albumina esteja com uma forma como a do modelo H_6 (pH 7.0).

Quanto às posições D_1 e D_2 , indicadas na figura VI.8, se referem a sítios de ligações com vários tipos de drogas ou outras moléculas. A sua localização é bem interna, como a da bilirubina, portanto, a albumina, ao usar esse sítio de ligação, deve ter uma forma diferente do que ao utilizar o sítio 1-AG.

Em resumo, vemos que a quantidade de sítios de ligação e suas localizações mostram a necessidade da molécula de albumina assumir diferentes conformações de acordo com o ligante a ela ligado. Isso vem confirmar a variedade de formas encontradas em nosso trabalho.

Finalmente, é importante salientar o acordo entre o modelo proposto por Carter^(6,7) em seu trabalho de determinação da estrutura tridimensional e os resultados por nós apresentado para a albumina em solução e em diferentes pH's, em particular os modelos H_6 (pH 7.0) para a albumina humana e H_7 (pH 4.5) para a albumina bovina.

Figura VI.5. Comparação das curvas de espalhamento experimental (****) com as obtidas dos modelos teóricos (—), nos pH's 2.5, 3.5, 4.0 para a albumina humana.

Figura VI.6. Comparação das curvas de espalhamento experimental (****) com as teóricas (—) nos pH's 4.5, 5.0 e 7.0 para a albumina humana.

Figura VI.7. Comparação das curvas de espalhamento experimental (****) com as obtidas dos modelos teóricos (—) para a albumina bovina nos pH's 3.0, 4.5, 7.0.

Figura VI.8. Localização dos sítios de ligação na albumina humana. AG-ácido graxo, B-bilirubina, D-droga (4).

CAPITULO VII

CONCLUSOES E SUGESTOES

VII.1. CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido mostrou mais uma vez que o espalhamento de raios-x a baixo ângulo é uma técnica apropriada para estudos estruturais de macromoléculas em solução, em particular para a obtenção de parâmetros geométricos como raio de giração, máxima dimensão e também no estudo das variações conformacionais.

Os resultados encontrados mostraram que tanto a albumina humana com a bovina apresentam uma grande variação na sua forma com a mudança do pH, confirmando outros resultados presente na literatura e obtidos por técnica diversas.

Os modelos teóricos propostos para os diferentes pH's apresentaram resultados que concordam com os encontrados experimentalmente, mostrando inclusive claramente a redução no tamanho e o empacotamento dos subdomínios no pH 3.5 para a albumina humana.

Por outro lado, observamos que apesar da grande homologia entre a albumina humana e a bovina, elas apresentam pequenas diferenças tanto no cálculo do raio de giração, como na forma nos diferentes pH's. A conformação apresentada pela albumina humana num determinado pH nem sempre é exatamente a mesma para a bovina, mas de qualquer maneira isto não altera o fato de ambas irem modificando a sua conformação com a variação do pH.

Dados da literatura mostram que variações conformacionais podem ocorrer mesmo em pH constante, como nos organismos vivos, mas que são induzidas nestes casos pela presença de diferentes ligantes, confirmando também a existência de várias

formas para a albumina como a encontrada em nosso trabalho.

Toda essa diversidade de formas apresentadas pela albumina, confirma a sua extraordinária maleabilidade e flexibilidade, razão pela qual possuem grande utilidade no sistema biológico em diferentes funções, seja como armazenadora e transportadora de inúmeras substâncias, ou atuando no controle da pressão osmótica do sangue.

VII.2. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Seria interessante em continuidade ao trabalho aqui desenvolvido, as seguintes propostas:

- a) Estudar as variações conformacionais das albuminas em pH's maiores que 7.0. Isto permitiria ter um quadro completo das mudanças de forma que poderiam ocorrer quando se altera o pH.
- b) Estudar o comportamento das albuminas em determinados pH's mas variando-se a temperatura.
- c) Estudar as variações conformacionais das albuminas na presença de ligantes, tais como ácidos graxos, Bilirubina, drogas, etc.
- d) Purificar e estudar pela técnica de SAXS alguns fragmentos da albumina, como o P9, PA, PB, etc. Alguns desses fragmentos são comuns em várias outras moléculas, daí o seu interesse.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Schenkman, S.; Araujo, P.S.; Dijkamn, R.; Quina, F.H.; Chaimovich, H. *Biochim. Biophys. Acta* **649**, 633-641 (1981)
- [2] Garcia, L.A.M.; Schenkan, S.; Araujo, P.S.; Chaimovich, H.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **16** : 89-96 (1983)
- [3] Garcia, L.A.M.; Araujo, P.S.; Chaimovich, H. *Biochim. Bioph. Acta*, **772**, 231-234 (1984)
- [4] Peters, Theodore Jr. *Adv. Protein Chem.*, **37**, 161, Academic Press (1985)
- [5] Ulrich Kragh-Hansen. *Pharmacological Reviews*, **33**, 17-52 (1981)
- [6] Carter, D.C.; Xiao-Min He; Munsons, H.; Twigg, R.D.; Gernert, K.M.; Broom, M.B.; Miller, T.K. *Science*, **244**, 1195-1198 (1989)
- [7] Carter, D.C.; Xiao-Min He; Munsons, H.; Twigg, R.D.; Gernert, K.M.; Broom, M.B.; Miller, T.K., *Science*, **249**, 302-303 (1990)
- [8] Guinier, A. and Fournet, G. *Small-Angle Scattering of X-rays*. J. Wiley & Sons. New York (1955)
- [9] Glatter, O.; Kratky, O. *Small Angle X-Ray Scattering* Academic Press, London (1982)
- [10] Krakty, O.; Laggner, P.; *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, **14**, 693-792, Academic Press. Ind. (1987)
- [11] Alexander, L.E. *X-ray diffraction Methods in Polymer Science*, Willey, New York (1969)
- [12] Boyer, P.D. Ballou, G.A. and Luck, J.M. *J. Biol. Chem.*, **162**, 199-208 (1946)

- [13] Brandt, J.; Andersson, L.O. *J. Pept. Protein Res.* 8, 83-37 (1976)
- [14] Wallevik, K. *J. Biol. Chem.*, 248, 8, 2650-2655 (1973)
- [15] Day, J.F.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W. *J. Biol. Chem.* 254, 595-597 (1979)
- [16] Dolhofer, R.; Wieland, O.H.; *FEBS Lett.* 103, 282-286 (1979)
- [17] Ryan, M.T. *Biochemistry* 17, 2221-2230 (1973)
- [18] Tabachnick, M. *J. Biol. Chem.* 239; 1242-1249 (1964)
- [19] Odell, G.B. et al *J. Lab. Clin. Med.* 89; 295-307 (1977)
- [20] Leatherbarrow, R.J.; Dean, P.D.G. *Biochem. J.* 189; 27-34 (1980)
- [21] Behrens, P.Q.; Spiekerman, A.M.; Brown, J.R. *Fed. Proc.*, 34, 591 (1975)
- [22] Meloun, B.; Moravek, L.; Kostra, V. *FEBS Lett.*, 58, 134-137 (1975)
- [23] Sogami, M.; Foster, J.F.; *Biochem.*, 7 : 2171-2182 (1968)
- [24] Reed, R.G.; Feldhoff, R.C.; Clute, O.L.; Peters, T. Jr. *Biochemistry*, 14 : 4578-4583 (1975)
- [25] Mac Clure, R.J.; Craven, B.M. *J. Mol. Biol.*, 83, 551 (1974)
- [26] Squire, P.G.; Moer, P. and O'Konski, C.T. *Biochemistry*, 7, 12, 4261-4272 (1968)
- [27] Laggner, P.; Kratky, O.; Palm, W.H.; Holasek, A.; *Mh. Chem.*, 102, 1729 (1971)
- [28] Anderegg, J. W.; Beeman, W.W. Shulman, S. and Kaesberg, P. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 2927 (1955)
- [29] Champagne, M.; Luzzati, V.; Nicolaieff, A. *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 1002 (1958)

- [30] Luzzati, V.; Witz, J.; Nicolaieff, A. *J. Mol. Biol.*, 3, 379, (1961)
- [31] Klug, H.L. & Alexander, L.E. *X-Ray Diffraction Procedures*. John Wiley and Sons (1954)
- [32] Bolduan, O.E.A. and Bear, R.S.. *J. Appl. Phys.* 20, 283 (1949)
- [33] Ritland, H.N.; Kaesberg, P. and Beeman, W.W.. *J. Appl. Phys.* 21, 838 (1950)
- [34] Porod, G. *Kolloid-Z.* 124, 83-114 (1951)
- [35] Luzzati, V. *Acta Cryst.* 13, 939-945 (1960)
- [36] Glatter, O.. *J. Appl. Cryst.* 10, 415-421 (1977)
- [37] Müller, K., Glatter, O.. *Makromol. Chem.* 183, 465-479 (1982)
- [38] Glatter, O.. *Acta Phys. Austriaca*, 47, 83-102 (1977)
- [39] Glatter, O.. *J. Appl. Cryst.* 10, 415-421 (1977)
- [40] Glatter, O.. *J. Appl. Cryst.* 13, 7-11 (1980)
- [41] Glatter, O.. *J. Appl. Cryst.* 13, 577-584 (1980)
- [42] Fedorov, B.A.; Ptitsyn, O.B.; Voronin, L.A.. *FEBS Lett.* 28, 188-190 (1972)
- [43] Ninio, J.; Luzzati, V.; *J. Mol. Biol.* 71, 217-229 (1972)
- [44] Fedorov, B.A.; Densyuk, A.I.. *J. Appl. Cryst.* 11, 473-477 (1978)
- [45] Glatter, O.; *Acta Phys. Aust.* 52, 243-256 (1980)
- [46] Anderegg, J.W.; Geil, P.H.; Beeman, W.W.; Kaesberg, P.; *Biophys. J.* 1, 657 (1961)
- [47] Boyer, P.D.; Ballou, G.A. and Luck, J.M. *J. Biol. Chem.* 162, 199-208 (1946)
- [48] Brandt, J.; Andersson, L.O. *Int. J. Dept. Protein Res.* 8, 33-37 (1976)

- [49] Gumpen, S.; Hegg, P.D. and Martens, H. *Biochim. Biophys. Acta* 574, 189-196 (1979)
- [50] Markus, G.; Love, R.L. and Wissler, F.C. *J. Biol. Chem.* 239, 3687-3693 (1964)
- [51] Guber, A.; *Sitzungsber. Phys. Med. Ges. Wurzburg*, 143 (1894)
- [52] Craievich, A.F. *Curso de espalhamento de raios-x a baixo-ângulo*. IFQSC-USP (1980)
- [53] Klug, H.P. and Alexander, L.E. *X-Ray Diffraction Procedures*, John Wiley & Sons, New York (1954)
- [54] Glatter, O. *Manual de uso dos programas I.TP e MULTIBODY*, Austria (1983)
- [55] Abrego, J.R.B. *Tese de doutorado*, IFQSC-USP (1987)
- [56] Reynolds, J.; Herbert, S.; Polet, H.; Steinhardt, J. *Biochemistry* 6, 937-947 (1967)
- [57] Makino, S.; Reynolds, J.A.; Tanford, C. *J. Biol. Chem.* 248, 4926-4932 (1973)
- [58] Steinhardt, J.; Krijn, J.; Leidy, J.G. *Biochemistry* 10, 1809-1817 (1972)
- [59] Polet, H.; Steinhardt, J. *Biochemistry* 7, 1348-1356 (1968)
- [60] Brow, J.R.; Shockley, P. *Lipid-protein interactions*, 1, 25-68, Wiley, N. York (1982)