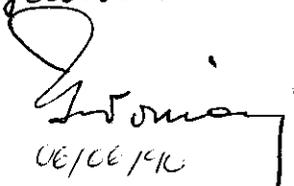


Este exemplar corresponde a redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna Christina Franco de Souza e aprovada pela Comissão Julgadora.


06/06/90

**ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXO ÂNGULO
ESTUDO DE HEMOGLOBINAS EXTRACELULARES EM SOLUÇÃO**

Christina Franco de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Iris C. L. Torriani

Tese apresentada ao Instituto de Física "Gleb Wataghin" da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Física.

Maio de 1990.

*À família e aos amigos
Há momentos em que os dois se
confundem e se transformam em um.*

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Iris Torriani, pela orientação desta tese, pelo apoio profissional e pessoal e pelo incentivo durante estes anos de convivência.

A Profa. Dra. Nilce Meirelles e Carlos Bonafé, pelas amostras e colaboração.

Ao Prof. Dr. Otto Glatter, pelos programas utilizados.

Ao Dr. Patrice Vachette, pelas medidas feitas no síncrotron do LURE, Orsay, França.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A Telebrás, pelo incentivo à conclusão do trabalho e apoio financeiro.

A Ana Carolina, D. Vilma, Rangel, Luis Antônio, Silvano, Júlia, Carlos, José Alfredo e Adilson, pelo apoio técnico e convivência.

Aos colegas do laboratório, pela convivência.

Aos funcionários da biblioteca, do Centro de Computação e das secretarias, pela ajuda indispensável.

A meus amigos que tornaram tudo possível.

RESUMO

A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo tem sido bastante utilizada nos últimos anos no estudo de proteínas em solução. Curvas de espalhamento de alta resolução, além de fornecerem parâmetros dimensionais, possibilitam a obtenção de informações sobre a estrutura quaternária de macromoléculas através de simulações com modelos.

Neste trabalho, estudamos a eritrocruorina do anelídeo *Glossoscolex paulistus* (massa molecular de $3,23 \times 10^6$). Curvas de espalhamento a baixo ângulo de várias concentrações da proteína em solução foram obtidas com um gerador convencional de raios X. A partir destes dados foi possível determinar os valores de raio de giro e dimensão máxima na molécula por gráficos de Guinier e transformada indireta de Fourier.

Obtivemos, também, curvas de alta resolução no síncrotron do LURE, Orsay, França. As intensidades espalhadas, por apresentarem uma série de máximos nos ângulos maiores, pareceram apropriadas ao cálculo de modelos. Para tal usamos um programa de computador desenvolvido por O. Glatter [7].

O modelo inicial, composto de 186 esferas idênticas, foi estruturado com base em informações disponíveis de microscopia eletrônica. Modificações sistemáticas deste modelo levaram a uma estrutura final que consiste de 12 subunidades principais arranjadas em duas camadas hexagonais sobrepostas formando um cilindro com uma subunidade adicional no centro. Durante o processo de ajuste do modelo, diferentes pesos foram atribuídos às esferas que compunham as subunidades principais. O modelo final simula bem as curvas experimentais e contém informação sobre as regiões de maior densidade eletrônica na molécula, sugerindo uma possível localização dos grupos heme.

ABSTRACT

Small angle X-ray scattering is a technique that has been widely used during the last decade for the study of proteins in solution. High resolution scattering curves, can not only provide information on the dimensional parameters of the molecules, but also lead to a description of the quaternary structure of the protein by fitting the experimental intensity curves and distance distribution functions with those calculated for a model molecule.

This work reports studies of erythrocyruorin from the annelid species *Glossoscolex paulistus* (molecular weight 3.23×10^6). Small angle scattering curves from various concentrations of this protein in solution were obtained with a conventional X-ray generator. The radius of gyration and maximum dimension of the molecule were obtained from Guinier plots and inverse Fourier transform.

High resolution intensity curves were obtained at the synchrotron source at LURE, Orsay, France. These curves presented a number of maxima at higher angles and seemed adequate for model calculations. These were performed using the computer program developed by O. Glatter [7].

The initial model, formed by 186 identical spheres, was built using the information available from electron microscopy. Systematic modifications of this model lead us to a final structure consisting of 12 principal subunits, arranged in two superposed hexagonal layers forming a hexagonal cylinder, with an additional subunit in its center. During the fitting procedure, different weights were assigned to the spheres composing the structure. The final model reproduces the experimental scattering curves and contains information on the more electron-dense regions in the molecule, thus suggesting the the possible site of the heme groups.

INDICE

Introdução.....	01
I - Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo.....	04
I.1 - Espalhamento por uma Partícula.....	04
I.2 - Aproximação de Guinier.....	08
I.3 - Função Distribuição de Distâncias.....	09
I.3.1 - Função de Espalhamento e Função Distribuição de Distâncias.....	13
I.3.2 - Função Distribuição de Distâncias $p(r)$	15
I.3.3 - Interpretação da Função Distribuição de Distâncias.....	17
I.4 - Curva de Espalhamento Experimental: I_{exp}	35
I.5 - Método da Transformada Indireta de Fourier.....	40
I.6 - Função de Espalhamento, Função Distribuição de Distâncias e Modelos.....	53
I.6.1 - Método da Esfera.....	54
II - Hemoglobinas Extracelulares.....	57
III - Experimental.....	66
III.1 - Obtenção de Dados no Gerador Convencional de Raios X.....	66
III.1.1 - Amostras.....	66
III.1.2 - Montagem Experimental.....	66
III.1.3 - Condições de Medida.....	67
III.2 - Obtenção de Dados com Radiação Síncrotron.....	69
III.2.1 - Amostras.....	69
III.2.2 - Montagem Experimental.....	69
III.2.3 - Condições de Medida.....	71
IV - Resultados e Análise.....	72

IV.1 - Resultados Obtidos com Gerador Convencional.....	72
IV.2 - Resultados Obtidos com Radiação Síncrotron.....	80
IV.3 - Modelo para Estrutura de Subunidades da Hemoglobina Extracelular de <i>G. paulistus</i> ...	87
IV.3.1 - Resultados Obtidos nos Cálculos dos Modelos.....	88
V - Conclusões.....	132
Bibliografia.....	136

INTRODUÇÃO

Os anelídeos possuem hemoglobinas extracelulares que se caracterizam pela sua grande massa molecular (em torno de $3,5 \times 10^6$ Da) e, principalmente, por sua arquitetura. Estas moléculas, quando vistas com microscópio eletrônico, se apresentam sempre na forma de dois hexágonos sobrepostos. No entanto, apesar desta aparente similaridade estrutural, quando estudadas mais profundamente, mostram uma grande diversidade funcional que se justifica pelos diferentes *habitats* em que são encontrados os invertebrados. Para o entendimento dos processos envolvidos na sua sobrevivência, é, portanto, fundamental tentar estabelecer relações estrutura-função na molécula. Existem teorias que vinculam as estruturas de hemoglobinas extracelulares à evolução de organismos anaeróbicos para aeróbicos, apontando as hemoglobinas como as primeiras proteínas a serem sintetizadas pela natureza.

Através da microscopia eletrônica, sabemos que estas proteínas são formadas por 12 subunidades principais que compõem os dois hexágonos sobrepostos. Não é possível saber, no entanto, como são compostas estas unidades. Normalmente, são propostos modelos baseados nas massas moleculares da proteína e de seus produtos de dissociação (obtidos por mudanças de pH e temperatura, por exemplo) junto com a informação sobre a quantidade e tipos de cadeias polipeptídicas presentes. Basicamente, tenta-se compor a molécula de modo que a soma das massas moleculares das partes seja igual à determinada para o todo, sem considerar sua distribuição espacial. Um dos caminhos para obter a estrutura quaternária da hemoproteína seria a sua cristalização e estudo por difração de raios X, dois passos bastante difíceis devido ao tamanho e à complexidade da proteína. Até agora só foram obtidos cristais da hemoglobina extracelular de

Lumbricus terrestris (dimensões da cela unitária: $a=502,1\text{\AA}$, $b=297,8\text{\AA}$ e $c=350,1\text{\AA}$) por Royer e Hendrickson [1,27,28,29,30]. A estrutura, no entretanto, ainda não foi resolvida.

O outro caminho é o estudo da molécula em solução (portanto, em condições mais próximas à forma nativa) por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS). Com base nos dados obtidos por esta técnica, podemos propor modelos para a estrutura quaternária da proteína, ou seja, a distribuição no espaço das subunidades que a compõem. Neste ponto, portanto, podemos perceber a importância do estudo de macromoléculas por SAXS no estabelecimento das relações estrutura-função já que podemos controlar determinados parâmetros das soluções como pH, temperatura, presença de cátions divalentes, etc., e acompanhar possíveis modificações nos modelos propostos.

Neste trabalho, estudamos a hemoglobina extracelular do anelídeo *Glossoscolex paulistus*, da região de Rio Claro, SP, através de espalhamento de raios X a baixo ângulo, com o objetivo de propor um modelo para a sua estrutura de subunidades. É uma proteína que já estava sendo estudada no Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP por outros métodos. Havia, além disso, o desafio de trabalhar com uma molécula tão grande que levaria a técnica de SAXS aos limites da sua aplicação experimental com fontes de radiação convencional. Para completar o estudo tivemos a oportunidade de fazer medidas usando duas fontes de raios X: um gerador de ânodo rotatório e radiação síncrotron.

A teoria de espalhamento e suas interpretações podem ser vistas no capítulo 1. A definição de hemoglobinas, sua classificação e características principais se encontram no capítulo 2. Também neste capítulo, temos mais informações sobre a hemoglobina de *G. paulistus*. No capítulo 3, descrevemos a parte experimental envolvida no trabalho. Os resultados obtidos e sua

análise estão no capítulo 4, junto com a descrição do modelo final determinado para a hemeproteína do anelídeo estudado. Finalmente, no capítulo 5, podem ser lidas as conclusões deste trabalho e as propostas para sua continuação.

I. ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXO ÂNGULO

I.1 - ESPALHAMENTO POR UMA PARTÍCULA

Um feixe de raios X, ao atingir uma partícula, faz com que cada um de seus elétrons se torne uma fonte de onda espalhada. A amplitude da radiação espalhada por um elétron num ponto k , com fator de espalhamento f_k , na direção do vetor unitário \vec{s} (ver Fig.I.1), é

$$A_k = A_e f_k e^{-i \frac{2\pi}{\lambda} (\vec{s} - \vec{s}_0) \cdot \vec{r}_k} = A_k e^{-i \vec{h} \cdot \vec{r}_k} \quad (1)$$

onde: A = amplitude espalhada por um elétron livre;

\vec{s}_0 = vetor unitário na direção da radiação incidente;

\vec{s} = vetor unitário na direção do feixe espalhado;

$\vec{h} = \text{vetor } \frac{2\pi}{\lambda} (\vec{s} - \vec{s}_0)$, com módulo $h = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$;

λ = comprimento de onda da radiação incidente;

2θ = ângulo de espalhamento ou de observação.

Se a direção de espalhamento for a mesma que a do feixe incidente ($2\theta = 0^\circ$ na Fig.I.1), os raios espalhados estarão todos em fase. À medida que o ângulo de espalhamento vai aumentando, cresce a diferença na fase entre as várias ondas espalhadas. Portanto, temos uma amplitude de onda resultante para a partícula, que varia com o ângulo de observação por causa de interferências destrutivas, cuja expressão é

$$A(\vec{h}) = \sum_k A_k = A_e(\vec{h}) \sum_k f_k e^{-i \vec{h} \cdot \vec{r}_k} \quad (2)$$

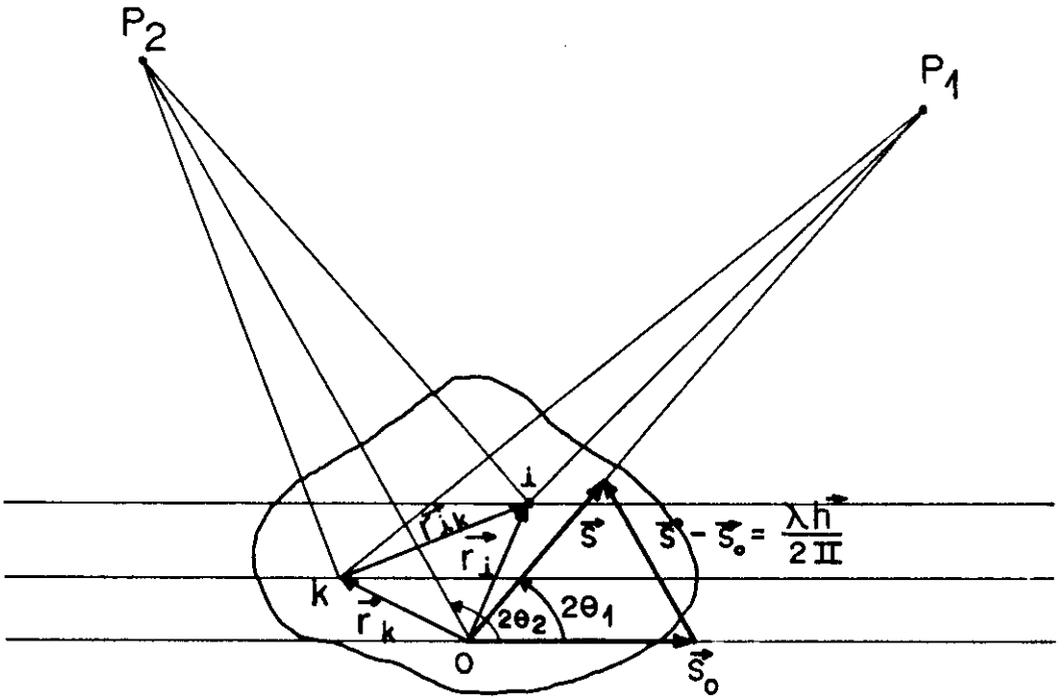


Figura I.1

Como a intensidade espalhada, $I(\vec{h})$, é igual ao produto da amplitude por sua conjugada AA^* , sua expressão fica

$$I(\vec{h}) = I_e(\vec{h}) \sum_k \sum_i f_k f_i \cos(\vec{h} \cdot \vec{r}_{ik}) \quad (3)$$

onde $I_e(\vec{h})$ = intensidade espalhada por um elétron.

Em amostras normalmente usadas em experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo, temos partículas para as quais todas as orientações são igualmente prováveis. Portanto, no cálculo da intensidade, determinamos a média da função $\cos(\vec{h} \cdot \vec{r}_{ik})$ quando o vetor \vec{r}_{ik} , com módulo r_{ik} , assume todas as orientações com igual probabilidade. O cálculo mostra [2] que esta média é dada por

$$\overline{\cos(\vec{h} \cdot \vec{r}_{ik})} = \frac{\text{sen } hr_{ik}}{hr_{ik}} \quad (4)$$

Chegamos, portanto, à expressão obtida por Debye em 1915,

$$I(h) = \sum_{k=1}^N \sum_{i=1}^N f_k f_i \frac{\text{sen } hr_{ik}}{hr_{ik}} \quad (5)$$

onde cada par de elementos espalhadores i e k , separados de uma distância r_{ik} dentro da partícula, contribui para uma intensidade de espalhamento que depende somente do ângulo de observação.

Convém lembrar, por fim, que a intensidade observada é a média das intensidades espalhadas por um grande número de partículas. Supondo partículas idênticas, desorientadas e bastantes afastadas umas das outras, as intensidades individuais simplesmente somar-se-ão. Na Fig. I.2, podemos ver uma curva típica

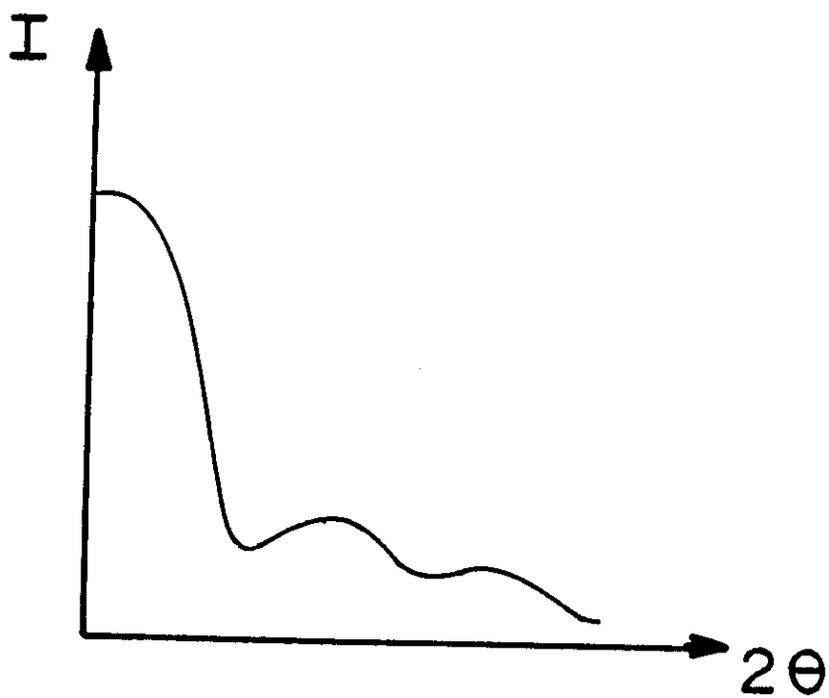


Figura I.2

da intensidade $I(h)$ em função do ângulo 2θ obtida para uma solução de proteínas [3].

I.2-APROXIMAÇÃO DE GUINIER

Podemos expandir a função seno da expressão de Debye (eq.(5)) em uma série de potências:

$$\begin{aligned}
 I(h) &= \sum_{k=1}^N \sum_{i=1}^N f_k f_i \frac{\text{sen } hr_{ik}}{hr_{ik}} = \\
 &= \sum_{k=1}^N \sum_{i=1}^N f_k f_i \frac{1}{hr_{ik}} \left(hr_{ik} - \frac{1}{6} h^3 r_{ik}^3 + \frac{1}{5!} h^5 r_{ik}^5 - \dots \right) = \\
 &= \sum_k \sum_i f_k f_i - \frac{h^2}{6} \sum_k \sum_i f_k f_i r_{ik}^2 + \frac{h^4}{5!} \sum_k \sum_i f_k f_i r_{ik}^4 - \dots \quad (6)
 \end{aligned}$$

O primeiro termo da expansão é igual a $(\sum_k f_k)^2$, isto é, a $I(0)$ [2,4].

Se considerarmos a origem como o centro de massa eletrônico da partícula, vamos ter $\sum_k f_k r_k = 0$. Lembrando que $\vec{r}_{ik} = \vec{r}_k - \vec{r}_i$ e $r_{ik}^2 = r_i^2 + r_k^2 - 2r_i r_k \cos \alpha_{ik}$, onde \vec{r}_k e \vec{r}_i são os vetores que ligam os pontos k e i à origem e α_{ik} é o ângulo entre eles, o segundo termo da expansão pode ser escrito como

$$\begin{aligned}
 - \frac{h^2}{6} \sum_k \sum_i f_k f_i r_{ik}^2 &= - \frac{h^2}{6} \sum_k \sum_i f_k f_i (r_i^2 + r_k^2 - 2r_i r_k \cos \alpha_{ik}) = \\
 &= - \frac{h^2}{6} \sum_k f_k \sum_i f_i r_i^2 - \frac{h^2}{6} \sum_k f_k r_k^2 \sum_i f_i + \frac{h^2}{3} \sum_k f_k r_k \sum_i f_i r_i \cos \alpha_{ik}.
 \end{aligned}$$

O termo em cosseno se anula, pois a soma em i é a projeção de

$\sum_i f_i r_i$ em r_k . Se definimos um parâmetro R_a por [2,4]

$$R_a^2 = \frac{\sum_k f_k r_k^2}{\sum_k f_k} . \quad (7)$$

o segundo termo fica

$$- \frac{h^2}{3} \left(\sum_k f_k \right)^2 R_a^2 . \quad (8)$$

Tratando o terceiro termo de modo análogo e definindo um parâmetro R_N como

$$R_N^4 = \frac{\sum_k f_k r_k^4}{\sum_k f_k} . \quad (9)$$

obtemos

$$\frac{h^4}{5!} \sum_k \sum_l f_k f_l r_{lk}^4 = \frac{h^4}{5!} \left(\sum_k f_k \right)^2 (2R_N^4 + 6R_a^4) . \quad (10)$$

A expansão, escrita em função dos parâmetros R_a e R_N , fica

$$I(h) = I(0) \left(1 - \frac{h^2}{3} R_a^2 + \frac{h^4}{60} \left(R_N^4 + 3R_a^4 \right) - \dots \right) . \quad (11)$$

Nos ângulos menores, a expressão (11) pode ser aproximada, considerando apenas os dois primeiros termos, para

$$I(h) = I(0) e^{-h^2 R_a^2 / 3} \quad (12)$$

onde $I(0)$ é a intensidade no ângulo zero. A relação (12) é conhecida como aproximação ou lei de Guinier e R_g é um parâmetro geométrico característico da partícula que independe de qualquer suposição a respeito de sua forma. Este parâmetro, chamado de raio de giro, é, por definição, a raiz quadrada da média dos quadrados das distâncias de cada elétron da partícula a seu centro de massa eletrônico (eq. (7)).

O gráfico de Guinier, $\ln I(h)$ vs h^2 , é uma reta

$$\ln I(h) = \ln I(0) - \frac{R_g^2}{3} h^2 \quad (13)$$

com inclinação $\alpha = -\frac{R_g^2}{3}$, que permite determinar o raio de giro

$$R_g = \sqrt{-3\alpha}. \quad (14)$$

Qualquer que seja a forma da partícula, a inclinação da curva de $\ln I(h)$ vs h^2 na origem é sempre igual a $1/3$ de R_g^2 . A precisão com que o raio de giro pode ser determinado, no entanto, depende, até certo ponto, da forma das partículas. A determinação deste parâmetro com o mesmo grau de precisão, para uma série de partículas tendo o mesmo R_g , requer informação sobre o espalhamento em ângulos tanto menores quanto mais a partícula se afastar de uma forma com maior simetria.

As partículas que melhor obedecem a lei aproximada de Guinier são as praticamente isodiamétricas (quase esféricas). Elipsóides muito alongados, discos finos e cilindros estreitos tem curvas que apresentam diferenças em relação à aproximação (12) e precisam ser considerados de modo especial conforme veremos a seguir.

A função de espalhamento para partículas alongadas

que tenham o comprimento muito maior que o diâmetro da seção transversal ($L \gg d$), de acordo com a ref.[2], é dada pela expressão

$$I(h) = L \frac{\pi}{h} I_c(h) \quad (15)$$

onde $I_c(h)$ é a intensidade relacionada à seção transversal. O fator $1/h$ é característico de partículas com forma cilíndrica.

A intensidade $I_c(h)$ pode ser aproximada por

$$I_c(h) = I_c(0) e^{-h^2 R_c^2 / 2}, \quad (16)$$

onde R_c é o raio de giro da seção transversal.

Se traçarmos um gráfico de $\ln(Ih)$ vs h^2 , onde

$$I(h) = \frac{L\pi}{h} I_c(0) e^{-h^2 R_c^2 / 2} \quad (17)$$

é a intensidade espalhada pela partícula, teremos uma reta

$$\ln(Ih) = \ln[L\pi I_c(0)] - \frac{R_c^2}{2} h^2 \quad (18)$$

com inclinação $\alpha = -\frac{R_c^2}{2}$. Assim, temos o raio de giro da seção transversal

$$R_c = \sqrt{-2\alpha}. \quad (19)$$

A intensidade de espalhamento para partículas planas ou lamelares com espessura finita e muito pequena em

relação às outras duas dimensões é

$$I(h) = \frac{2\pi A}{h^2} I_1(h), \quad (20)$$

onde A é a área do plano e $I_1(h)$, a intensidade relacionada à espessura. A aproximação para $I_1(h)$ é dada por

$$I_1(h) = I_1(0) e^{-h^2 R_l^2}. \quad (21)$$

O cálculo do raio de giro da espessura, R_l , é análogo ao de R_c . Traçamos o gráfico $\ln(Ih^2)$ vs h^2 usando o espalhamento da partícula expresso por

$$I(h) = \frac{2\pi A}{h^2} I_1(0) e^{-h^2 R_l^2} \quad (22)$$

e obtemos uma reta

$$\ln(Ih^2) = \ln[2\pi A I_1(0)] - R_l^2 h^2 \quad (23)$$

com inclinação $\alpha = -R_l^2$. Portanto,

$$R_l = \sqrt{-\alpha}. \quad (24)$$

Em resumo, podemos determinar o R_g de qualquer tipo de partícula, mas a precisão vai depender da forma. Para partículas alongadas em uma ou duas direções, é possível obter, ainda, parâmetros relacionados a suas dimensões menores: raios de giro da seção transversal e da espessura, respectivamente.

I.3- FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTANCIAS

I.3.1- FUNÇÃO DE ESPALHAMENTO E FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTANCIAS

Até agora, vimos como podemos observar a partícula indiretamente através da curva de espalhamento obtida no espaço recíproco.

A estrutura completa da partícula, teóricamente, é descrita pela distribuição de densidade eletrônica, tridimensional, $\rho(\vec{r})$. No entanto, temos um grande número de partículas contribuindo para o espalhamento que resulta ser uma média espacial. Em consequência, perdemos informação e a partícula passa a ser representada pela função distribuição de distâncias, $p(r)$, que é unidimensional.

A cada função de espalhamento, no espaço recíproco, corresponde uma função distribuição de distâncias no espaço real. As duas funções estão interrelacionadas por uma transformada de Fourier (T_1 na Fig.I.3) do tipo

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\text{sen } hr}{hr} dr \quad (25)$$

e sua transformada inversa

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} I(h) h r \text{ sen } hr \, dh . \quad (26)$$

Ou seja, a transformada de Fourier define como a informação no espaço real, $p(r)$, é transformada no espaço recíproco, $I(h)$.

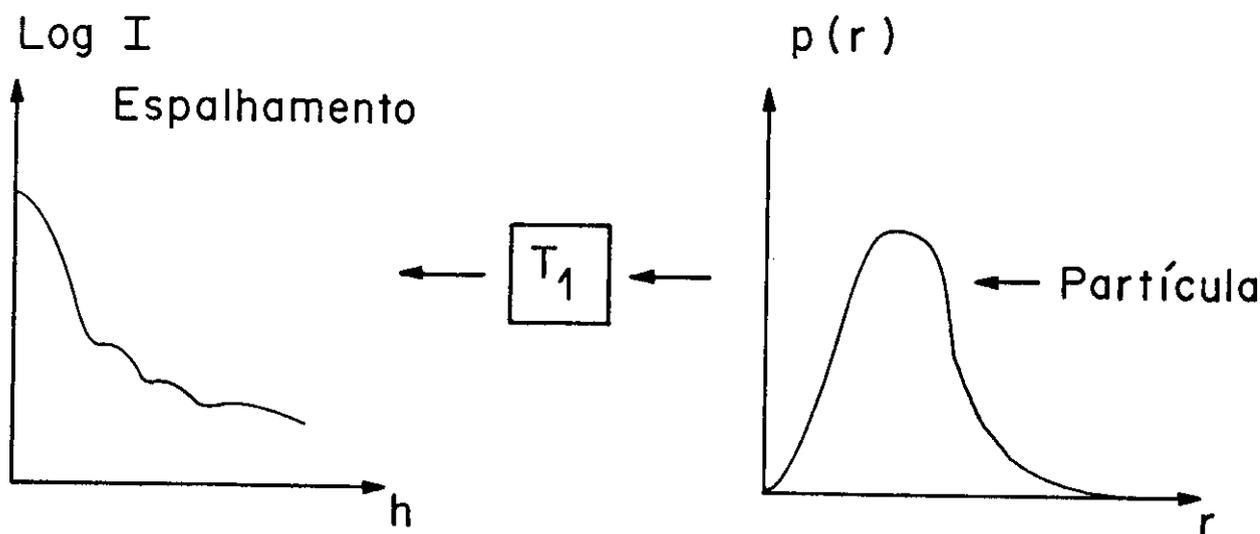


Figura I.3

I.3.2-FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTANCIAS $p(r)$

A função $p(r)$, multiplicada pelo fator 4π , representa o número de distâncias dentro de uma partícula homogênea, isto é, o número de linhas com comprimento r que são encontradas na combinação de um elemento de volume qualquer i com outro elemento de volume k [5].

No caso de partículas não homogêneas, é preciso considerar a densidade eletrônica nos elementos de volume. A função $p(r)$ é proporcional ao número de pares de elétrons separados pela distância r encontrada na combinação de um elemento de volume i com qualquer outro elemento k da mesma partícula. O número de pares de elétrons é dado pelo número de pares de elementos de volume multiplicados pelo produto do número de elétrons n_i e n_k situados nos volumes correspondentes (Fig. I.4). Regiões com sinais diferentes de diferença de densidade eletrônica dão contribuições negativas à função distribuição de distâncias, isto é, ela pode ser negativa em algumas partes.

A partir da função distribuição de distâncias podemos determinar três parâmetros relacionados à partícula: R_g , D_{max} e $I(0)$. O raio de giro, discutido anteriormente, por definição, é dado por

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{\infty} p(r) r^2 dr}{2 \int_0^{\infty} p(r) dr} \quad (27)$$

A dimensão máxima na partícula, D_{max} , é lida diretamente da curva $p(r)$ vs r , pois corresponde ao ponto em que a função se anula:

$$p(r) = 0 \quad \text{para} \quad r \geq D_{max}$$

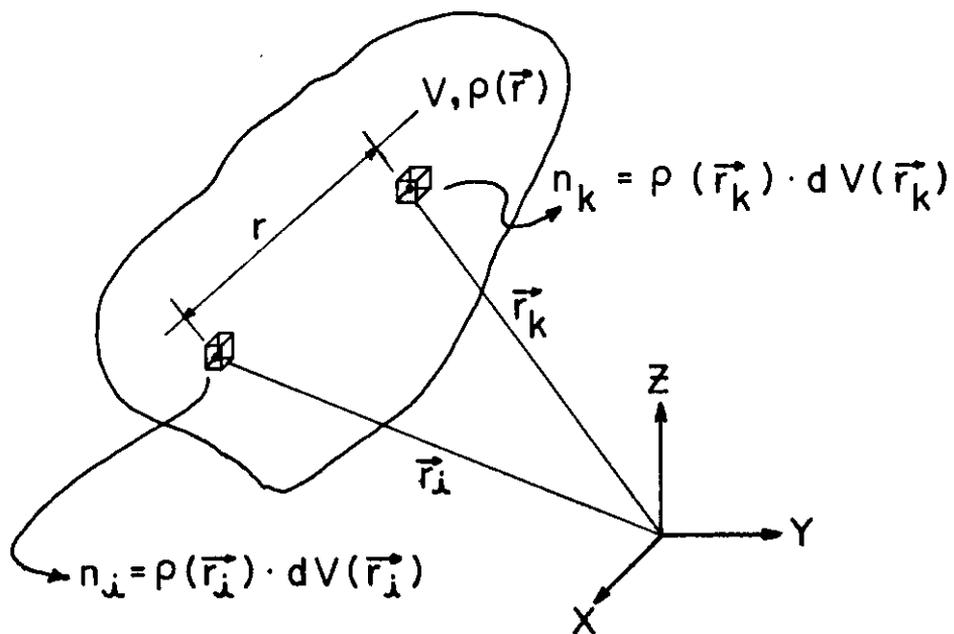


Figura I.4

A intensidade no ângulo zero, $I(0)$, é calculada através da expressão

$$I(0) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) dr \quad . \quad (28)$$

A forma da função $p(r)$ também nos fornece muitas informações. Por exemplo, podemos distinguir e reconhecer alguns tipos de partículas: globulares compactas, alongadas em uma direção (com seção transversal constante - cilindros e prismas - e variável - elipsóides) e vesículas esféricas centrossimétricas. As partículas não homogêneas, que tem duas ou mais regiões com diferentes sinais de densidade eletrônica, podem ser identificadas. Os efeitos de concentração residual na dispersão de partículas e a formação de dímeros são facilmente observados e acompanhados.

Outra função, bastante útil na análise de partículas lamelares, é a função distribuição de distâncias de um plano definida pela relação

$$f(r) = \frac{p(r)}{r} \quad . \quad (29)$$

Esta função nos dá a espessura de camadas planas e os diâmetros interno e externo de vesículas esféricas.

Veremos, a seguir, como tais informações são obtidas.

I.3.3- INTERPRETAÇÃO DA FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTANCIAS

Otto Glatter [5,6] demonstrou as possibilidades e limitações na interpretação da função $p(r)$ através de alguns

exemplos que apresentaremos resumidamente.

Uma esfera tem sua função distribuição de distâncias expressada por

$$p(r) = 12 x^2 (2 - 3x + x^3) \quad (30)$$

com $x = r/D_{\max}$, onde D_{\max} é o diâmetro e, portanto, sua dimensão máxima. Na Fig.I.5, podemos ver a função $p(r)$ correspondente. O máximo se situa próximo de $r = D_{\max}/2$ ($x=0,5$). Qualquer desvio da simetria esférica, considerando partículas sem buracos, desloca o máximo para menores valores de r , se D_{\max} é mantido constante. Portanto, a razão r_{\max}/D_{\max} , onde r_{\max} é o valor de r no máximo da função $p(r)$, diminui para qualquer desvio de uma esfera e decresce na seguinte seqüência: partículas globulares, planas e cilíndricas. Uma explicação possível para esta diminuição é o fato de termos longas distâncias contribuindo em três dimensões nas partículas globulares, enquanto que, em planas e cilíndricas, elas contribuem em duas e uma, respectivamente.

Partículas alongadas em uma dimensão com seção transversal de forma arbitrária e constante (prismas e cilindros longos) satisfazem a condição $d \ll L$, onde d é a dimensão máxima da seção transversal e L é o comprimento da partícula. Dessa forma, temos

$$L = (D_{\max}^2 - d^2)^{1/2} \simeq D_{\max}$$

Na Fig.I.6, são apresentadas as curvas características de prismas longos com a mesma seção transversal e diferentes comprimentos. A função tem um máximo na região $0 \leq r < d$, e é linear para $r > d$. A posição real do máximo depende da forma da seção transversal e da razão d/D_{\max} . A inclinação da parte linear é proporcional ao quadrado da área da seção transversal (F) [5,6].

Variações em F resultam em diferenças pronunciadas

que tenham o comprimento muito maior que o diâmetro da seção transversal ($L \gg d$), de acordo com a ref.[2], é dada pela expressão

$$I(h) = L \frac{\pi}{h} I_c(h) \quad (15)$$

onde $I_c(h)$ é a intensidade relacionada à seção transversal. O fator $1/h$ é característico de partículas com forma cilíndrica.

A intensidade $I_c(h)$ pode ser aproximada por

$$I_c(h) = I_c(0) e^{-h^2 R_c^2 / 2}, \quad (16)$$

onde R_c é o raio de giro da seção transversal.

Se traçarmos um gráfico de $\ln(Ih)$ vs h^2 , onde

$$I(h) = \frac{L\pi}{h} I_c(0) e^{-h^2 R_c^2 / 2} \quad (17)$$

é a intensidade espalhada pela partícula, teremos uma reta

$$\ln(Ih) = \ln[L\pi I_c(0)] - \frac{R_c^2}{2} h^2 \quad (18)$$

com inclinação $\alpha = -\frac{R_c^2}{2}$. Assim, temos o raio de giro da seção transversal

$$R_c = \sqrt{-2\alpha}. \quad (19)$$

A intensidade de espalhamento para partículas planas ou lamelares com espessura finita e muito pequena em

relação às outras duas dimensões é

$$I(h) = \frac{2\pi A}{h^2} I_1(h), \quad (20)$$

onde A é a área do plano e $I_1(h)$, a intensidade relacionada à espessura. A aproximação para $I_1(h)$ é dada por

$$I_1(h) = I_1(0) e^{-h^2 R_1^2}. \quad (21)$$

O cálculo do raio de giro da espessura, R_1 , é análogo ao de R_c . Traçamos o gráfico $\ln(Ih^2)$ vs h^2 usando o espalhamento da partícula expresso por

$$I(h) = \frac{2\pi A}{h^2} I_1(0) e^{-h^2 R_1^2} \quad (22)$$

e obtemos uma reta

$$\ln(Ih^2) = \ln[2\pi A I_1(0)] - R_1^2 h^2 \quad (23)$$

com inclinação $\alpha = -R_1^2$. Portanto,

$$R_1 = \sqrt{-\alpha}. \quad (24)$$

Em resumo, podemos determinar o R_g de qualquer tipo de partícula, mas a precisão vai depender da forma. Para partículas alongadas em uma ou duas direções, é possível obter, ainda, parâmetros relacionados a suas dimensões menores: raios de giro da seção transversal e da espessura, respectivamente.

I.3- FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTANCIAS

I.3.1- FUNÇÃO DE ESPALHAMENTO E FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTANCIAS

Até agora, vimos como podemos observar a partícula indiretamente através da curva de espalhamento obtida no espaço recíproco.

A estrutura completa da partícula, teóricamente, é descrita pela distribuição de densidade eletrônica, tridimensional, $\rho(\vec{r})$. No entanto, temos um grande número de partículas contribuindo para o espalhamento que resulta ser uma média espacial. Em consequência, perdemos informação e a partícula passa a ser representada pela função distribuição de distâncias, $p(r)$, que é unidimensional.

A cada função de espalhamento, no espaço recíproco, corresponde uma função distribuição de distâncias no espaço real. As duas funções estão interrelacionadas por uma transformada de Fourier (T_1 na Fig.I.3) do tipo

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\text{sen } hr}{hr} dr \quad (25)$$

e sua transformada inversa

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} I(h) h r \text{ sen } hr \, dh \quad (26)$$

Ou seja, a transformada de Fourier define como a informação no espaço real, $p(r)$, é transformada no espaço recíproco, $I(h)$.

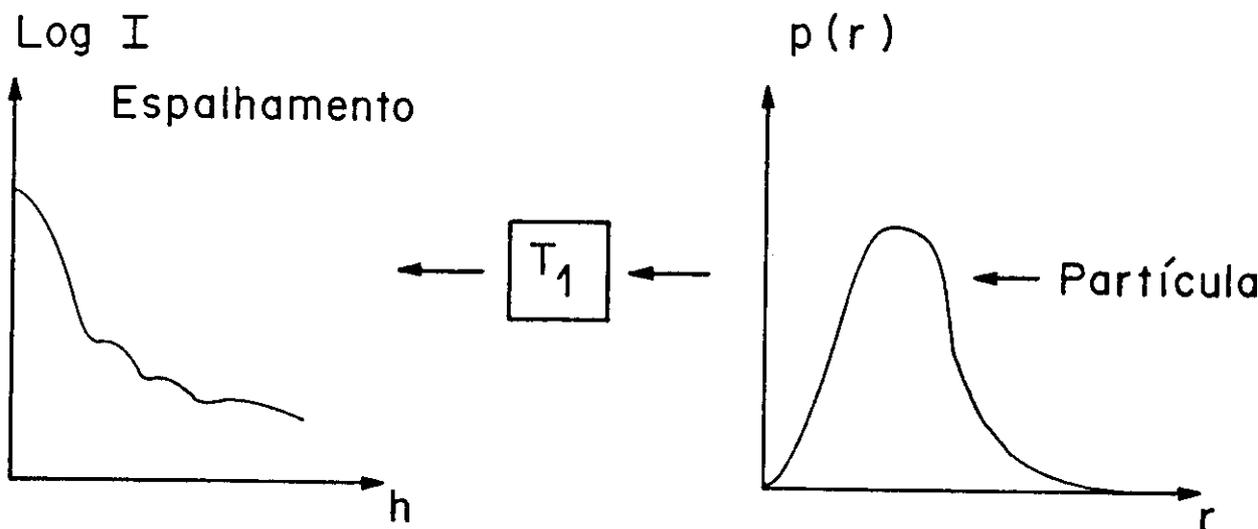


Figura I.3

I.3.2-FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTANCIAS $p(r)$

A função $p(r)$, multiplicada pelo fator 4π , representa o número de distâncias dentro de uma partícula homogênea, isto é, o número de linhas com comprimento r que são encontradas na combinação de um elemento de volume qualquer i com outro elemento de volume k [5].

No caso de partículas não homogêneas, é preciso considerar a densidade eletrônica nos elementos de volume. A função $p(r)$ é proporcional ao número de pares de elétrons separados pela distância r encontrada na combinação de um elemento de volume i com qualquer outro elemento k da mesma partícula. O número de pares de elétrons é dado pelo número de pares de elementos de volume multiplicados pelo produto do número de elétrons n_i e n_k situados nos volumes correspondentes (Fig. I.4). Regiões com sinais diferentes de diferença de densidade eletrônica dão contribuições negativas à função distribuição de distâncias, isto é, ela pode ser negativa em algumas partes.

A partir da função distribuição de distâncias podemos determinar três parâmetros relacionados à partícula: R_g , D_{max} e $I(0)$. O raio de giro, discutido anteriormente, por definição, é dado por

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{\infty} p(r) r^2 dr}{2 \int_0^{\infty} p(r) dr} \quad (27)$$

A dimensão máxima na partícula, D_{max} , é lida diretamente da curva $p(r)$ vs r , pois corresponde ao ponto em que a função se anula:

$$p(r) = 0 \quad \text{para} \quad r \geq D_{max}$$

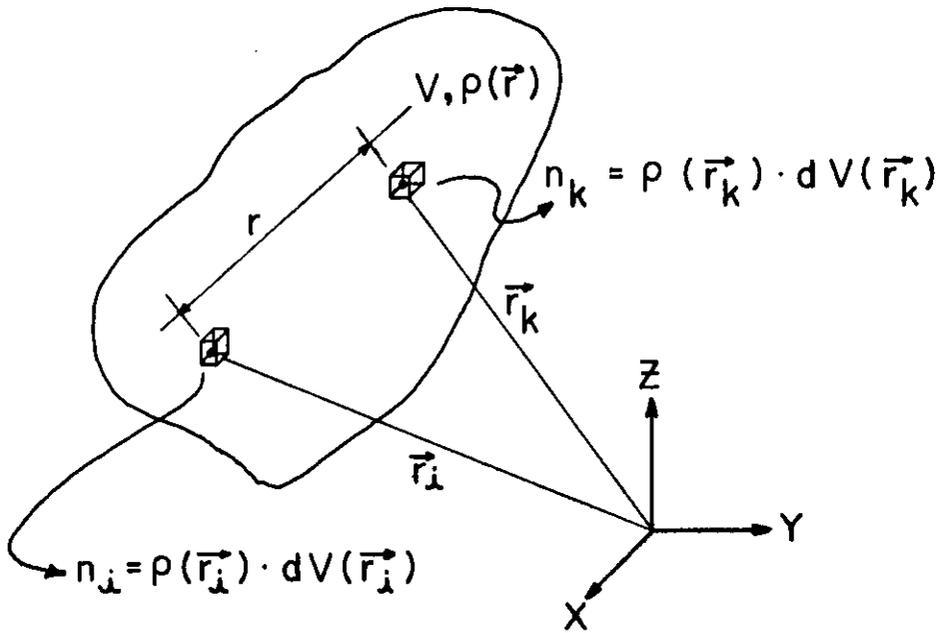


Figura I.4

A intensidade no ângulo zero, $I(0)$, é calculada através da expressão

$$I(0) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) dr \quad . \quad (28)$$

A forma da função $p(r)$ também nos fornece muitas informações. Por exemplo, podemos distinguir e reconhecer alguns tipos de partículas: globulares compactas, alongadas em uma direção (com seção transversal constante - cilindros e prismas - e variável - elipsóides) e vesículas esféricas centrossimétricas. As partículas não homogêneas, que tem duas ou mais regiões com diferentes sinais de densidade eletrônica, podem ser identificadas. Os efeitos de concentração residual na dispersão de partículas e a formação de dímeros são facilmente observados e acompanhados.

Outra função, bastante útil na análise de partículas lamelares, é a função distribuição de distâncias de um plano definida pela relação

$$f(r) = \frac{p(r)}{r} \quad . \quad (29)$$

Esta função nos dá a espessura de camadas planas e os diâmetros interno e externo de vesículas esféricas.

Veremos, a seguir, como tais informações são obtidas.

I.3.3- INTERPRETAÇÃO DA FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTANCIAS

Otto Glatter [5,6] demonstrou as possibilidades e limitações na interpretação da função $p(r)$ através de alguns

exemplos que apresentaremos resumidamente.

Uma esfera tem sua função distribuição de distâncias expressada por

$$p(r) = 12 x^2 (2 - 3x + x^3) \quad (30)$$

com $x = r/D_{\max}$, onde D_{\max} é o diâmetro e, portanto, sua dimensão máxima. Na Fig. I.5, podemos ver a função $p(r)$ correspondente. O máximo se situa próximo de $r = D_{\max}/2$ ($x=0,5$). Qualquer desvio da simetria esférica, considerando partículas sem buracos, desloca o máximo para menores valores de r , se D_{\max} é mantido constante. Portanto, a razão r_{\max}/D_{\max} , onde r_{\max} é o valor de r no máximo da função $p(r)$, diminui para qualquer desvio de uma esfera e decresce na seguinte seqüência: partículas globulares, planas e cilíndricas. Uma explicação possível para esta diminuição é o fato de termos longas distâncias contribuindo em três dimensões nas partículas globulares, enquanto que, em planas e cilíndricas, elas contribuem em duas e uma, respectivamente.

Partículas alongadas em uma dimensão com seção transversal de forma arbitrária e constante (prismas e cilindros longos) satisfazem a condição $d \ll L$, onde d é a dimensão máxima da seção transversal e L é o comprimento da partícula. Dessa forma, temos

$$L = (D_{\max}^2 - d^2)^{1/2} \approx D_{\max}$$

Na Fig. I.6, são apresentadas as curvas características de prismas longos com a mesma seção transversal e diferentes comprimentos. A função tem um máximo na região $0 \leq r < d$, e é linear para $r > d$. A posição real do máximo depende da forma da seção transversal e da razão d/D_{\max} . A inclinação da parte linear é proporcional ao quadrado da área da seção transversal (F) [5,6].

Variações em F resultam em diferenças pronunciadas

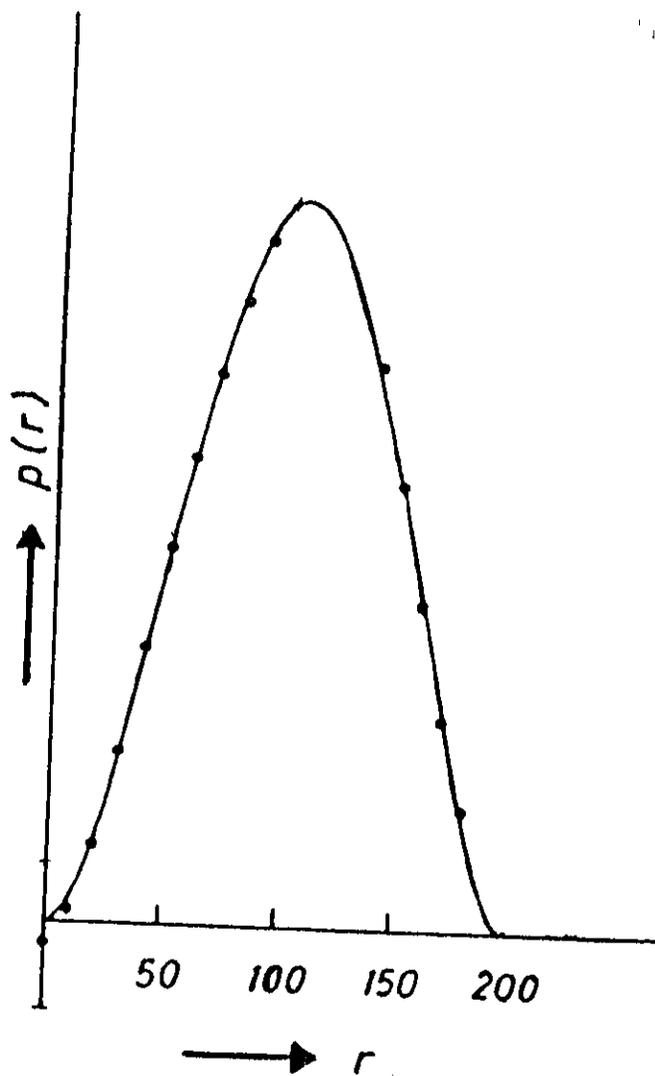


Figura I.5
 — Função $p(r)$ de uma esfera com raio igual a 100 Å [refs. 5, 6 e 12].

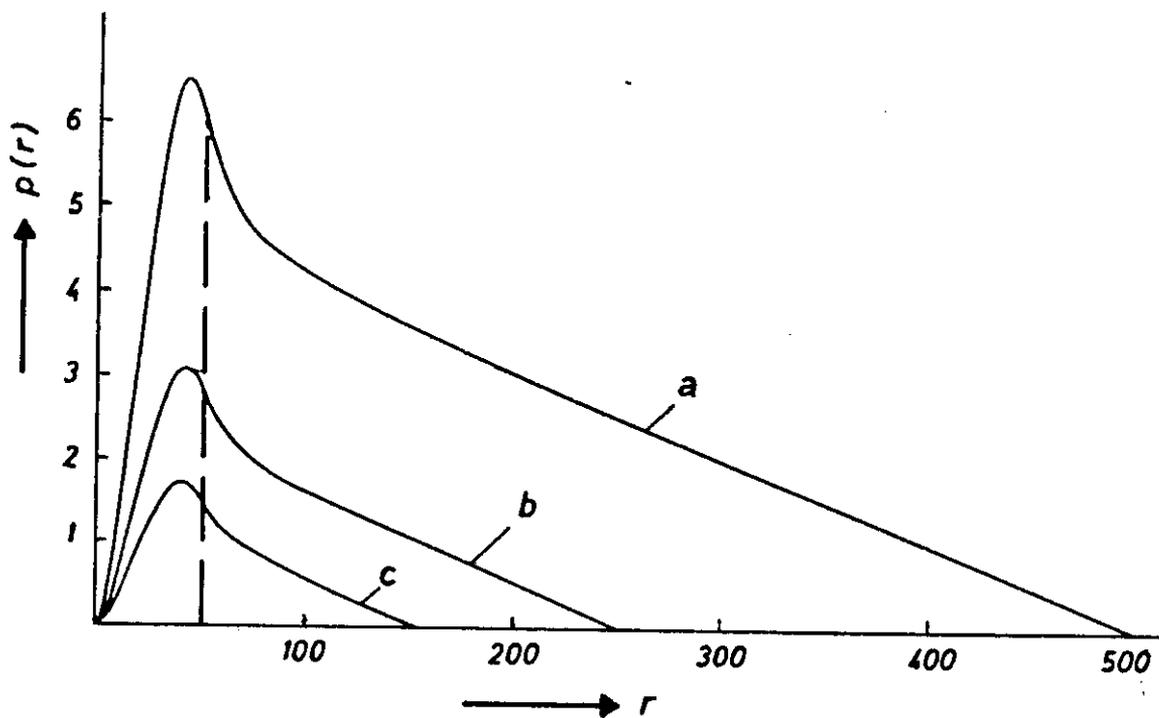


Figura I.6

Distribuições de distâncias de prismas homogêneos com dimensões: (a) 50:50:500; (b) 50:50:250; (c) 50:50:150 [refs.5, 6 e 12].

na inclinação. Um limite aproximado para a ocorrência de uma parte linear é a condição de que

$$\frac{D}{d} \geq 2,5.$$

As funções $p(r)$ de partículas alongadas em duas dimensões (discos e prismas planos), também chamadas partículas lamelares, deveriam apresentar um aumento com a segunda potência na região $r < l$, um aumento linear para $r > l$ e uma diminuição até se anular em $r = D_{\max}$ [5,6]. Na Fig.I.7, temos as $p(r)$ para 3 lamelas de diferentes espessuras l . A transição $r=l$ não pode ser vista claramente e só podemos reconhecer um comportamento convexo em $r > l$.

A função $f(r)$ (relação 29) é mais favorável no estudo de partículas lamelares. Na Fig.I.8, temos as $f(r)$ correspondentes às $p(r)$ da Fig.I.7. As curvas começam com um aumento linear. Em $r=l$, elas se tornam funções quase lineares levemente decrescentes. A espessura da partícula, l , pode ser inferida do ponto de transição. O valor limite A de $f(r)$, resultante da extrapolação para $r=0$ da parte quase linear que segue o ponto de transição, contém informação sobre a área do plano basal da lamela [5,6]. A extrapolação será mais precisa quanto maior a razão D_{\max}/l . Na prática, a função $f(r)$ permite o reconhecimento de partículas lamelares e a determinação de sua espessura.

A comparação entre uma esfera, um elipsóide prolato (1:1:3), um elipsóide oblato (1:1:0,2) e um prisma plano (1:1:0,23) com mesma densidade eletrônica e mesmo raio de giro pode ser vista nas Figs.I.9a e b. Os elipsóides têm um D_{\max} maior que a esfera e, portanto, o máximo da função $p(r)$ ocorre em menores valores de r . Sua seção transversal variável causa uma descendente não linear com r . A diferença em relação a uma

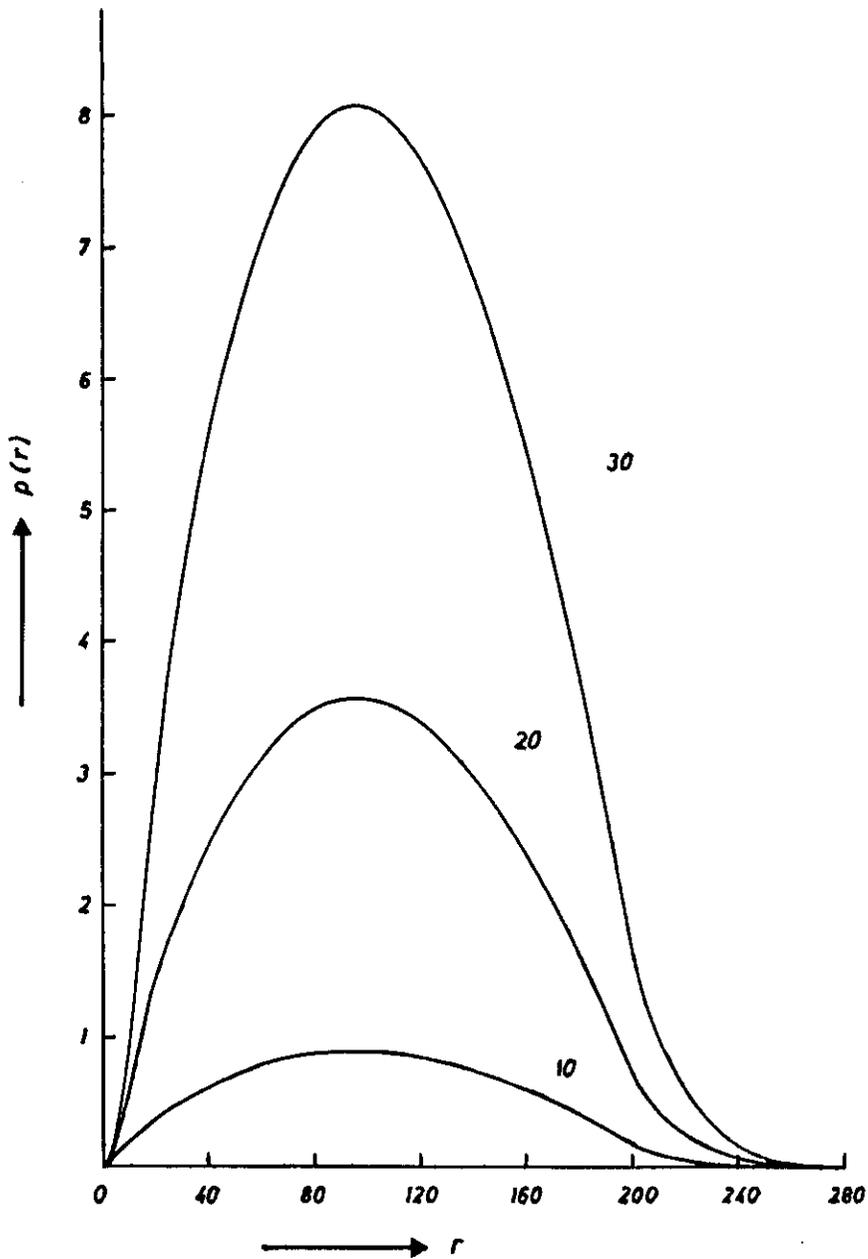


Figura I.7

Funções $p(r)$ de partículas lamelares com a mesma área plana ($100 \times 100 \text{ \AA}^2$) e espessuras l iguais a 10Å, 20Å e 30Å [refs.5, 6 e 12].

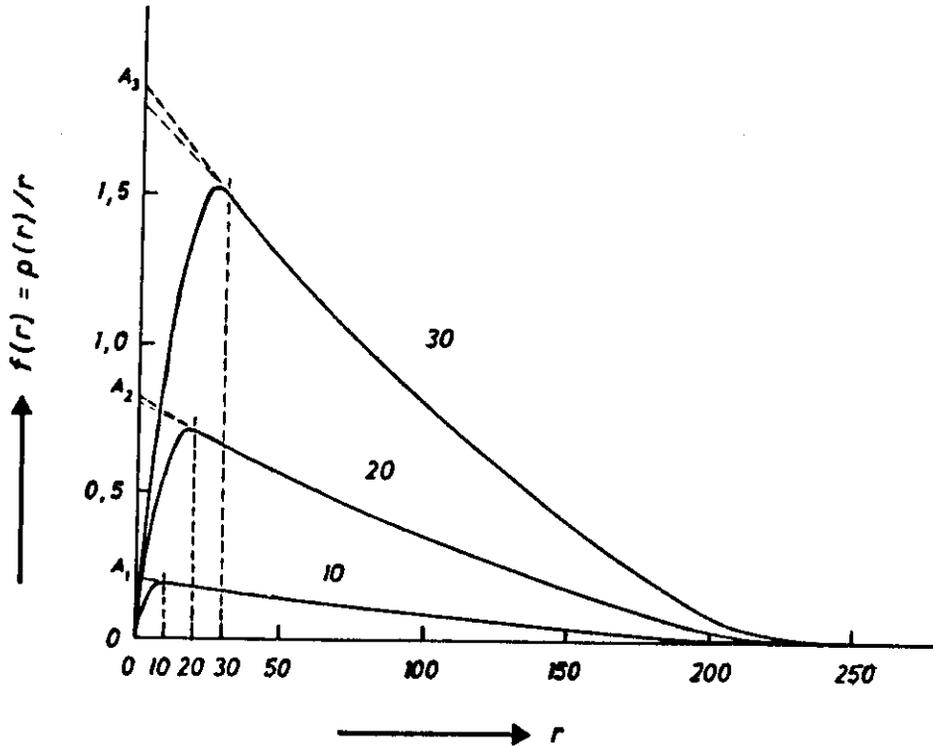


Figura I.8

Funções $f(r)$ correspondentes às funções $p(r)$ da Fig.I.7. Os pontos de transição estão assinalados pelas linhas tracejadas verticais [5,6,12].

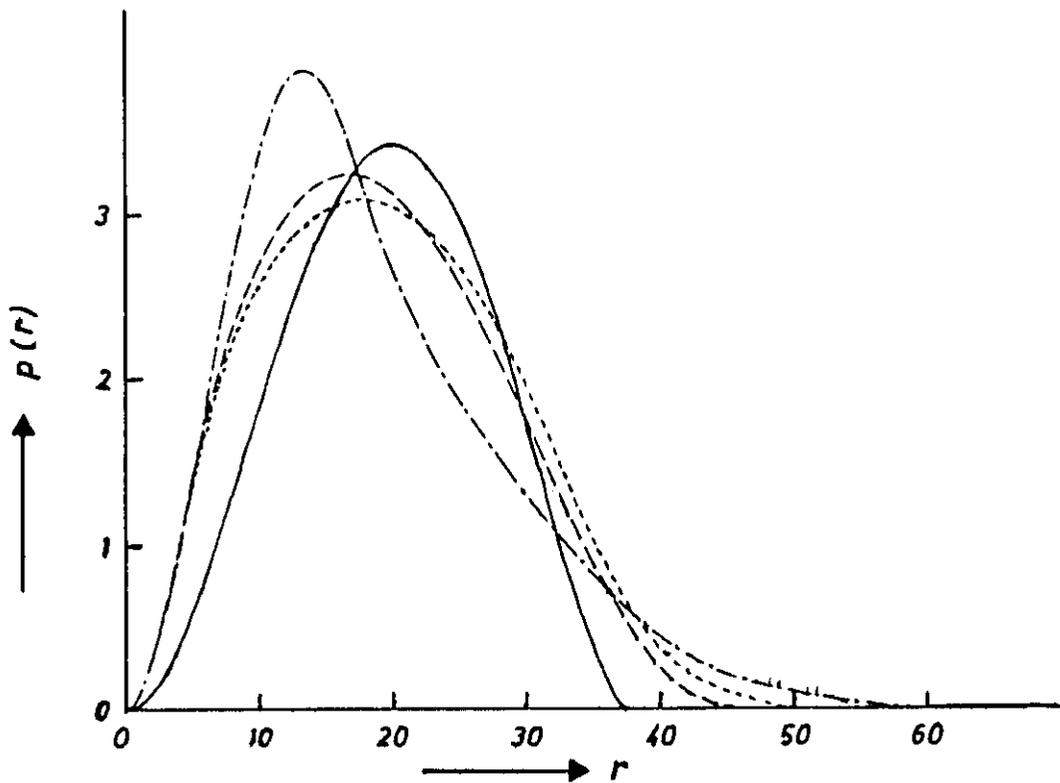


Figura I.9a

Comparação entre as funções distribuição de distâncias de uma esfera (—), um elipsóide prolato de revolução 1:1:3 (-.-.), um elipsóide oblato de revolução 1:1:0,2 (- - -) e um prisma plano 1:1:0,23 (- - -) com mesmo R_0 [5,8,12].

partícula alongada de seção transversal constante é óbvia. O elipsóide oblato pode ser reconhecido como uma partícula plana através da função $f(r)$.

Os limites de interpretação de resultados de espalhamento de raios X a baixo ângulo são demonstrados pelas funções $p(r)$ e $f(r)$ do prisma plano (1:1:0,23). As diferenças em relação ao elipsóide oblato são tão insignificantes que podem ser consideradas dentro do erro experimental.

A esfera oca é outro tipo interessante de partícula. As fórmulas exatas para a função $p(r)$ foram derivadas por O. Glatter [7] a partir do volume de superposição da partícula com seu "fantasma" deslocado de uma distância r .

Na Fig.I.10, podemos acompanhar a variação da $p(r)$ para esferas ocas com diferentes espessuras de parede (l). Em valores pequenos de r , a função se comporta de acordo com uma expressão com termos que variam com 2^a , 3^a e 5^a potência de r . De $r = l$ até $r = D_{\max} - 2l$, ela é linear e crescente. Entre $r = D_{\max} - l$ e $r = D_{\max}$, a curva coincide com a função $p(r)$ para uma esfera maciça.

O caso limite para uma camada esférica infinitamente estreita corresponde a um caso especial de partícula plana. As curvas $f(r)$ correspondentes às $p(r)$ da Fig.I.10 podem ser vistas na Fig.I.11. A região linear é horizontal por causa da forma geométrica especial do corpo.

Como partícula não homogênea, vamos analisar, primeiro, um cilindro que tem densidade eletrônica variável em função somente da distância x ao seu eixo (Fig.I.12). Sua $p(r)$ difere da correspondente ao cilindro homogêneo dentro das dimensões da seção transversal. Ela apresenta uma região negativa devido à predominância das contribuições de distâncias que ligam partes que tem densidade eletrônica com sinais diferentes. A inclinação da parte linear muda devido à variação na área da seção

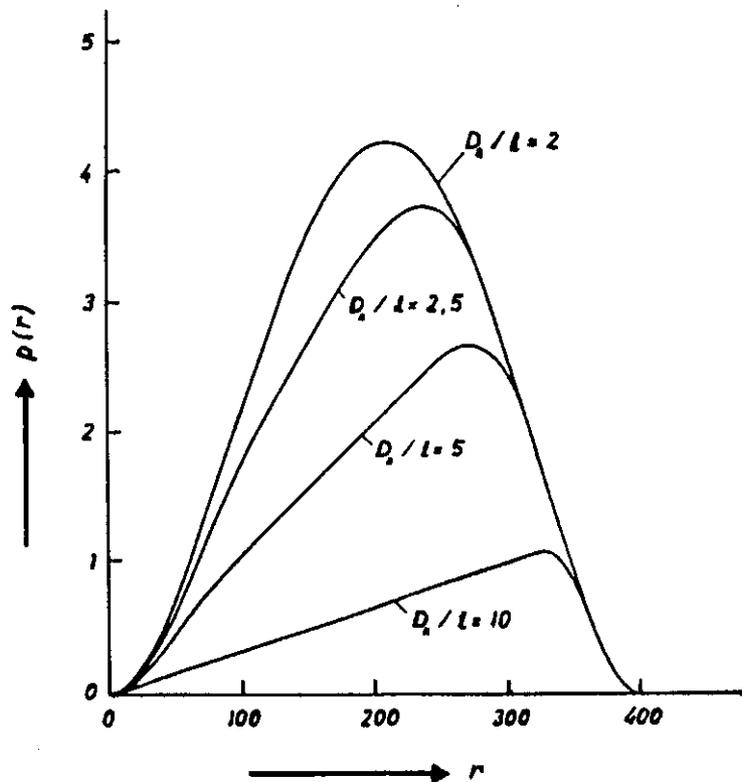


Figura I.10

Funções $p(r)$ de esferas ocas (D_a é o diâmetro externo e l é a espessura) [5,6,12].

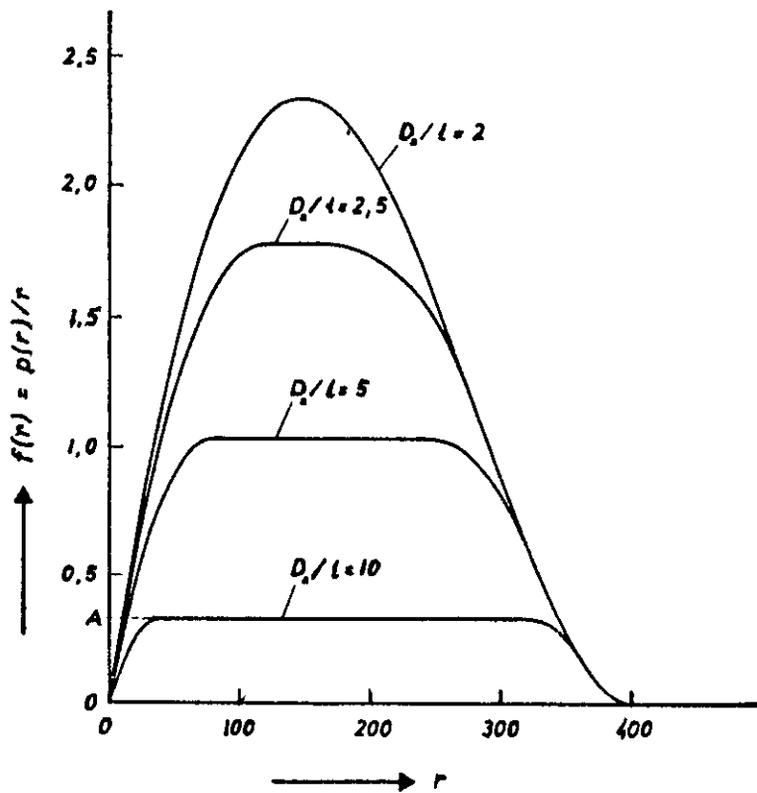


Figura I.11
 Funções $f(r)$ correspondentes às funções $p(r)$ da

Fig. I.10.

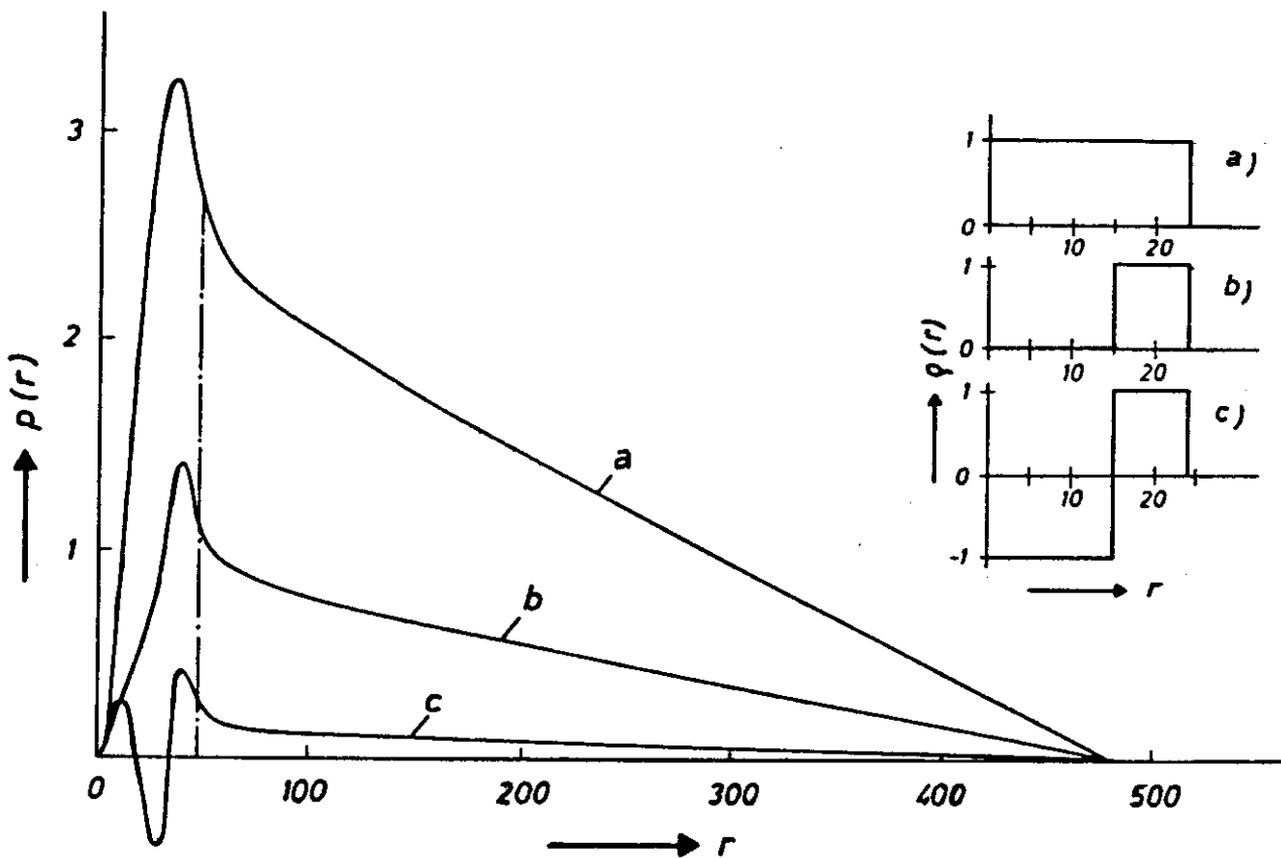


Figura I.12

Funções $p(r)$ para cilindros com comprimento de 480Å e diâmetro externo de 48Å: (a) cilindro homogêneo, (b) cilindro oco, (c) cilindro não homogêneo. No canto direito superior, podem ser vistas as distribuições de densidade eletrônica correspondentes [5,6,12].

transversal. Cilindros com seção transversal homogênea, mas com densidade eletrônica variável ao longo do eixo, apresentam modificações na função $p(r)$ em todo intervalo de definição ($0 < r < D_{\max}$).

As partículas lamelares apresentam propriedades similares. Quando sua densidade eletrônica varia na direção perpendicular ao plano, a função $p(r)$ se desvia da correspondente à partícula homogênea no intervalo $0 \leq r \leq l$, podendo ser negativa nesta região (Fig.I.13). As lamelas com espessura homogênea, mas densidade eletrônica variável no plano, tem funções $p(r)$ que se diferenciam no intervalo completo $0 < r < D_{\max}$.

Na Fig.I.14, temos exemplos de formação de dímeros. Foi usado, como monômero, um elipsóide prolato (1:1:2). A $p(r)$ do monômero indica uma partícula alongada em uma direção com seção transversal variável. Os arranjos paralelo e linear (a e b, respectivamente) diferem bastante entre si. O linear contribui com até 2 vezes a dimensão máxima do monômero. As configurações T e L (c e d na figura) são intermediárias entre as anteriores. Uma corcova na função $p(r)$ em grandes valores de r é típica de dímeros cujos monômeros ainda podem ser reconhecidos.

Por último, é importante considerar a interferência interpartículas que não é desprezível quando se trabalha com amostras altamente concentradas. A função de espalhamento sofre um decréscimo nos ângulos pequenos com o aumento da concentração (Fig.I.15), devido à interferência interpartículas. Em consequência, vamos ter valores para o raio de giro que variam com a concentração (Fig.I.16). Normalmente, é medida uma série de amostras com diferentes concentrações e feita a extrapolação para concentração zero. Porém, não é possível saber se as curvas de intensidade ainda apresentam algum efeito residual de concentração no espaço recíproco. No entanto, a função $p(r)$ é

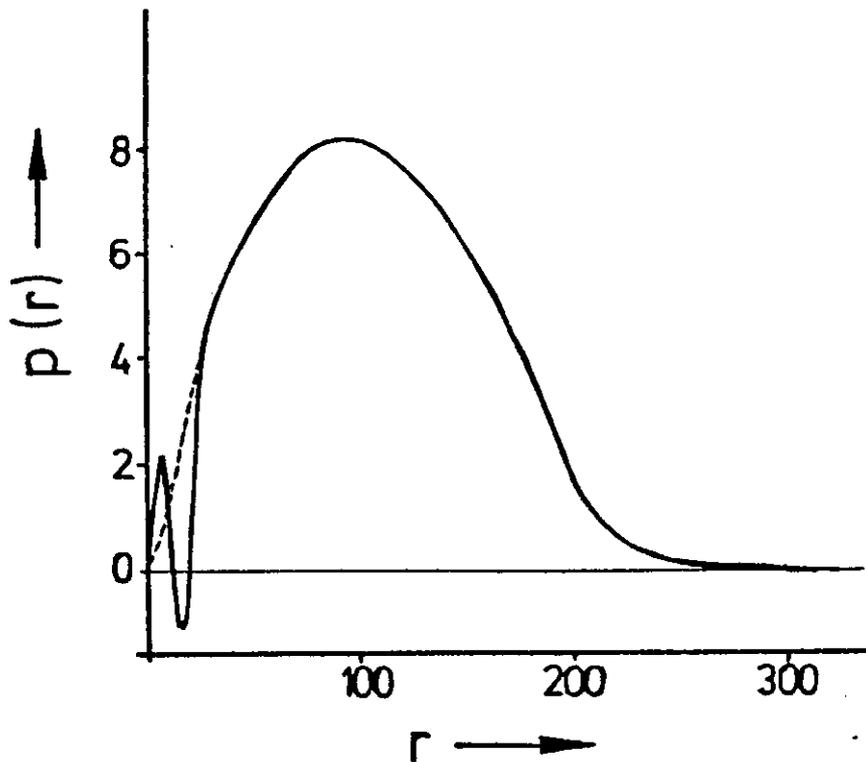


Figura I.13

Função $p(r)$ de uma partícula lamelar. A linha cheia corresponde a uma partícula não homogênea cuja densidade eletrônica é uma função com três degraus (+1, -1 e +1). A linha tracejada representa a lamela homogênea com densidade igual a +1 [5].

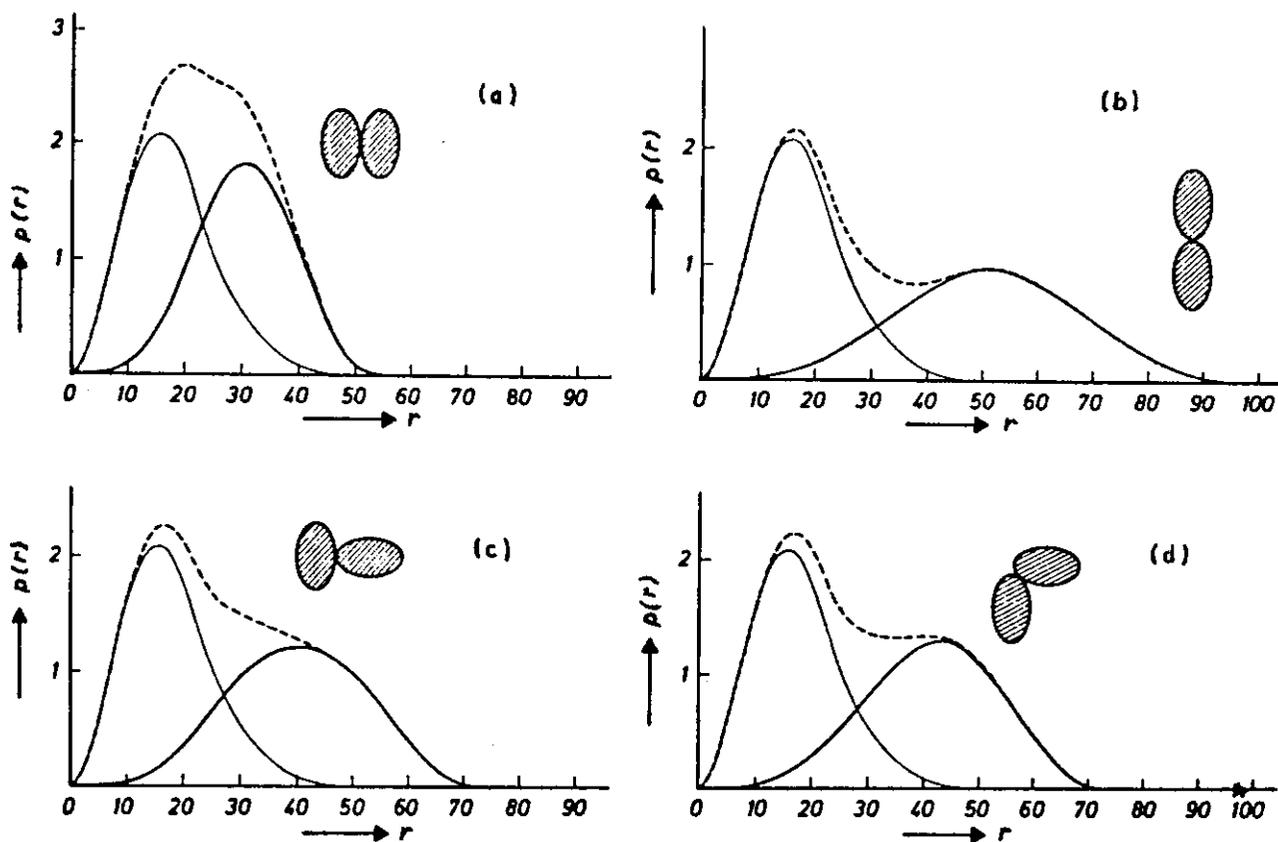


Figura I.14

Função distribuição de distâncias de modelos de dímeros compostos por elipsóides prolatos: — monômeros, - - - dímeros e — diferença entre dímeros e monômeros [5,6,12].

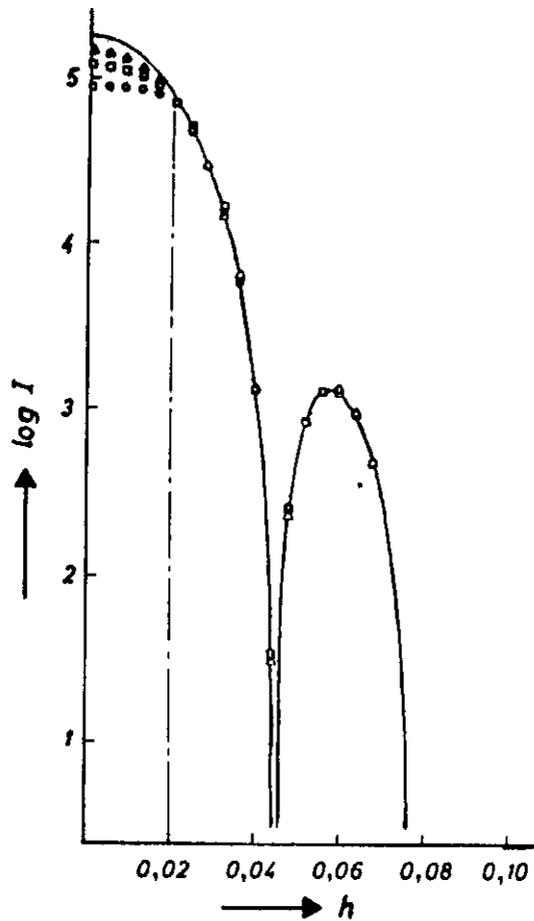


Figura I.15

Funções de espalhamento de esferas maciças para amostras com diferentes concentrações (— menos concentrada; mais concentrada) [5,6,12].

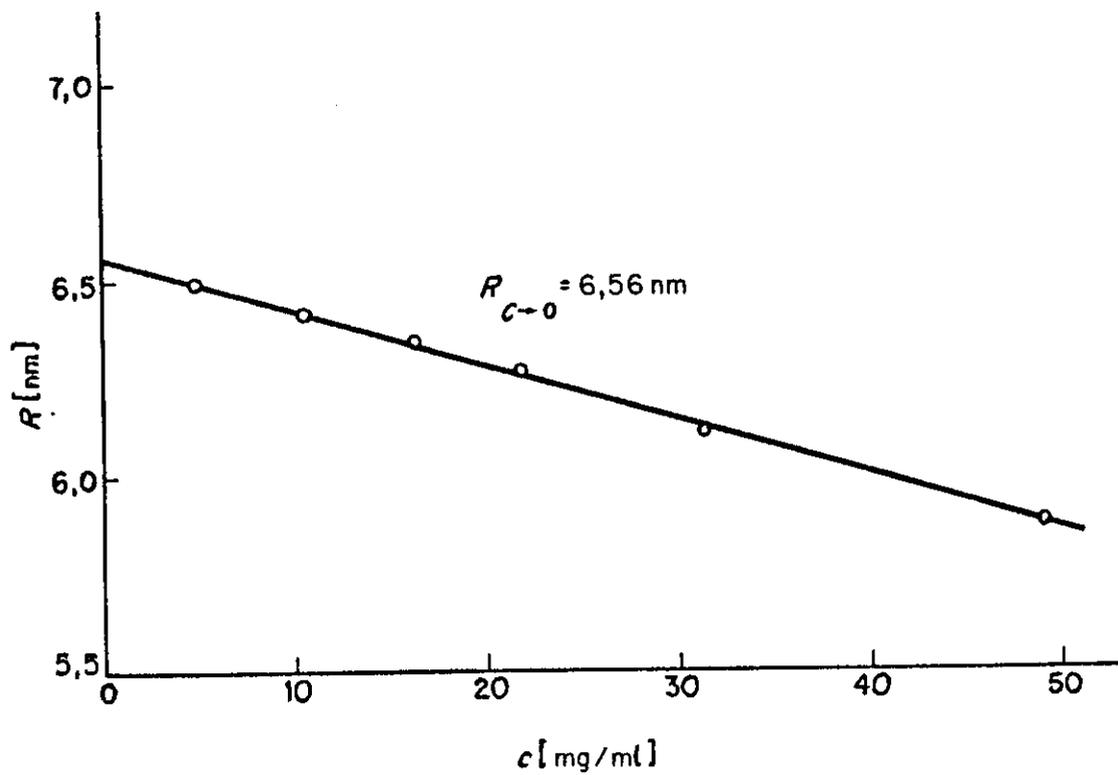


Figura I.16
 Extrapolação de raio de giro para concentração zero [5,6,12].

consideravelmente afetada pelo efeito interpartícula. Ela diminui com r crescente, vai a um mínimo negativo na região de D_{\max} da partícula e oscila até se anular em valores maiores de r , conforme vemos nas Figs. I.17 e I.18.

I.4 - CURVA DE ESPALHAMENTO EXPERIMENTAL: $I_{\text{exp}}(h)$

Na teoria, supõe-se o uso de um feixe primário monocromático, com colimação pontual, de intensidade muito alta e um detetor infinitamente pequeno para a obtenção da curva de espalhamento. O não respeito a uma, ou mais, das condições acima, que ocorre normalmente no trabalho experimental, acarreta em distorções da curva que precisam ser consideradas e corrigidas.

Quando não usamos radiação estritamente monocromática, a distribuição de comprimentos de onda no feixe primário, $W(\lambda')$, causa um efeito de distorção na intensidade espalhada que pode ser descrito pela integral (T_{λ} na Fig. I.19):

$$I_{\lambda}(h) = \int_0^{\infty} W(\lambda') I(h/\lambda') d\lambda', \quad (31)$$

onde $\lambda' = \lambda / \lambda_0$ e λ_0 é o comprimento de onda da radiação monocromática.

O sistema de colimação e o detetor tem aberturas finitas para que possamos ter suficiente intensidade de espalhamento. Para colimação são usadas fendas com comprimento muito grande em comparação à largura. A distribuição de intensidade, bidimensional, do feixe que atinge a amostra é representada por $I_0(x,t)$, onde t é a coordenada ao centro do feixe primário na direção do comprimento da fenda e x é a coordenada perpendicular a t . A distribuição $I_0(x,t)$ pode ser separada em duas distribuições independentes (ver ref. [2])

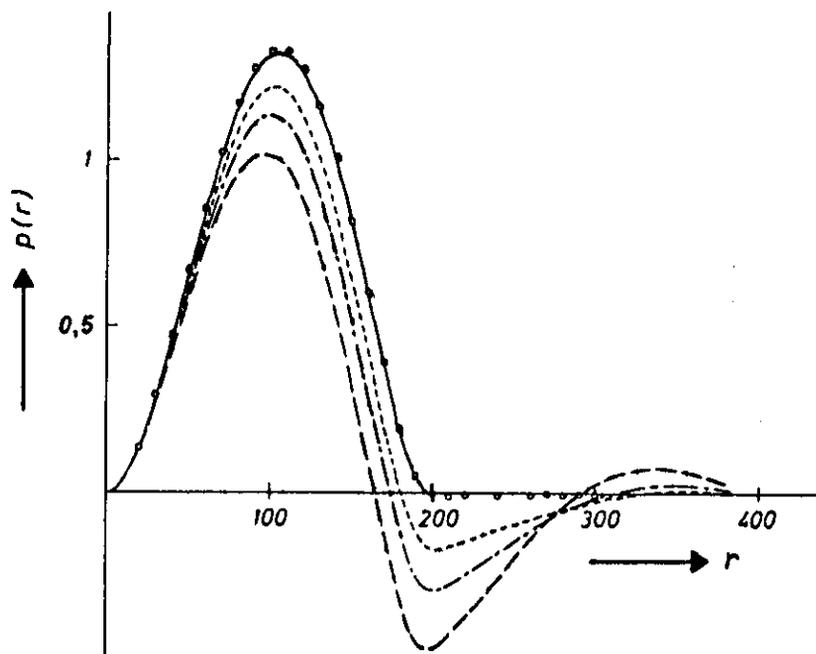


Figura I.17

Efeitos de concentração em funções $p(r)$ calculadas para o modelo de esfera maciça (— concentração zero; - - - mais concentrada) [5,6,12].

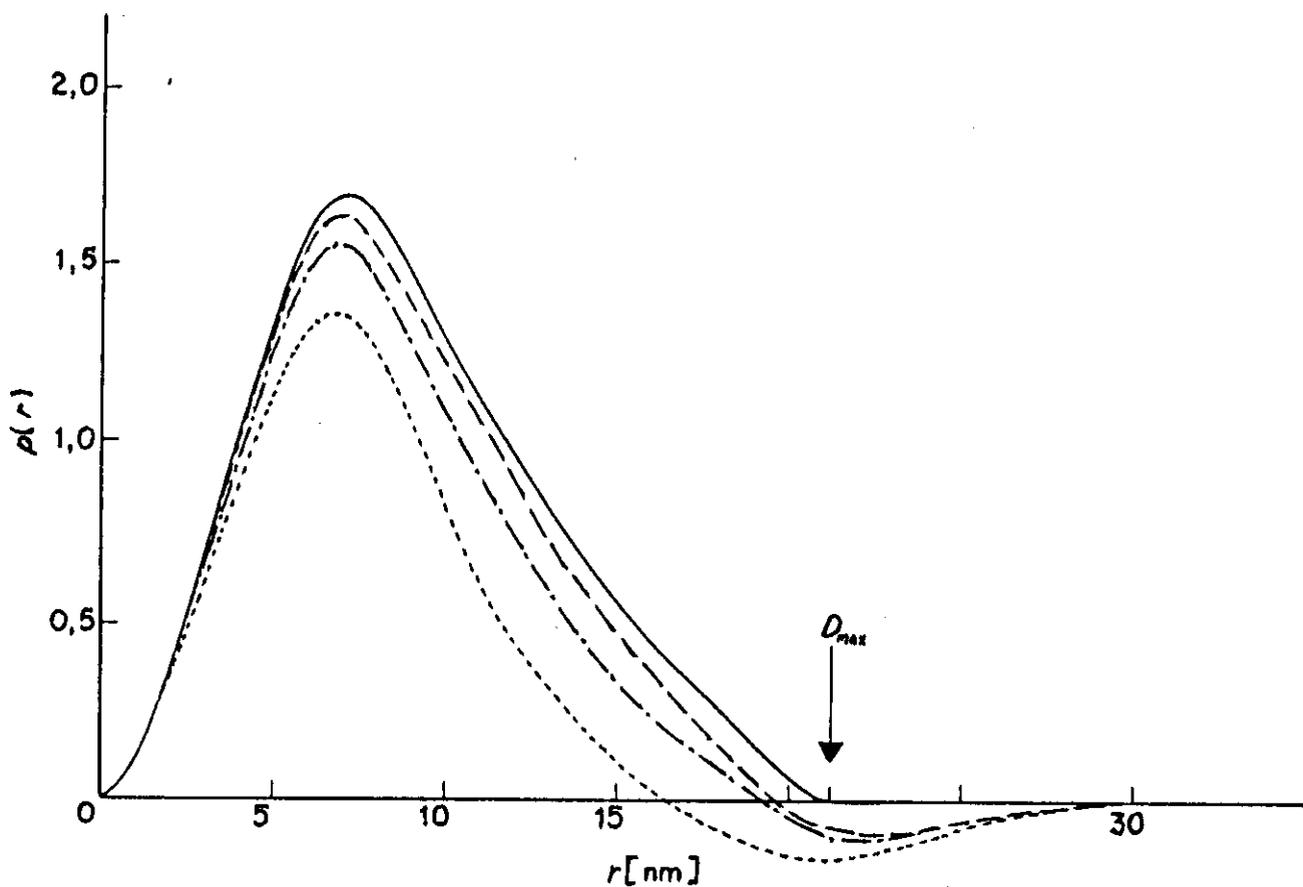


Figura I.18

Funções distribuição de distâncias para várias soluções concentradas de hemocianina de *A. leptodactylus* (- - - $c = 48$ mg/g; — — — $c = 4,8$ mg/g; ————— c extrapolada para zero) [5,6,12].

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

Portanto, temos dois efeitos de colimação unidimensionais.

Supondo um perfil $Q(x)$ infinitamente pequeno, o feixe primário linear, com distribuição de intensidade $P(t)$, produz uma intensidade espalhada distorcida $I_t(h)$. Esta função é a integral (T_t na Fig.I.19) da intensidade teórica $I(h)$ ponderada pela função $P(t)$:

$$I_t(h) = 2 \int_0^{\infty} P(t) I(\sqrt{h^2 + t^2}) dt . \quad (32)$$

O efeito causado pelo perfil de intensidade $Q(x)$ pode ser descrito pela integral (T_x na Fig.I.19)

$$I_x(h) = \int_0^{\infty} Q(x) I(h - x) dx , \quad (33)$$

onde $Q(x)$ é a distribuição de intensidade do feixe primário na direção transversal.

O comprimento da fenda do detetor é considerado através de uma convolução do perfil $P(t)$ com uma função degrau. Quando a distribuição é obtida com a mesma janela, esta convolução já é feita experimentalmente. O mesmo acontece com o perfil $Q(x)$. Se foi registrado nas mesmas condições de detecção, não são necessárias correções adicionais.

Todos os efeitos discutidos acima transformam a intensidade de espalhamento da partícula de acordo com a expressão (ver Fig.I.19):

$$I_{exp} = 2 \int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\infty} \int_0^{\infty} Q(x) P(t) W(\lambda') I[(h - x)^2 + t^2]^{1/2} / \lambda' d\lambda' dt dx \quad (34)$$

Finalizando, o intervalo angular em que é medida a

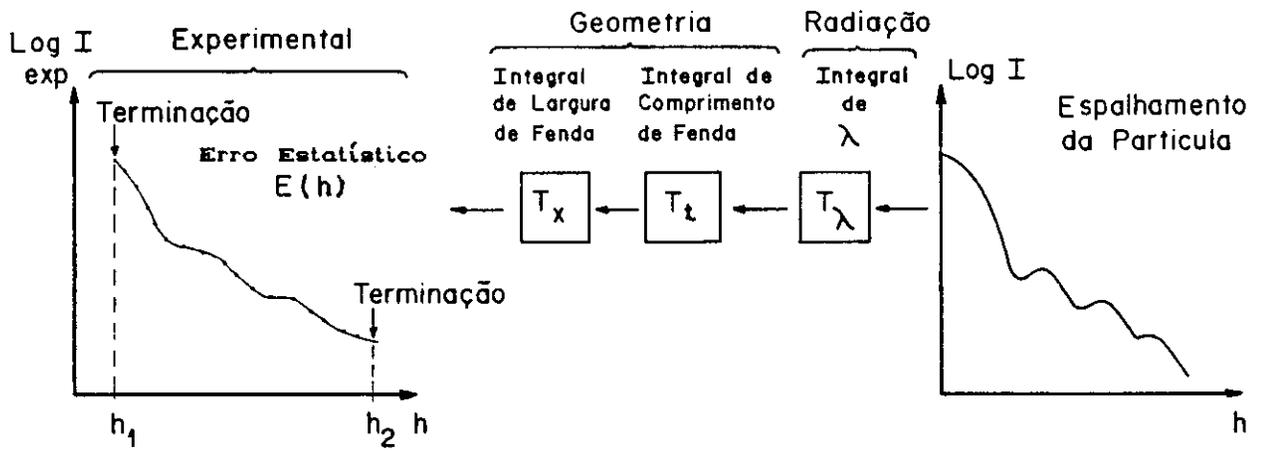


Figura I.19

intensidade de espalhamento é limitado, nos ângulos menores, pelas dimensões finitas do feixe primário e pela largura da janela do detetor e, nos ângulos maiores, pela razão sinal-ruído. Ou seja, teremos efeitos de terminação na transformada de Fourier que é definida em um intervalo infinito. A expressão final que relaciona a intensidade de espalhamento experimental com a função distribuição de distâncias é:

$$I_{\text{exp}}(h) = 8\pi \int_0^{\infty} dr \int_0^{\infty} d\lambda' \int_0^{\infty} dt \int_{-\infty}^{\infty} dx Q(x) P(t) W(\lambda') p(r) \frac{\text{sen } \beta}{\beta} + \varepsilon(h) \quad (35)$$

onde $\beta = r [(h - x)^2 + t^2]^{1/2} / \lambda'$ e $\varepsilon(h)$ é o erro estatístico devido ao uso de detetores (de cintilação ou proporcional).

I.5 - MÉTODO DA TRANSFORMADA INDIRECTA DE FOURIER

A discussão do item anterior nos dá uma idéia de como os dados de espalhamento podem sofrer aberrações durante o processo de sua obtenção. Para que possamos chegar à função distribuição de distâncias característica da partícula em estudo, precisamos corrigir estes dados, livrando-os dos efeitos instrumentais. Não podemos esquecer, também, de corrigi-los quanto à concentração da amostra e "background". Uma vez que tenhamos a intensidade de espalhamento da partícula, corrigida quanto a quaisquer distorções, precisamos nos preocupar com a obtenção da função $p(r)$. O intervalo limitado em que é medida a função de espalhamento dá origem, na transformada de Fourier, a efeitos de terminação que se apresentam através de fortes oscilações na função $p(r)$. Se os dados de espalhamento são suficientemente bons, é possível extrapolar a curva de intensidade no seu começo e no seu fim para ampliar o intervalo angular e diminuir os problemas com terminação.

Em nosso trabalho usamos o método de transformada indireta de Fourier proposto por Glatter [6,8,9,10,33,34] para a obtenção das funções $p(r)$ e $I(h)$ a partir da $I_{\text{exp}}(h)$. Através dele, é possível executar três processos em um só passo: alisamento das oscilações estatísticas ("smoothing"), correção das distorções ("desmearing") e transformada de Fourier. Sua única exigência é uma estimativa grosseira da distância máxima na partícula. Com esta informação, os efeitos de terminação inerentes à transformada de Fourier convencional são bastante reduzidos. Ao mesmo tempo, a aplicação do método fica restrita a sistemas diluídos e não periódicos.

O primeiro passo, portanto, para a solução da equação (35) é estimar uma distância D_{max} na partícula tal que

$$p(r) = 0 \quad \text{para} \quad r \geq D_{\text{max}}$$

para curvas de espalhamento extrapoladas à concentração zero.

Passamos a ter uma função $p(r)$, com extensão finita no espaço r , que é desenvolvida por um número infinito de funções periódicas definidas em todo espaço (equação (26)). Esta hipótese não parece ser muito favorável, pois o desenvolvimento de uma função de intervalo finito de definição por um sistema de funções definido em todo espaço leva a uma convergência ruim. Além disso, a avaliação de um número infinito de coeficientes da expansão a partir de informação restrita ($h_1 \leq h \leq h_2$) só é possível se for usada a condição $I(h) = 0$ para $h < h_1$ e $h > h_2$, que não é verdadeira. Tais problemas podem ser contornados se a função $p(r)$ for expandida em um sistema de funções com intervalo restrito de definição no espaço r e se for usado somente um número finito de coeficientes desta expansão. Também deve ser considerada a variação da precisão dos pontos $I(h_i)$ por uma técnica de mínimos quadrados no espaço recíproco [9].

Assim, a função $p(r)$ é aproximada por uma combinação linear de um número finito de funções p_j no intervalo

$$C(S_3) \leq C(f)$$

com igualdade somente se $f(x) \equiv S_3(x)$ ($S_3(x)$ representa a função spline cúbica).

A relação (37) corresponde à curvatura da função $f(x)$, se assumimos que $|f'(x)|^2 \ll 1$ [11]. Logo, este problema variacional fornecerá uma função solução com curvatura mínima na média satisfazendo o vínculo (38) que é equivalente a uma expressão de mínimos quadrados.

Considerando alguns teoremas de convergência e as características de alisamento e continuidade das funções splines cúbicas, pode-se esperar que a aproximação dos dados usando estas funções dê uma ótima estimativa da função contínua que representa a amostragem estatística (x_i, y_i) e também de suas derivadas de ordens 1 e 2, desde que seja adequadamente considerada a precisão dos dados experimentais [11].

Toda função spline natural de terceiro grau é univocamente representada por uma combinação linear de polinômios de grau 3 e uma função linear [11]:

$$S_3(x) = \sum_{j=1}^n C_j (x - x_j)_+^3 + C_{n+1} + C_{n+2} x \quad (39)$$

onde, por definição,

$$(x - x_j)_+^3 = \begin{cases} (x - x_j)^3 & \text{se } (x - x_j) \geq 0, \\ 0 & \text{se } (x - x_j) < 0. \end{cases}$$

Os coeficientes C_j da relação (39), com $j=1, 2, \dots, n$, tem que satisfazer as condições:

$$\sum_{j=1}^n C_j x_j^p = 0$$

para $p=0$ e $p=1$.

Na prática, a representação (39) não é muito útil na solução de problemas variacionais porque a matriz do sistema resultante de equações lineares que definem os coeficientes C_j , $j=1,2,\dots,n+2$, fica mal condicionada na maioria dos casos. Portanto, é usada a representação da função spline cúbica em funções splines B que têm suporte restrito definido em n nós. Um conjunto completo de splines B, que representa uma base para a classe de splines cúbicas naturais com nós $(1,2,\dots,10)$ é mostrado na Fig.I.20.

Em resumo, as funções $\phi_\nu(r)$ são funções polinomiais com suporte restrito; levam a curvas de aproximação com derivadas de ordem 2 minimizadas e foram introduzidas na avaliação de dados de espalhamento a baixo ângulo por Schelten e Hoßfeld [11]. Elas se superpõem só com as funções vizinhas, pois diferem de zero somente no intervalo de 4 nós [10]. As incógnitas em (36) são os coeficientes da expansão c_ν .

As funções ϕ_ν podem ser transformadas no espaço recíproco (transformada T_1 da Fig.I.3):

$$\psi_\nu(h) = T_1 \phi_\nu(r)$$

$$\psi_\nu = 4\pi \int_0^\infty \phi_\nu(r) \frac{\text{sen } hr}{hr} dr \quad (40)$$

e distorcidas quanto aos efeitos geométricos e de radiação policromática

$$\chi_\nu(h) = T_x T_t T_\lambda T_1 \phi_\nu(r) = T_x T_t T_\lambda \psi_\nu(h) \quad (41)$$

Depois da transformação (40), as funções (ψ_ν) representam as intensidades espalhadas sem efeitos, enquanto que as χ_ν representam as intensidades espalhadas distorcidas.

Os coeficientes são determinados através de um

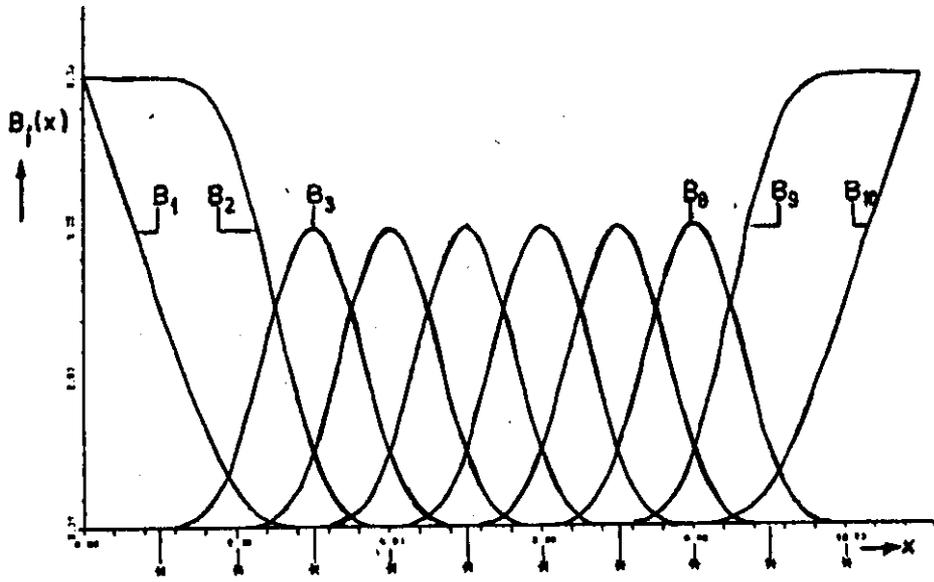


Figura I.20
 Conjunto de funções spline B [11].

ajuste por mínimos quadrados ponderados da soma $\sum c_\nu \chi_\nu(h)$ aos dados experimentais $I_{\text{exp}}(h)$:

$$L = \sum_{i=1}^M [I_{\text{exp}}(h_i) - \sum_{\nu=1}^N c_\nu \chi_\nu(h_i)]^2 / \sigma^2(h_i) = \text{MÍNIMO} \quad (42)$$

onde M é o número de pontos experimentais e $\sigma^2(h_i)$ é a variância do i -ésimo ponto. Este problema variacional tem solução somente se $M \geq N$. Para que L seja mínimo,

$$\frac{\partial L}{\partial c_\nu} = 0.$$

Assim:

$$\frac{\partial L}{\partial c_\nu} = \frac{\partial}{\partial c_\nu} \left[\sum_{i=1}^M W(h_i) (I_{\text{exp}} - \sum_{\nu=1}^N c_\nu \chi_\nu)^2 \right] = 0$$

onde $W(h_i) = 1/\sigma_i^2$.

$$\frac{\partial}{\partial c_\nu} \sum_{i=1}^M W(h_i) [I_{\text{exp}}^2 - 2I_{\text{exp}} \sum_{\nu=1}^N c_\nu \chi_\nu + \sum_{\nu=1}^N \sum_{\mu=1}^N c_\nu c_\mu \chi_\nu \chi_\mu] = 0$$

$$\sum_{i=1}^M W(h_i) [-2I_{\text{exp}} \sum_{\nu=1}^N \chi_\nu + 2 \sum_{\nu=1}^N \sum_{\mu=1}^N c_\mu \chi_\nu \chi_\mu] = 0$$

$$\sum_{\nu=1}^N \sum_{\mu=1}^N \sum_{i=1}^M W(h_i) c_\mu \chi_\nu(h_i) \chi_\mu(h_i) = \sum_{\nu=1}^N \sum_{i=1}^M W(h_i) I_{\text{exp}}(h_i) \chi_\nu(h_i)$$

$$\sum_{\mu=1}^N \sum_{i=1}^M W(h_i) c_\mu \chi_\mu(h_i) \chi_\nu(h_i) = \sum_{i=1}^M W(h_i) I_{\text{exp}}(h_i) \chi_\nu(h_i)$$

para $\nu = 1, 2, \dots, N$

Fazendo

$$B_{\nu\mu} = \sum_{i=1}^M W(h_i) \chi_{\nu}(h_i) \chi_{\mu}(h_i)$$

e

$$d_{\nu} = \sum_{i=1}^M W(h_i) I_{\text{exp}}(h_i) \chi_{\nu}(h_i) ,$$

obtemos as equações normais:

$$\sum_{\mu=1}^N c_{\mu} B_{\nu\mu} = d_{\nu} , \quad \nu = 1, 2, \dots, N$$

$$B_{\nu\mu} c_{\mu} = d_{\nu} , \quad \nu, \mu = 1, 2, \dots, N . \quad (43)$$

As equações normais determinam os coeficientes c_{ν} .

Um aumento no número N de funções $\varphi_{\nu}(r)$ leva a um ponto em que a solução $p_A(r)$ (equação (38)) começa a oscilar em torno da função real. O ruído estatístico dos dados de espalhamento também contribui para a instabilidade numérica. Um decréscimo de N resolveria este problema, mas surgiria outro - o de representação insuficiente de $p(r)$.

Como N não pode ser escolhido muito pequeno, para garantir uma descrição suficientemente exata de $p(r)$, e como os pontos experimentais sempre tem erros estatísticos, normalmente surgem problemas de estabilidade na solução de (43).

Uma rotina de estabilização deve suprimir as oscilações artificiais sem essencialmente alterar a solução. Tais rotinas podem ser matematicamente expressadas através de um vínculo ao problema variacional descrito pela relação (42). A

conexão é dada pelo multiplicador de Lagrange λ . Este multiplicador estabelece o peso do vínculo em relação ao problema variacional, servindo como um parâmetro de estabilização.

Assim, vamos ter, em relação à condição de minimização de L , o vínculo G ligado através do multiplicador de Lagrange:

$$L + \lambda G = \text{MÍNIMO} \quad (44)$$

ou

$$\frac{\partial}{\partial c_\nu} (L + \lambda G) = 0 \quad (45)$$

Há 2 possibilidades para G . Se considerarmos que os c_ν constituem o vetor solução de um sistema instável, vamos ter um forte aumento da norma deste vetor devido às oscilações artificiais [8]. Portanto, a primeira possibilidade seria a minimização da norma N_c

$$N_c = \sum_{\nu=1}^N c_\nu^2 = \text{MÍNIMO} . \quad (46)$$

Além disso, a diferença entre componentes vizinhos (1ª derivada) se torna muito grande [9]. A segunda possibilidade seria a minimização da norma da 1ª derivada $N_{c'}$:

$$N_{c'} = \sum_{\nu=1}^N (c_{\nu+1} - c_\nu)^2 = \text{MÍNIMO} . \quad (47)$$

Logo, para $G = N_c$, a equação (43) muda para

$$(B_{\nu\mu} + \Lambda \delta_{\nu\mu}) c_\mu = d_\nu, \quad \nu, \mu = 1, 2, \dots, N \quad (48)$$

com

$$\delta_{\nu\mu} = \begin{cases} 0 & \text{para } \nu \neq \mu \\ 1 & \text{para } \nu = \mu. \end{cases}$$

Com esta condição, o efeito de estabilização é bom, mas a influência na solução não é desprezível [9]. Por esta razão, é feita a opção pela segunda condição, $G = N_c$, que nos dá as equações normais

$$(B_{\nu\mu} + \Lambda K_{\nu\mu}) c_\mu = d_\nu, \quad \nu, \mu = 1, 2, \dots, N \quad (49)$$

com

$$K = \begin{bmatrix} 1 & -1 & & & & & & & & \\ -1 & 2 & -1 & & & & & & & 0 \\ & -1 & 2 & -1 & & & & & & \\ & & & & \ddots & & & & & \\ & & & & & & -1 & 2 & -1 & \\ & 0 & & & & & & & -1 & 1 \end{bmatrix}.$$

Por fim, falta estabelecer critérios para a escolha do Λ ótimo. A precisão da aproximação de acordo com a equação

$$DMP = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M [I_{exp}(h_i) - \sum_{\nu=1}^N c_\nu \chi_\nu(h_i)]^2 / \sigma^2(h_i), \quad (50)$$

onde DMP é o desvio médio por ponto, constitui um critério

importante. Se há um aumento de DMP causado por um aumento de Λ , é evidente que a estabilização reduz a qualidade da solução. Conforme vemos na Fig.I.21, DMP é constante em um grande intervalo de Λ . É necessário, portanto, ter um critério adicional. Podemos ver na Fig.I.21 a influência de Λ em $N_{c'}$. A função $\log N_{c'}(\Lambda)$ é instável para baixos valores de Λ e apresenta um ponto de inflexão na região anterior a um forte aumento do desvio médio. Este é o ponto em que o valor absoluto da primeira derivada tem um mínimo e corresponde ao valor ótimo de Λ com estabilização suficiente e influência desprezível na qualidade da aproximação. Este é o chamado método do ponto de inflexão para a determinação de Λ_{ot} . O valor de Λ é determinado separadamente para cada problema por tentativa e erro. A equação (49) é resolvida para vários valores de Λ , conforme vemos na Fig.I.21.

Os coeficientes c_ν , resultantes de (49) usando o valor Λ_{ot} , definem a solução no espaço real de acordo com eq.(36) e a curva de aproximação aos pontos experimentais, dada por:

$$\bar{I}_A(h) = \sum_{\nu=1}^N c_\nu \chi_\nu(h) . \quad (51)$$

A curva de espalhamento, livre de aberrações, é definida pela equação:

$$I_A(h) = \sum_{\nu=1}^N c_\nu \psi_\nu(h) . \quad (52)$$

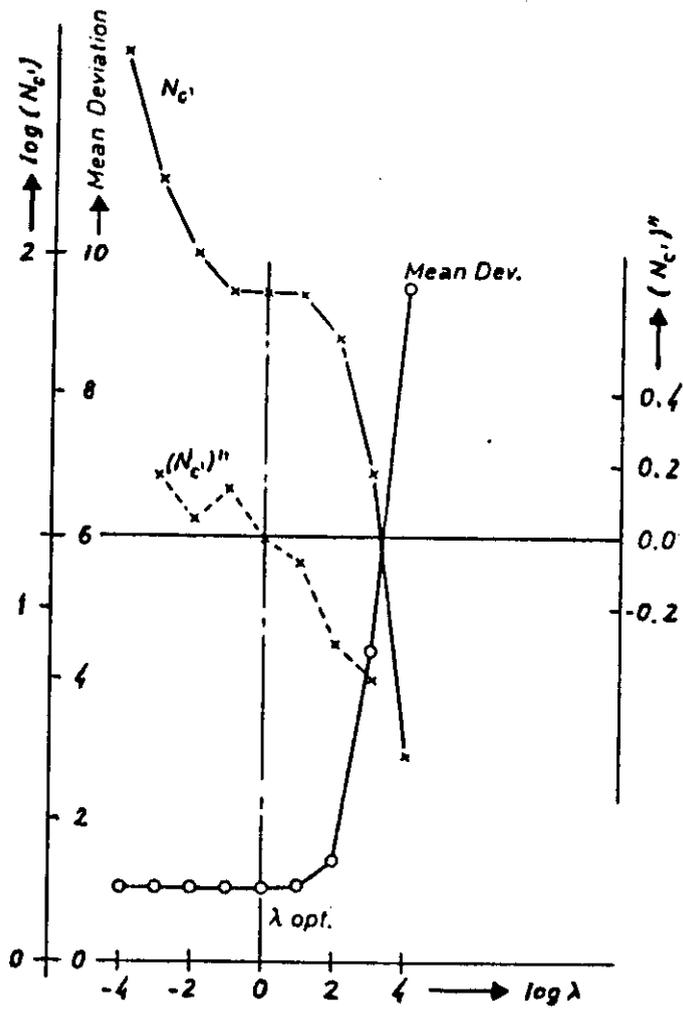
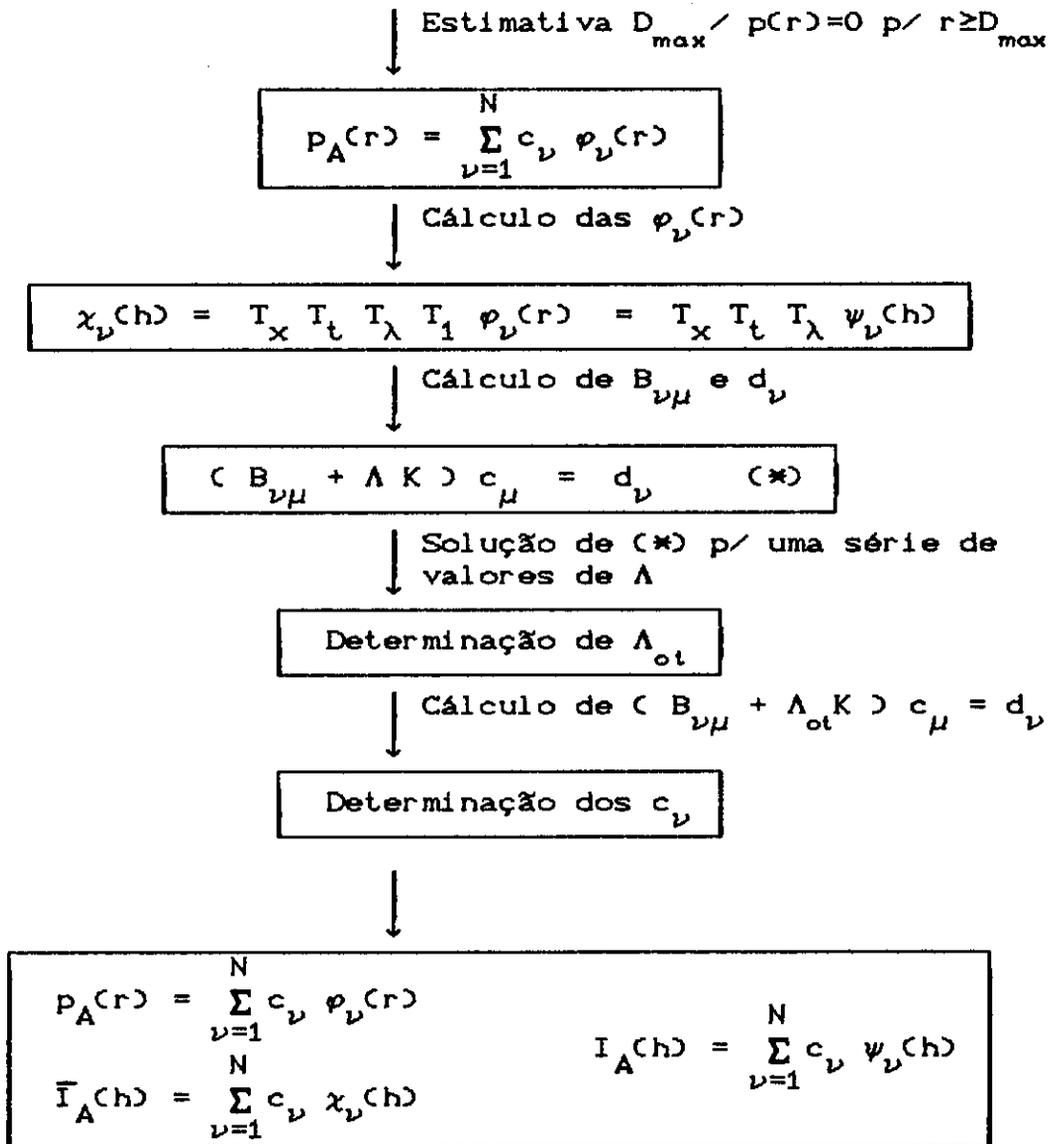


Figura I. 21
Método do ponto de inflexão [10].

Podemos organizar os passos mais importantes para a solução da expressão (35) no seguinte esquema:



É possível, ainda, calcular o raio de giro usando $p_A(r)$ na equação (27):

$$R_{GA}^2 = \frac{\int_0^{D_{max}} p_A(r) r^2 dr}{2 \int_0^{D_{max}} p_A(r) dr} \quad (53)$$

Esta aproximação tem a vantagem de R_{GA} ser calculado a partir dos dados experimentais usando a curva de espalhamento completa.

De modo análogo, podemos obter um valor aproximado para a intensidade no ângulo zero usando $p_A(r)$ na equação (28):

$$I_A(0) = 4\pi \int_0^{D_{max}} p_A(r) dr \quad (54)$$

I.6- FUNÇÃO DE ESPALHAMENTO, FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO DE DISTANCIAS E MODELOS

A comparação de valores experimentais com funções calculadas a partir de modelos propostos é muito importante e bastante usada na interpretação de dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo.

Esferas e corpos triaxiais simples (prismas, elipsóides e cilindros) podem ser usados como modelos. Suas funções são calculáveis analítica ou semianaliticamente [5,7]. Entretanto, muitas moléculas ou partículas não podem ser aproximadas por corpos simples. Neste caso, torna-se necessário o uso do método de elementos finitos. Tal método consiste na composição de um modelo por um número finito de elementos homogêneos que podem ou não ter diferentes valores de densidade eletrônica [5,7]. Além disso, obviamente, eles precisam ser menores que os detalhes estruturais interessantes do modelo.

Normalmente são usados o cubo ou a esfera como formas elementares.

O método do cubo é utilizado, principalmente, no cálculo de intensidades de espalhamento de macromoléculas em solução que tenham uma estrutura cristalina conhecida [5,7].

Em nosso trabalho, utilizamos o da esfera. Suas principais vantagens são: (i) a precisão dos cálculos não depende da estrutura do modelo (ser alongado ou não); (ii) a determinação das funções de espalhamento e distribuição de distâncias para um agregado de esferas é feita precisamente por equações analíticas. O inconveniente de não se poder preencher um determinado volume homogeneamente com esferas é contornado escolhendo seus diâmetros, independentemente de sua distância com os vizinhos mais próximos, de modo que a soma dos volumes de todos elementos represente exatamente o volume do modelo (há uma ligeira superposição entre esferas adjacentes).

I.8.1 - MÉTODO DA ESFERA

Conforme já vimos, este método consiste em compor um modelo para a molécula ou partícula usando um grande número de esferas suficientemente pequenas, de igual tamanho, e, se necessário, pesos diferentes. A intensidade de espalhamento de um agregado de n esferas é calculada pela fórmula de Debye (expressão (5)):

$$I(h) = \sum_{i=1}^n g_i^2 \phi_i^2(h) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n g_i g_k \phi_i(h) \phi_k(h) \frac{\text{sen } d_{ik} h}{d_{ik} h} \quad (54)$$

onde d_{ik} é a distância entre os centros das esferas i e k e $g_i \phi_i(h) = f_i$.

O fator peso da i -ésima esfera (g_i) é definido por

$$g_1 = \rho_1 V_1 = \rho_1 \frac{4}{3} \pi R_1^3$$

onde ρ_1 , V_1 e R_1 são a densidade eletrônica, o volume e o raio desta esfera, respectivamente.

O fator de forma $\phi_1(h)$ é calculado pela expressão

$$\phi_1(h) = 3 \frac{\text{sen}(R_1 h) - R_1 h \cos(R_1 h)}{(R_1 h)^3}.$$

O. Glatter [12] propõe uma equação análoga à de Debye (54) para o cálculo da função distribuição de distâncias:

$$p(r) = \sum_{i=1}^n \rho_i^2 p_o(r, R_i) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n \rho_i \rho_k \bar{p}(r, d_{ik}, R_i, R_k) \quad (55)$$

onde $p_o(r, R_i)$ é a função distribuição de distâncias de uma esfera com raio R_i e densidade eletrônica igual a um. A segunda parte da expressão corresponde ao termo cruzado entre as esferas i e k (raios R_i e R_k) separadas de uma distância d_{ik} . As expressões para $p_o(r, R_i)$ e $\bar{p}(r, d_{ik}, R_i, R_k)$ foram obtidas por Glatter [6] através do cálculo dos volumes de superposição entre as esferas e seus "fantasmas" deslocados de distâncias conhecidas.

Podemos reescrever a equação (54), considerando esferas idênticas, como [13]

$$I(h) = g_1^2 \phi_1^2 \left(n + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n \frac{\text{sen} h d_{ik}}{h d_{ik}} \right). \quad (56)$$

Se fazemos

$$F_u = \phi_1^2(h)$$

e

$$I_g = n + 2 \sum_i \sum_k \frac{\sin hd_{ik}}{hd_{ik}} .$$

obtemos

$$I(h) = g_1^2 F_u I_g .$$

A intensidade de espalhamento aparece como um produto do termo de interferência I_g com a intensidade de espalhamento F_u de uma única esfera. O primeiro (I_g) determina o comportamento em baixos valores de h e o último (F_u), principalmente, nos valores maiores [13].

As esferas podem ser agregadas formando subunidades quase esféricas maiores que podemos arranjar para compor o modelo da molécula. Desse modo, vamos ter, na intensidade de espalhamento, termos de interferência correspondentes ao arranjo destas subunidades na molécula somados ao correspondente ao arranjo dos elementos. Por isto, na análise das curvas de intensidade calculadas, é preciso sempre considerar as dimensões envolvidas do modelo para se inferir quais tem efeito dominante num determinado intervalo.

A função F_u tem zeros em determinados valores de h [13]. Se os elementos ou as subunidades diferem um pouco de uma esfera, F_u passa a ter mínimos e não mais zeros.

II. HEMOGLOBINAS EXTRACELULARES

Hemoglobinas são proteínas respiratórias que contém grupos heme [14]. Tais grupos são constituídos por uma parte orgânica (protoporfirina IX) e um átomo de ferro [15]. Conforme vemos na Fig.II.1, o Fe fica no centro do anel tetrapirrólico da protoporfirina, fazendo ligações com os 4 átomos de nitrogênio. É a ele que vai se ligar reversivelmente o oxigênio.

As hemeproteínas podem ser intra- ou extracelulares. As primeiras são normalmente moléculas pequenas, com massa molecular menor que 70000. São encontradas, por exemplo, nos vertebrados, onde se apresentam invariavelmente na forma tetramérica, com 4 grupos heme e massa molecular da ordem de 64500 (Fig.II.2). As extracelulares, também chamadas de eritrocruorinas, são encontradas nos invertebrados e podem ser classificadas em 4 grupos distintos de acordo com suas estruturas de subunidades [16,17]. Nesta classificação, que veremos a seguir, o termo domínio é utilizado para definir uma cadeia polipeptídica, ou um fragmento de cadeia, que possui uma massa molecular de 16000, contém heme e se liga reversivelmente a oxigênio [16].

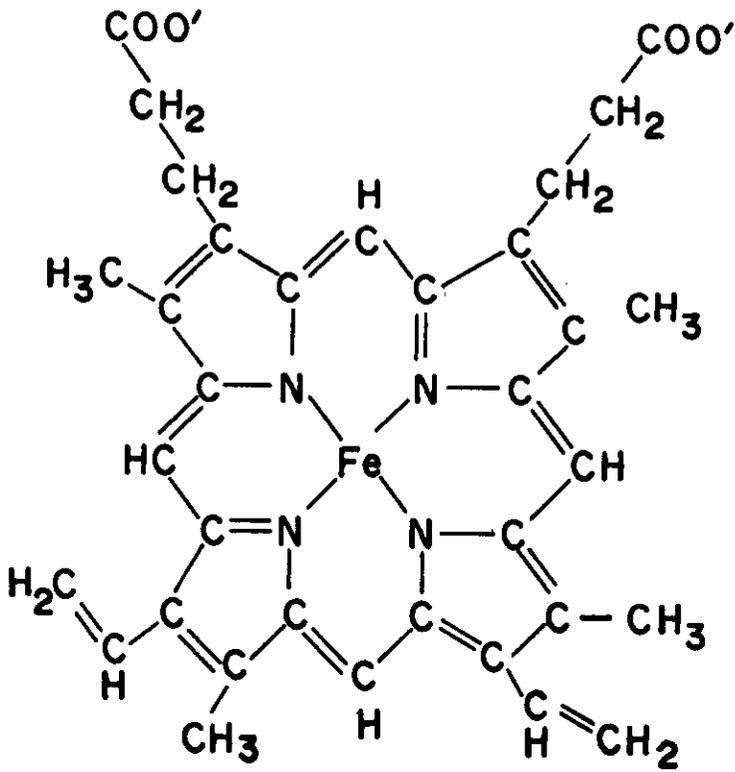
(i) Hemoglobinas que tem uma subunidade com um domínio: proteínas com uma cadeia polipeptídica (portanto, são monoméricas) contendo um grupo heme. Tem peso molecular de aproximadamente 16000 Da.

O termo subunidade se refere, aqui, aos produtos obtidos na dissociação da proteína. Pode ser uma cadeia polipeptídica ou um agregado de cadeias.

(ii) Hemoglobinas que tem várias subunidades com vários domínios.

(iii) Hemoglobinas que tem várias subunidades com 2 domínios cada.

(iv) Hemoglobinas que tem várias subunidades com um único domínio cada: agregados formados por diversas subunidades pequenas, muitas das quais estão unidas por pontes dissulfeto e nem todas

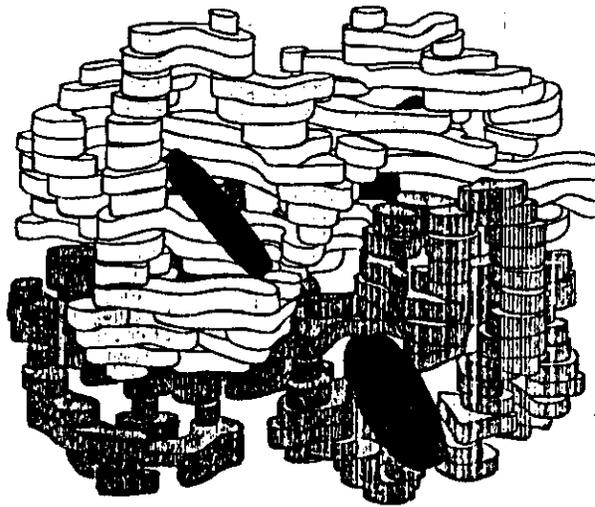


Grupo Heme
 (Fe - protoporfirina IX)

Figura II.1



VISTA SUPERIOR



VISTA LATERAL

Figura II.2
Hemoglobina de vertebrados [34].

possuem grupo heme. Caracterizam-se por uma aparência de 2 camadas hexagonalmente simétricas.

Em nosso trabalho, estudamos moléculas que fazem parte do último grupo e, a partir deste ponto, vamos tratar exclusivamente de suas características gerais. São proteínas encontradas extensivamente em 3 classes de anelídeos (Poliqueta, Oligoqueta e Hirundínea) e nos pogonóforos [16]. Distinguem-se pela elevada massa molecular que varia entre 2300 e 4000 kDa [14,16]. Estudos mais recentes, principalmente por espalhamento de raios X a baixo ângulo, tendem a restringir este intervalo para 3500 a 4000 kDa [16,19,36].

Tais hemoglobinas, quando observadas com microscópio eletrônico, são muito similares [14,16,17,37,38,39]. Todas tem a forma de 2 discos hexagonais sobrepostos, cada um composto de 6 unidades menores (subunidade 1/12 ou principal), conforme podemos ver na Fig.II.3. O que chamamos de subunidade 1/12 ou principal pode ser formada por uma ou mais das subunidades definidas anteriormente na classificação de eritrocruorinas. Em algumas moléculas parece ser observada ou deduzida a presença de densidade proteica na cavidade central, considerada como uma 13^a subunidade [14,16,18,19,20]. Além de uniformidade na aparência, existe uma grande similaridade nas dimensões obtidas por microscopia eletrônica, tais como [16]:

- distância vértice-vértice: 240Å a 270Å;
- altura: 150Å a 180Å.

No entanto, apesar da semelhança na estrutura quaternária, existem diferenças nos tipos de cadeias polipeptídicas presentes nas moléculas [14]. Também há uma grande variação no número e tamanho de subunidades destas hemoproteínas. Os valores obtidos para a massa da subunidade principal ou 1/12, por exemplo, variam de 160 kDa a 350 kDa dependendo da espécie [14], o que parece ser uma indicação de diversidade nas subunidades que a formam. Muitos estudos mostram que existem

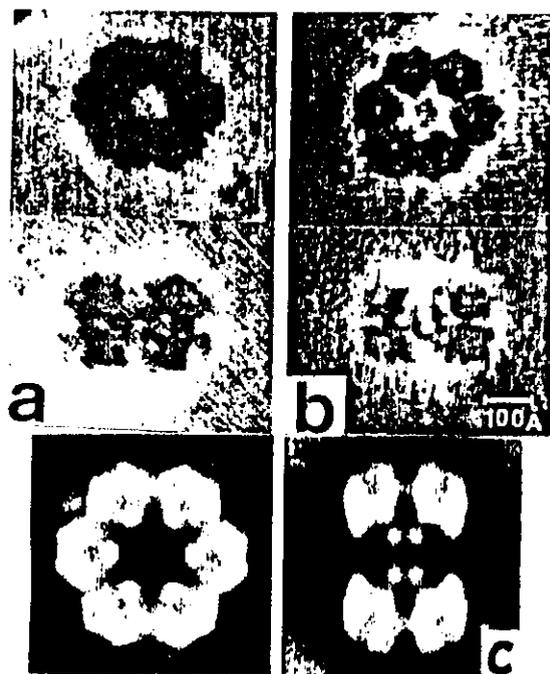


Figura II.3

(a) Eritrocruorina de *L. terrestris* [18].

(b) Eritrocruorina de *N. incisa* [18].

(c) Eritrocruorina de *L. terrestris* [17].

subunidades que consistem de mais de um tipo de cadeia [14].

As hemoglobinas de vertebrados têm conteúdos de heme e ferro de 4% e 0,35%, respectivamente. Nas eritrocruorinas dos anelídeos, as porcentagens são geralmente mais baixas: 2,0 a 3,5% para heme e 0,2 a 0,3% para ferro. Estas proteínas são as únicas, em relação aos outros 3 tipos de hemoglobinas extracelulares de invertebrados mencionados anteriormente, a possuir um número de cadeias polipeptídicas maior que o número de grupos heme [16]. A massa de heme proteína que contém um mol de heme, chamada de peso molecular mínimo, varia entre 20000 e 30000 [14].

Estas moléculas exibem grandes diferenças entre espécies quanto ao comportamento funcional no que diz respeito a afinidade por oxigênio, cooperatividade (interações heme-heme) e a presença e intensidade de um efeito Bohr [14]. A afinidade é medida por P_{50} (a pressão parcial de oxigênio correspondente a 50% de saturação). O efeito Bohr é a sensibilidade da afinidade ao pH.

Neste trabalho, estudamos especificamente a hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*, um anelídeo gigante que vive superficialmente no solo em regiões calcáreas do estado de São Paulo. Foi determinado para esta eritrocruorina uma massa molecular de $3,23 \times 10^6$ e um peso molecular mínimo de 25250 Da [21,44]. A molécula possui, portanto, em torno de 128 grupos heme. Sua arquitetura, vista por microscopia eletrônica, é semelhante a das outras eritrocruorinas (Fig.II.4)[21].

Temos, em resumo, moléculas com estrutura quaternária, dimensões, massa molecular e baixo conteúdo relativo de heme muito similares que, no entanto, apresentam propriedades funcionais bastante diversas (afinidade por oxigênio, cooperatividade, etc.). A idéia é explicar essa diversidade funcional através de variação estrutural. Há muita discordância quanto à composição da subunidade principal ou 1/12. Os modelos

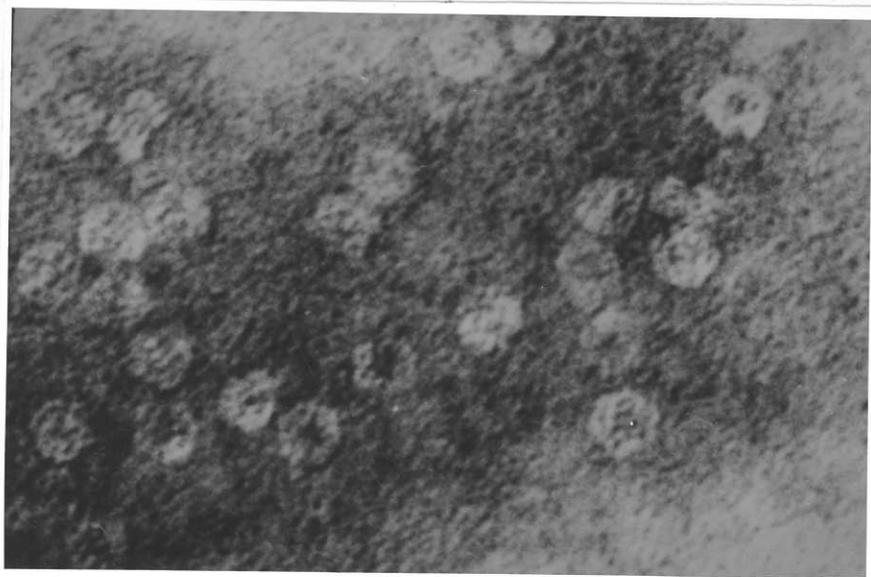


Figura II.4 estrutura terciária da Eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* [21].

propostos normalmente se baseiam em dados de microscopia eletrônica, massas moleculares das proteínas e dos fragmentos obtidos na sua dissociação, além das quantidades e tipos de cadeias polipeptídicas presentes [17,20,22,40,41,42,43] .

Podemos citar, por exemplo, o estudo da eritrocruorina do anelídeo *O. bicornis* [20]. A sua dissociação em diferentes meios forneceu fragmentos com 60, 30 e 15 KDa, que foram chamados de subunidades A, B e C, respectivamente. Com a redução da molécula, foram obtidos três tipos de cadeias polipeptídicas (14, 15 e 16.5 KDa). Os estudos indicaram que as subunidades A e B eram formadas por cadeias de 15 KDa ligadas por pontes dissulfeto. Com base nas concentrações relativas de subunidades A, B e C na molécula não reduzida, foi proposto um modelo para a subunidade 1/12 formado por duas subunidades A, uma B e duas C. Conforme podemos notar, o método consiste em ver como as cadeias polipeptídicas compõem os fragmentos de dissociação (subunidades A, B e C) e como estes, por sua vez, podem se associar para formar a subunidade 1/12 visível por microscopia eletrônica.

Outra hemoglobina bastante estudada é a do anelídeo *L. terrestris*. Vinogradov et al. [17] obtiveram 4 fragmentos diferentes por eletroforese: um monomérico M (16,75 KDa), D1 (31 KDa), D2 (37 KDa) e um trímero T (50 KDa). Na redução da proteína, encontraram os seguinte tipos de cadeias polipeptídicas: cadeia I (fragmento M); cadeias II, III e IV (constituem o trímero T); cadeia V (fragmento D1); e cadeia VI (fragmento D2). Baseados nestas informações e nos estudos por microscopia eletrônica, os autores propuseram um modelo para a estrutura quaternária da hemoglobina em que era assumido que as frações D1 e D2 atuavam como ligantes entre complexos de fragmentos M e T ou formavam um "bracelete" decorado com 12 complexos de frações M e T.

Fushitani e Riggs [22] fizeram uma nova determinação do conteúdo de heme para *L. terrestris* e chegaram à

conclusão de que cada subunidade 1/12 deveria ter 4 unidades formadas pelas cadeias abcd (IV, II, III e I na notação de Vinogradov et al.[17]). Concluíram que todas estas cadeias deveriam conter um grupo heme, num total de 192 para a molécula contra os 156 obtidos por outros autores [17,23]. Concluíram, também, que a cada subunidade 1/12 deveria corresponder 32,5 KDa de proteína sem grupo heme. Sugeriram, portanto, que as subunidades com 31 a 37 KDa (D1 e D2 no exemplo anterior) estariam presentes na proporção de uma para cada subunidade 1/12. Logo, estas 12 subunidades principais poderiam não ser idênticas.

Em resumo, podemos ver que os modelos propostos dependem muito de como e que informações foram obtidas e são inconclusivos com relação à distribuição espacial das subunidades envolvidas. Neste ponto, podemos perceber como é poderosa a técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo. Conforme vimos no capítulo 1, ela nos possibilita justamente propor um modelo para a estrutura quaternária da proteína que é estudada em solução, em condições muito próximas a forma nativa. Dessa forma, é possível complementar dados obtidos por outros métodos procurando compreender a função biológica da molécula em estudo através do conhecimento de sua estrutura tridimensional.

III. EXPERIMENTAL

A hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* foi obtida de anelídeos vivos, no Instituto de Biologia da UNICAMP, através dos métodos descritos em [24]. As amostras estudadas foram preparadas com solução tampão Tris-HCl 0,05M (pH 7,5) e 1mM EDTA.

Na obtenção de dados de espalhamento a baixo ângulo, usamos 2 fontes de raios X: um gerador convencional de ânodo rotatório e radiação síncrotron (DCI, LURE, Orsay, França).

III.1 - OBTENÇÃO DE DADOS NO GERADOR CONVENCIONAL DE RAIOS X

III.1.1 - AMOSTRAS

Iniciamos nossas experiências com uma solução de hemoglobina com concentração $c=132,8$ mg/ml. Tal valor foi obtido multiplicando o peso molecular mínimo da hemoproteína (25250 Da) pela concentração de heme da amostra (5,26 mM) que foi determinada espectrofotometricamente usando o método piridina-hemecromogênio [21]. A amostra inicial foi, então, diluída de modo a se obter uma série de soluções com concentrações $c/2$, $c/4$, $c/8$ e $c/16$.

III.1.2 - MONTAGEM EXPERIMENTAL

Trabalhamos com um gerador de ânodo rotatório Rigaku RU-200 com alvo de cobre e filamento de $0,5 \times 10 \text{mm}^2$. Para colimação do feixe incidente, usamos um sistema de fendas tipo Kratky [25], com fenda inicial de $70 \mu\text{m}$, colocado num ângulo de *take off* de 8° . Para monocromatização e detecção do feixe espalhado, utilizamos um monocromador plano de grafite antes de um detetor de cintilação ligado a um analisador de pulso. Na

Fig.III.1, temos um esquema da montagem utilizada. O feixe gerado em 1 é colimado em 2, atinge a amostra em 3 e é espalhado. A radiação espalhada atravessa, então, um caminho de vácuo, 5, que tem a finalidade de atenuar a absorção e o espalhamento pelo ar. Alcança o monocromador de grafite, 8, que está orientado para difratar a linha $K\alpha$ do cobre, e chega, finalmente, no detetor de cintilação, 9. Temos uma fenda de $0,1 \times 10 \text{mm}^2$ antes do monocromador e outra de $0,8 \times 10 \text{mm}^2$ antes do detetor.

III.1.3 - CONDIÇÕES DE MEDIDA

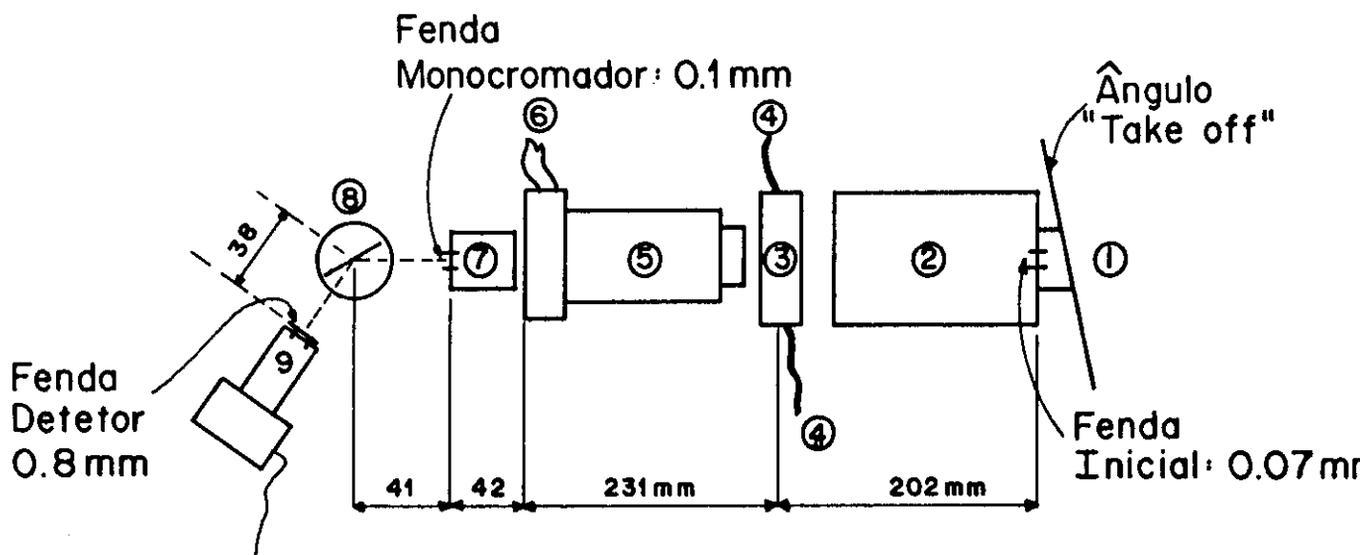
Todas as curvas de espalhamento foram obtidas com o gerador operando em 50KV e 100mA.

As intensidades espalhadas foram medidas por varredura entre $2\theta=0,08^\circ$ ($h=0,0114 \text{ \AA}^{-1}$) e $2\theta=1,00^\circ$ ($h=0,1422 \text{ \AA}^{-1}$) com passos de $0,02^\circ$. O tempo de contagem em cada ponto foi de 400seg.

Fizemos 4 varreduras de cada concentração e 6 varreduras da solução tampão. Nos cálculos foram usadas as respectivas médias.

Determinamos os perfis de largura e comprimento de fenda necessários na análise dos dados (ver eqs.(32) e (33) do cap.1). Para tal, colocamos um filme logo após a fenda do detetor e obtivemos o perfil do feixe direto em comprimento e largura. Também fizemos uma varredura do feixe na direção da largura.

Utilizamos porta-amostras planos com 1,5mm de espessura e janelas de mylar. Durante as exposições, eles foram mantidos a temperatura de 4 a 6°C para evitar degradação da amostra.



- 1 GERADOR DE RAIOS X
- 2 SISTEMA KRATKY DE COLIMAÇÃO
- 3 SUPORTE PARA PORTA-AMOSTRA, REFRIGERADO A ÁGUA
- 4 CIRCULAÇÃO DE ÁGUA REFRIGERADA
- 5 CAMINHO DE VÁCUO
- 6 CONEXÃO PARA A BOMBA DE VÁCUO
- 7 SUPORTE PARA A FENDA DO MONOCROMADOR
- 8 MONOCROMADOR DE GRAFITE
- 9 DETETOR DE CINTILAÇÃO

Figura III.1

III.2 - OBTENÇÃO DE DADOS COM RADIAÇÃO SINCROTRON

Os dados foram coletados na estação experimental D.24 do anel DCI no LURE (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique), Orsay, França.

III.2.1 - AMOSTRAS

A concentração de heme da solução inicial (E_0) foi medida 2 vezes por absorbância. Primeiro, foi usado o método piridina-hemecromogênio, citado no item III.1.1, obtendo-se 3,33mM que corresponde a $c_0 = 84,1$ mg/ml. A segunda vez, usando reativo de Drabkin, foi obtido 3,46mM ($c_0 = 87,4$ mg/ml). A partir desta amostra, foram feitas as seguintes diluições usando solução tampão Tris: .

- (i) $E_8 = 1$ volume de $E_0 + 9$ volumes de tampão 0,05M ($c_8 = c_0/10$)
- (ii) $E_4 =$ volumes iguais de E_8 e tampão 0,05M ($c_4 = c_0/20$)
- (iii) $E_2 =$ volumes iguais de E_4 e tampão 0,05M ($c_2 = c_0/40$)
- (iv) $E_6 = 2$ volumes de $E_8 + 1$ volume de tampão
- (v) $E_{4.} =$ volumes iguais de E_8 e tampão 0,5M.

Os valores obtidos para concentração das diluições (usando reativo de Drabkin) foram 8,99mg/ml, 3,85mg/ml e 1,92mg/ml para as amostras E_8 , E_4 e E_2 , respectivamente.

III.2.2 - MONTAGEM EXPERIMENTAL

A montagem utilizada pode ser vista na Fig.III.2.

O feixe que sai do anel é linear e horizontal, praticamente sem divergência na vertical. Com o monocromador assimétrico de cristal de Ge(111) foi selecionado o comprimento de onda 1,6Å. A assimetria do cristal tem a finalidade de aumentar o número de fótons por unidade de área [26]. O monocromador é

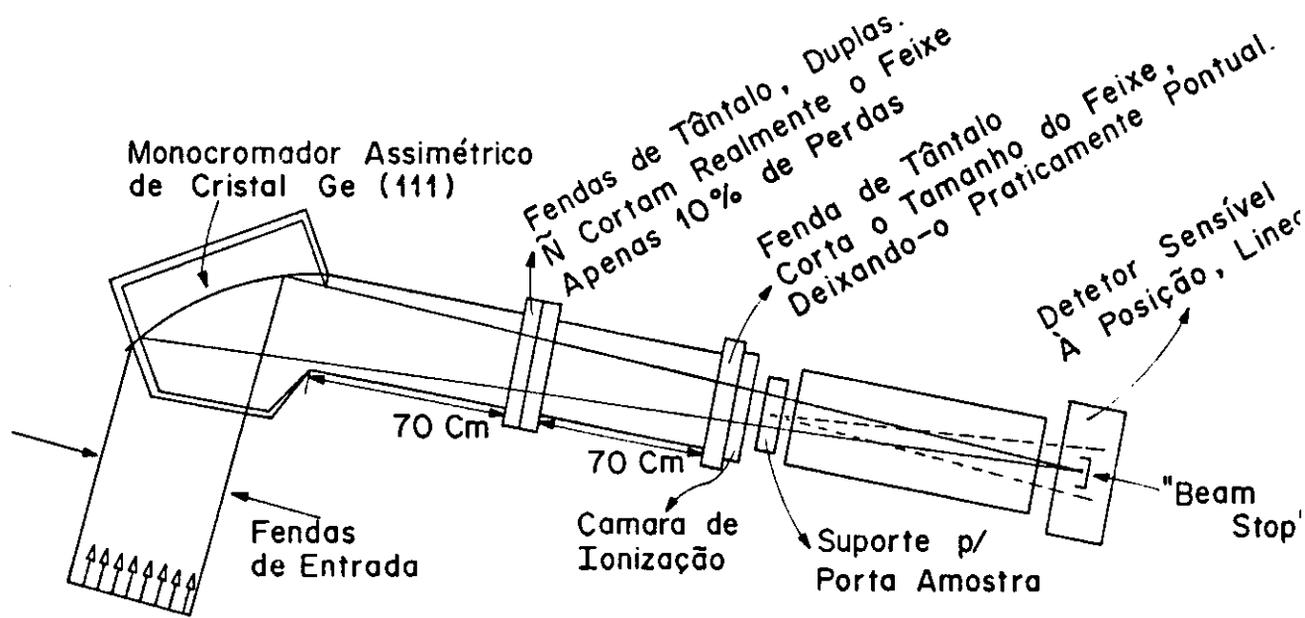


Figura III.2

curvado para focalizar o feixe na horizontal, deixando-o com as dimensões $3,0 \times 0,6 \text{ mm}^2$. A colimação pontual é obtida com as fendas de tântalo, que servem também para reduzir o espalhamento parasita produzido no monocromador [26]. A câmara de ionização é usada para alinhamento do feixe e das fendas. A amostra é colocada em um capilar plano na horizontal. O detetor sensível à posição, linear, é posicionado na vertical para evitar o espalhamento parasita na direção horizontal. As medidas obtidas são transferidas por um sistema de aquisição de dados a um computador VAX 730.

III.2.3 - CONDIÇÕES DE MEDIDA

A curva de espalhamento da solução mais concentrada foi obtida com uma distância amostra-detetor de 0,5m. Os intervalos de medida Δh foram de $0,00166 \text{ \AA}^{-1}$. A curva foi medida 20 vezes e, a cada vez, o tempo de contagem foi de 100seg. Para a curva da solução tampão foram feitas 10 medidas de 800seg cada. Os pontos inicial e final para estas curvas foram $h_1 = 0,02324 \text{ \AA}^{-1}$ e $h_2 = 0,23074 \text{ \AA}^{-1}$, respectivamente.

As curvas correspondentes às soluções diluídas foram todas obtidas com uma distância amostra-detetor de 2m, que corresponde a um Δh de $0,00041 \text{ \AA}^{-1}$. Elas foram medidas 2 vezes com tempo de 200seg cada. A solução tampão foi medida 8 vezes durante 400seg. Os valores para h_1 e h_2 para as curvas foram $0,01286 \text{ \AA}^{-1}$ e $0,02322 \text{ \AA}^{-1}$, respectivamente. As intensidades foram colocadas em uma escala absoluta através da comparação com o espalhamento de uma amostra de carbono vítreo, previamente calibrada, posicionada antes da amostra. Depois da obtenção de seu espalhamento, o carbono era removido para se medir a curva da solução em estudo.

IV. RESULTADOS E ANÁLISE

IV.1 - RESULTADOS OBTIDOS COM GERADOR CONVENCIONAL

A Fig.IV.1 mostra as curvas de espalhamento resultantes de várias varreduras para cada concentração, após a subtração do espalhamento devido à solução tampão (também obtido como média de várias varreduras). Podemos observar uma marcada curvatura na parte inicial da curva correspondente à amostra mais concentrada ($c = 132,8$ mg/ml). Esse efeito é característico da interação interpartículas. Notamos, também, que as curvas são muito pouco estruturadas. Apresentam somente o máximo principal cuja intensidade cai rapidamente e se mantém mais ou menos constante em um valor relativamente baixo. O não aparecimento de máximos secundários se deve à baixa contagem obtida especialmente nas varreduras das amostras mais diluídas de proteína. Conforme vimos no capítulo 1, máximos e mínimos nas curvas de espalhamento são uma consequência da existência de subunidades na proteína. A não obtenção destes, devido à baixa intensidade espalhada, diminui a resolução dos cálculos e limita as conclusões que podem ser obtidas com relação à estrutura quaternária da molécula. Os resultados permitem, entretanto, fazer uma análise dimensional da proteína.

Os gráficos de Guinier referentes às diferentes concentrações podem ser vistos na Fig.IV.2. Na tabela I, temos os valores de raio de giro correspondentes.

A extrapolação de R_g para concentração zero, vista na Fig.IV.3. forneceu o valor de 114 ± 9 Å [45].

Com o intuito de eliminar erros na subtração do espalhamento do solvente, todos os cálculos foram repetidos usando a curva de espalhamento da solução tampão ajustada por um polinômio de grau 5. Não houve, entretanto, uma diferença significativa em relação aos resultados já obtidos.

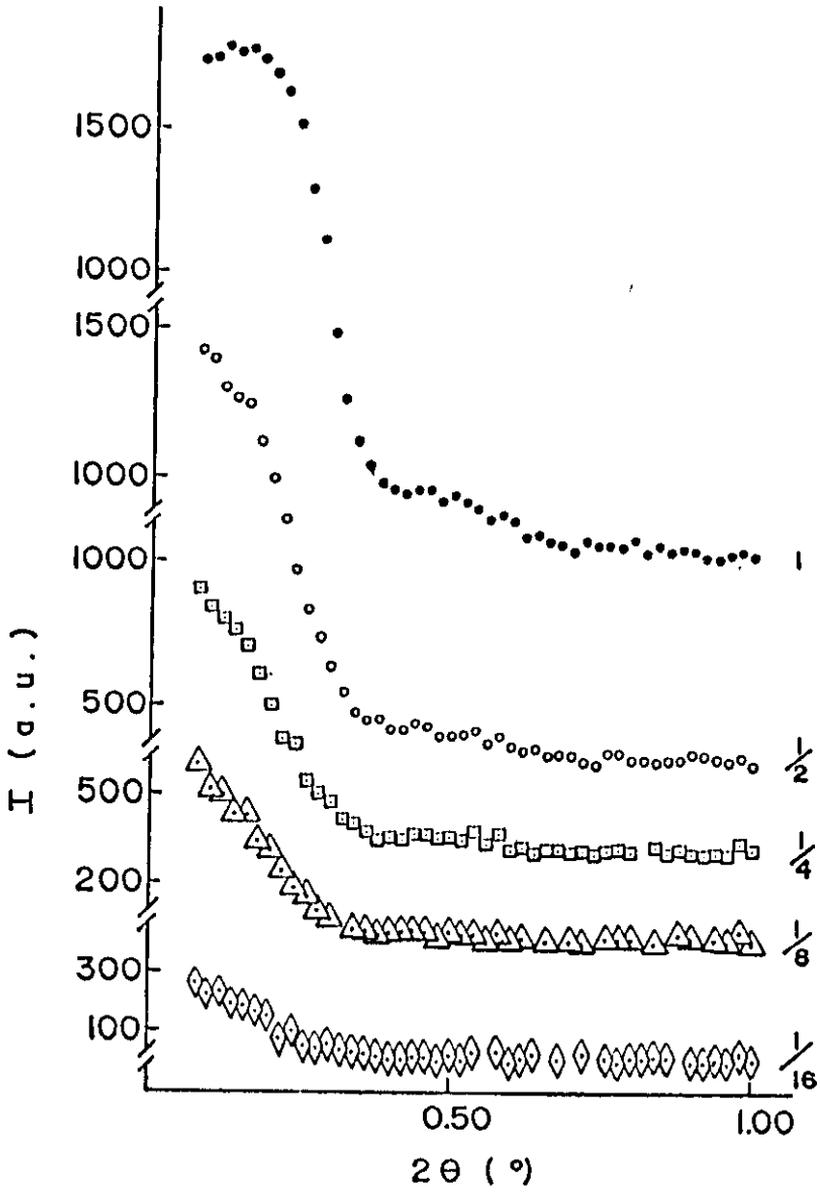


Figura IV.1

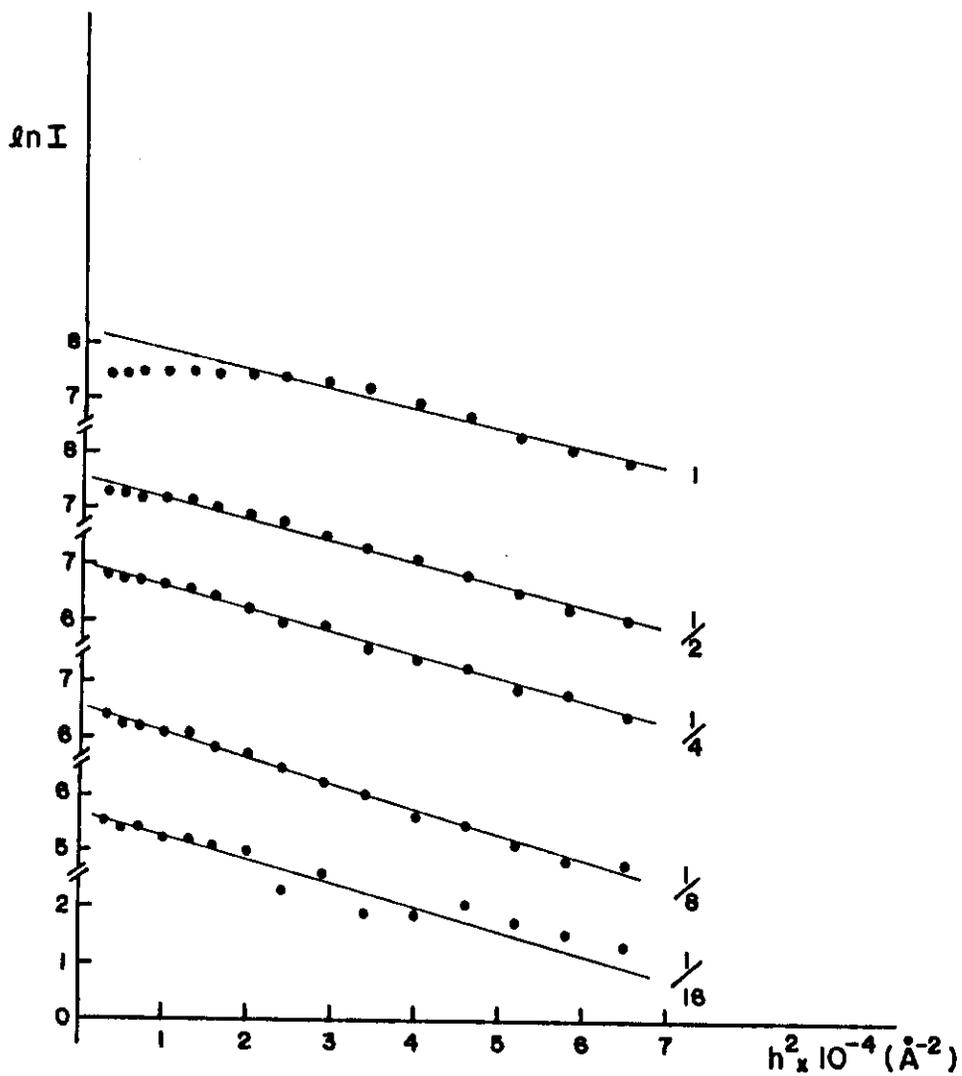


Figura IV.2

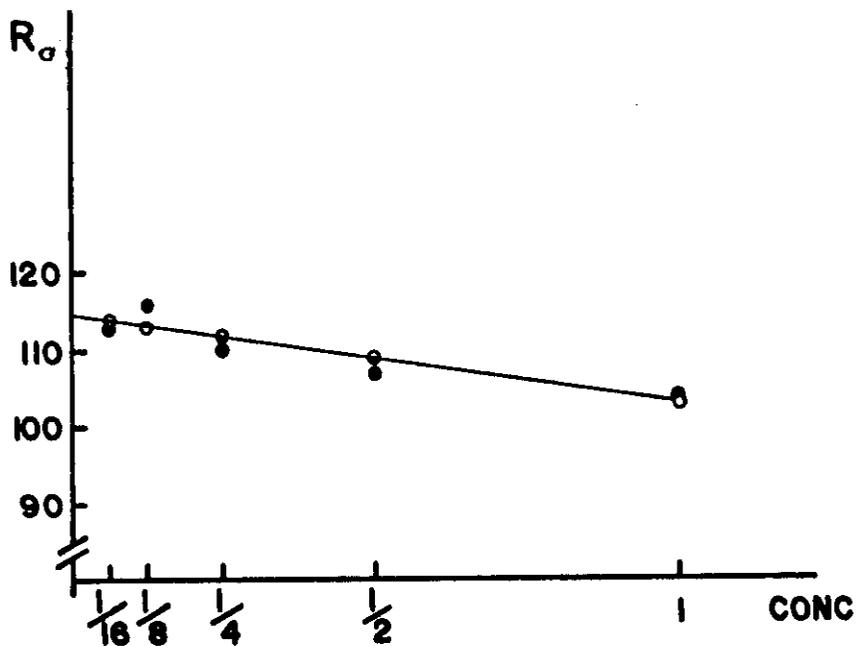


Figura IV.3

Extrapolação do R_σ para concentração zero:

- - valores de R_σ obtidos das curvas da Fig.IV.2;
- - valores determinados por regressão linear.

TABELA I

concentração relativa	R_g (Å)
1	104 ± 2
0,5	107 ± 1
0,25	110 ± 4
0,125	116 ± 6
0,0625	113 ± 14

A informação contida nas curvas corrigidas permitiu que fossem calculadas as funções distribuição de distâncias, $p(r)$, pelo método de transformada indireta de Fourier através do programa ITP-81 de O. Glatter [6]. Nos cálculos, foram usadas as intensidades normalizadas quanto à concentração e os efeitos de geometria foram corrigidos utilizando as distribuições de largura e comprimento de fenda obtidas experimentalmente. Na Fig.IV.4, temos as curvas que correspondem às amostras com 132,8mg/ml, 66,4mg/ml e 33,2mg/ml de proteína. Todas apresentam uma parte negativa na região dos maiores valores de r . Este comportamento é típico de funções produzidas por soluções com concentrações diferentes de zero. É uma consequência de interferências interpartículas que surgem quando saímos da condição ideal de diluição infinita em que se baseia a teoria de espalhamento.

Notamos, também, que a curva referente à amostra mais concentrada é similar às obtidas com dímeros na literatura (ver cap.1). É provável que tenhamos a formação de dímeros neste caso já que trabalhamos com uma concentração bem maior que a máxima recomendada normalmente, que é de 80 mg/ml [5,12]. Dos valores de raio de giro obtidos a partir das funções $p(r)$ (de acordo com a expressão (53) do cap.1), que se encontram na tabela II, observamos que o correspondente à menor diluição (235 Å) é

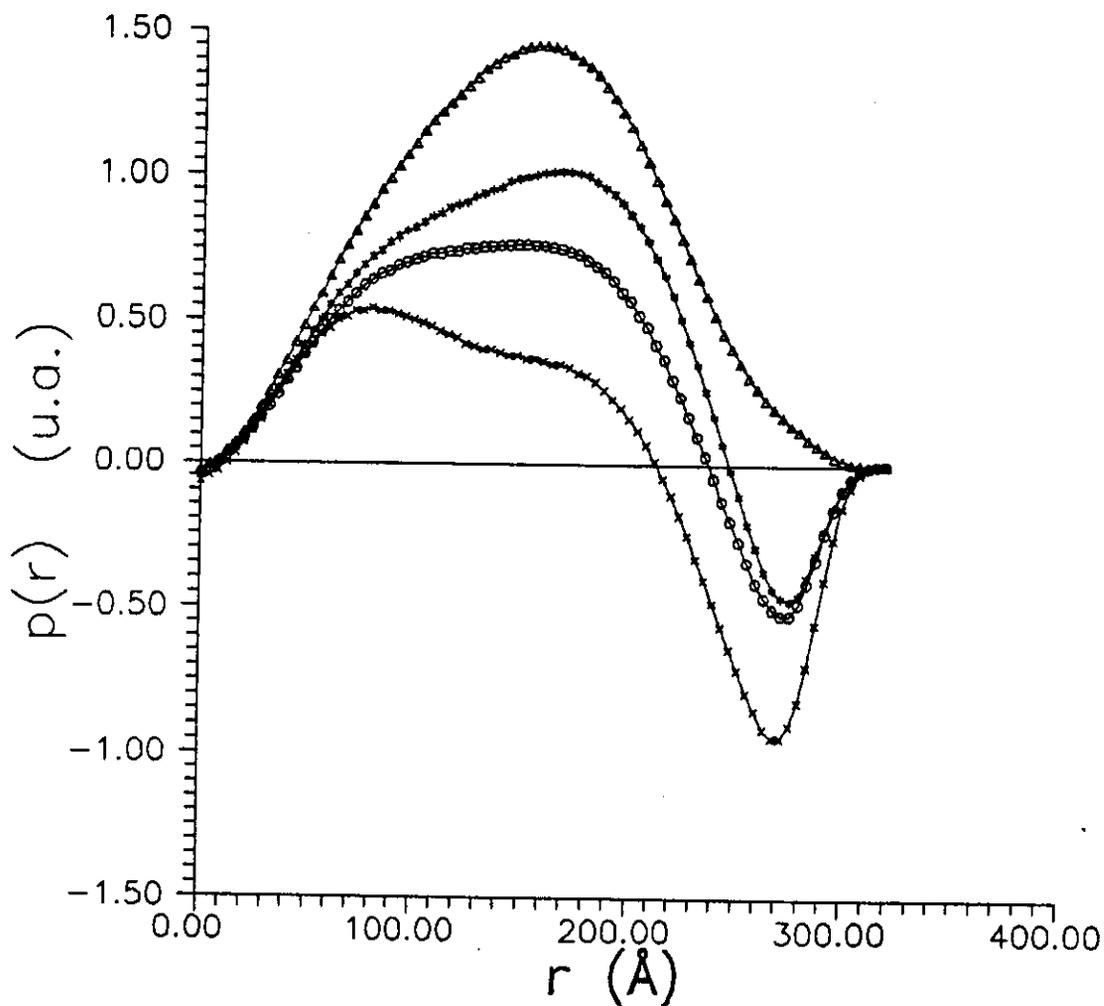


Figura IV. 4

Funções $p(r)$ correspondentes às amostras:

(xxx) 132,8mg/ml; (ooo) 66,4mg/ml; (***), (****) 33,2mg/ml; (c+0) c→0.

aproximadamente 2 vezes o obtido para concentração zero por aproximação de Guinier (114 Å). Este resultado parece reforçar a hipótese de termos a formação de dímeros nesta amostra. Convém salientarmos que não foi possível estimar os erros envolvidos nestes cálculos. Porém, se considerarmos que: i) devido à baixa contagem, usamos apenas a parte inicial das curvas de espalhamento experimentais (em torno de 24 pontos); ii) pela mesma razão, os erros estatísticos envolvidos já eram relativamente altos; e iii) sempre trabalhamos com o número mínimo de 15 funções *splines* nos ajustes, podemos supor que o erro final nos valores de R_g sejam da ordem ou maiores que os obtidos nas aproximações de Guinier.

TABELA II

concentração (mg/ml)	R_g (Å)
132,8	235,0
66,4	65,3
33,2	90,0

Por fim, fizemos uma tentativa de obtenção da função $p(r)$ correspondente à concentração zero. Partimos das intensidades obtidas nos ajustes por funções *splines* das curvas experimentais durante o cálculo das funções $p(r)$ e montamos um gráfico do tipo Zimm ($[I/c]^{-1}$ vs. h), visto na Fig.IV.5. Os erros envolvidos são muito grandes, pois só pudemos usar os 9 pontos iniciais e apenas 4 diluições diferentes. Podemos ver que as relações entre as concentrações não se mantêm. Isto talvez seja um reflexo de só termos uma medida da concentração da amostra com 132,8 mg/ml de proteína. Para as soluções obtidas a partir dela, os valores foram estimados com base nas diluições feitas. Usando a curva extrapolada para concentração zero obtida do gráfico da Fig.IV.5, obtivemos a função $p(r)$ correspondente à diluição infinita vista na Fig.IV.4, com valores de raio de giro e dimensão

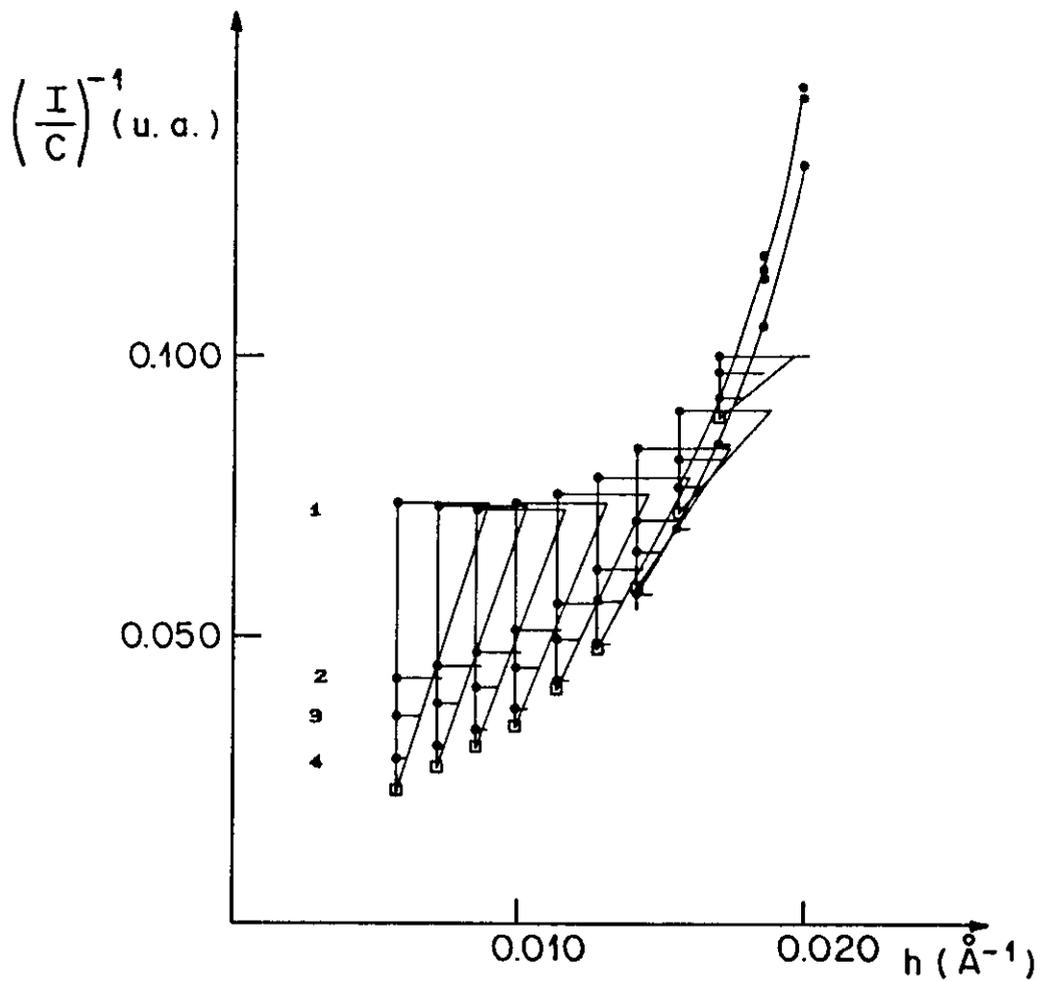


Figura IV. 5

Gráfico tipo Zimm: (1) 132,8mg/ml; (2) 66,4mg/ml;
 (3) 33,2mg/ml; (4) 16,6mg/ml; (□□□) $c \rightarrow 0$.

máxima de 112,8 Å e ~308 Å, respectivamente.

Estes cálculos esgotaram as possibilidades de análise dos dados obtidos com fonte de radiação convencional.

IV.2- RESULTADOS OBTIDOS COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Na Fig.IV.6, podemos ver as curvas de espalhamento obtidas com radiação síncrotron que correspondem às diluições estudadas. Devido, principalmente, à grande incerteza na determinação das concentrações envolvidas, perdemos o ponto de referência para comparação entre as curvas das diferentes amostras e a conseqüente extrapolação para diluição infinita. Dessa forma, resolvemos abordar o problema de um modo diverso mas equivalente em resultado.

Como sabemos que o efeito de interferências interpartículas se manifesta nos menores ângulos de espalhamento, desprezamos pontos iniciais da curva de intensidade da amostra mais diluída ($c=1,927$ mg/ml). Calculamos a função distribuição de distâncias para várias curvas, aumentando, a cada vez, o número de pontos desprezados. Assim, pudemos acompanhar os resultados até obter uma curva equivalente à extrapolada à concentração zero. Todos os cálculos foram feitos com curvas de intensidade formadas pela parte inicial da correspondente à amostra mais diluída unida no ponto $h=0,0282$ Å⁻¹ ao restante da referente à solução mais concentrada ($c=84,1$ mg/ml). A normalização sempre foi feita sobre os dados da mais diluída em relação à outra. A cada intervalo de pontos considerado, a curva da amostra com menor concentração, antes da união com a mais concentrada, foi ajustada por regressão linear em um gráfico de Guinier. Podemos ver os intervalos utilizados e os respectivos valores de raio de giro obtidos na tabela III. O ponto de junção das duas curvas (mais diluída com a mais concentrada) foi escolhido depois da região de Guinier

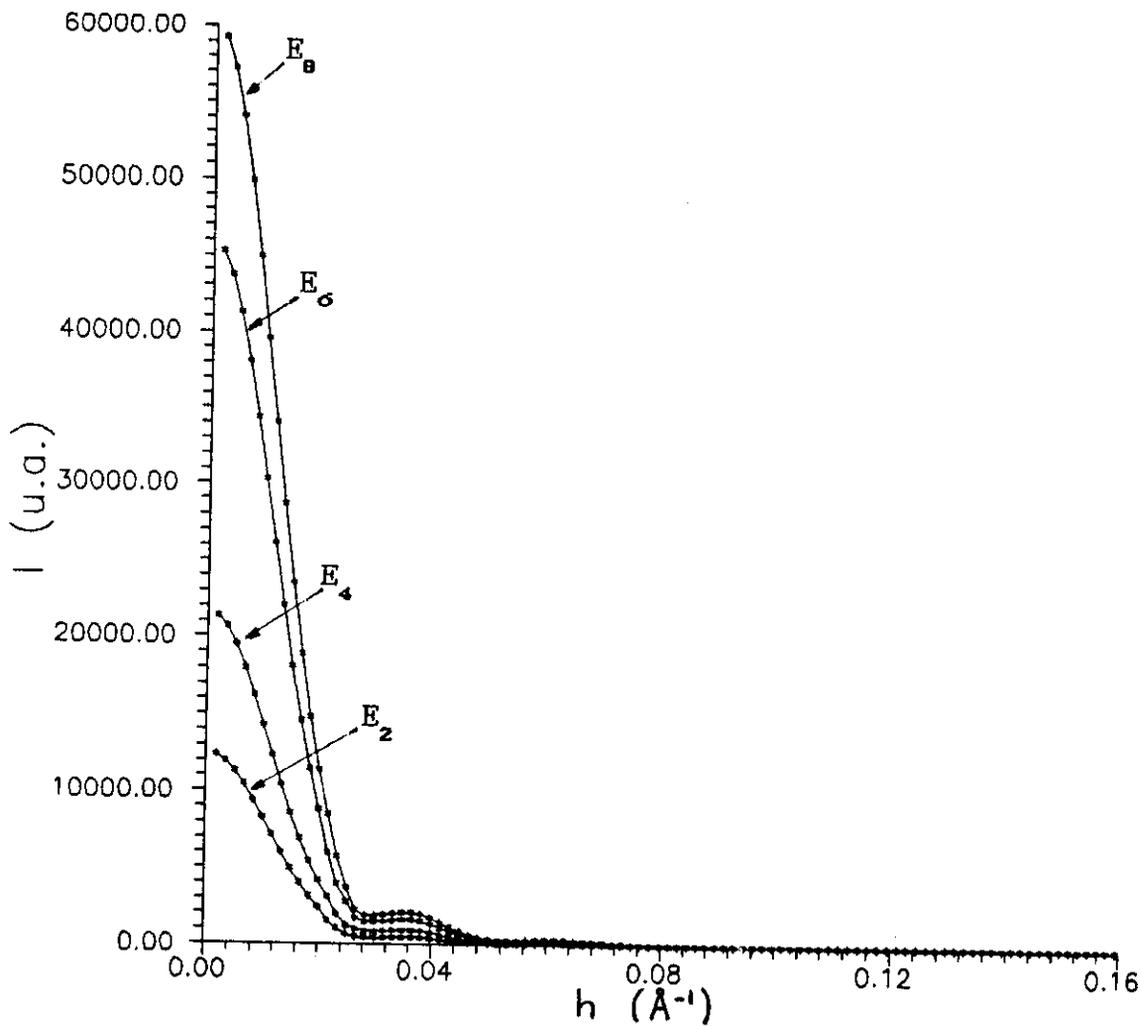


Figura IV.6

considerada e antes do primeiro mínimo da curva de espalhamento.

Na Fig.IV.7, podemos ver as curvas de intensidade obtidas. Na Fig.IV.8, temos as mesmas curvas em escala logarítmica para evidenciar os máximos e mínimos secundários. Notamos que são curvas bem mais estruturadas que as que obtivemos com o gerador de raios X de ânodo rotatório e, portanto, com boas condições para a determinação da estrutura quaternária da proteína.

TABELA III

curva	$h_1 - h_2$	R_g (Å)
1	0,0075 - 0,0199	111,4
2	0,0075 - 0,0216	115,2
3	0,0083 - 0,0232	117,5
4	0,0104 - 0,0232	118,5
5	0,0116 - 0,0232	119,2
6	0,0129 - 0,0232	119,9

Usando estas curvas, obtivemos as funções distribuição de distância por 2 métodos. Primeiro, por transformada direta de Fourier, já que temos a curva em um intervalo angular razoavelmente grande, o que reduz os efeitos de terminação. Em segundo, usamos transformada indireta de Fourier. Os resultados podem ser vistos nas Figs.IV.9 e IV.10. De imediato, podemos notar que as funções $p(r)$ calculadas pelos 2 tipos de transformada são muito semelhantes em suas formas. Observamos que as duas apresentam o mesmo comportamento: o vale, em grandes valores de r , diminui com a redução das interferências interpartículas até a função se anular em $r = D_{max}$ que corresponderia a uma amostra com concentração zero. Entretanto, por transformada direta, este resultado é atingido antes (com a curva 5) do que pela indireta (com a curva 6). Convém lembrar, mais uma vez, que a primeira é mais sensível a efeitos de

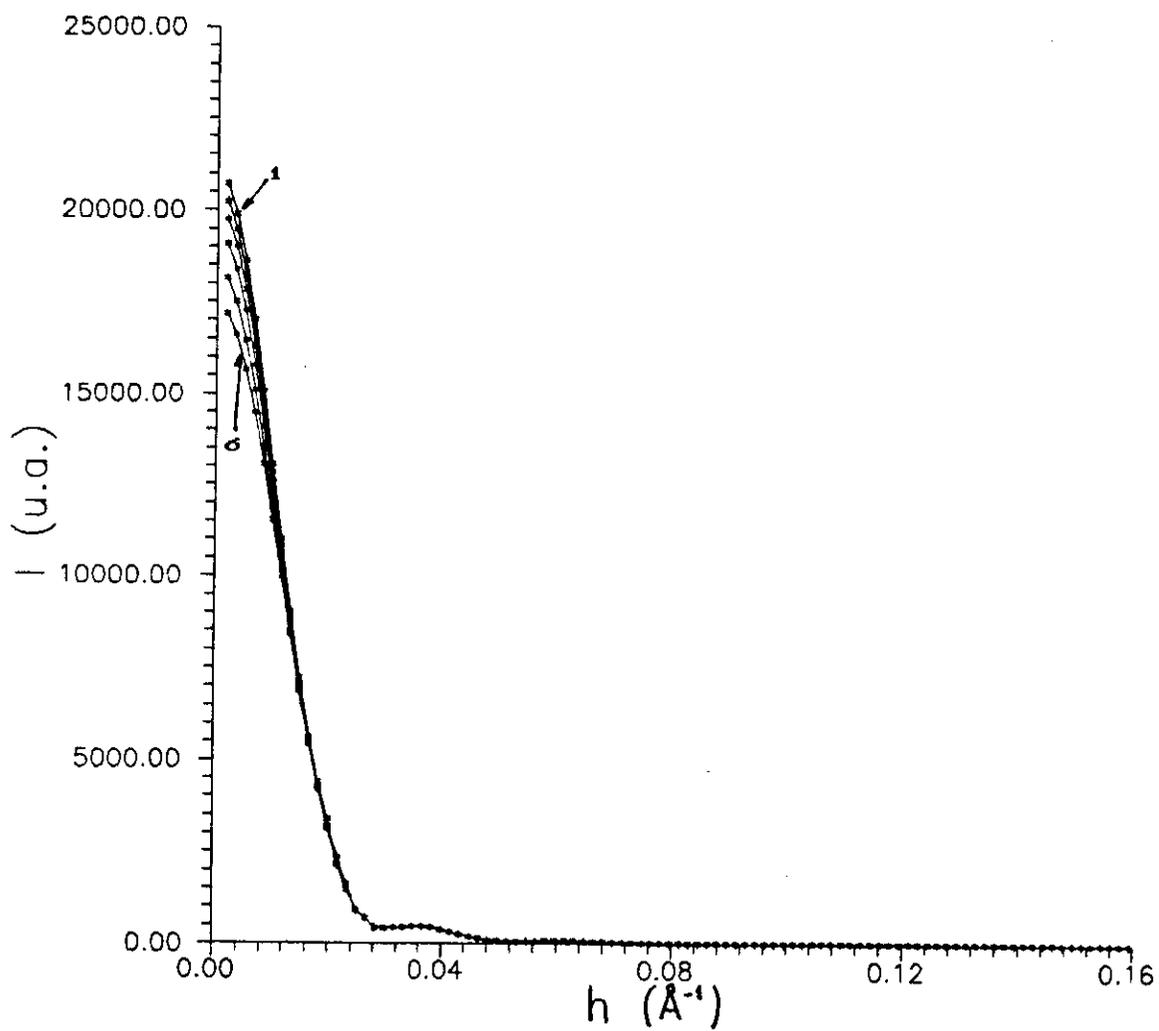


Figura IV.7

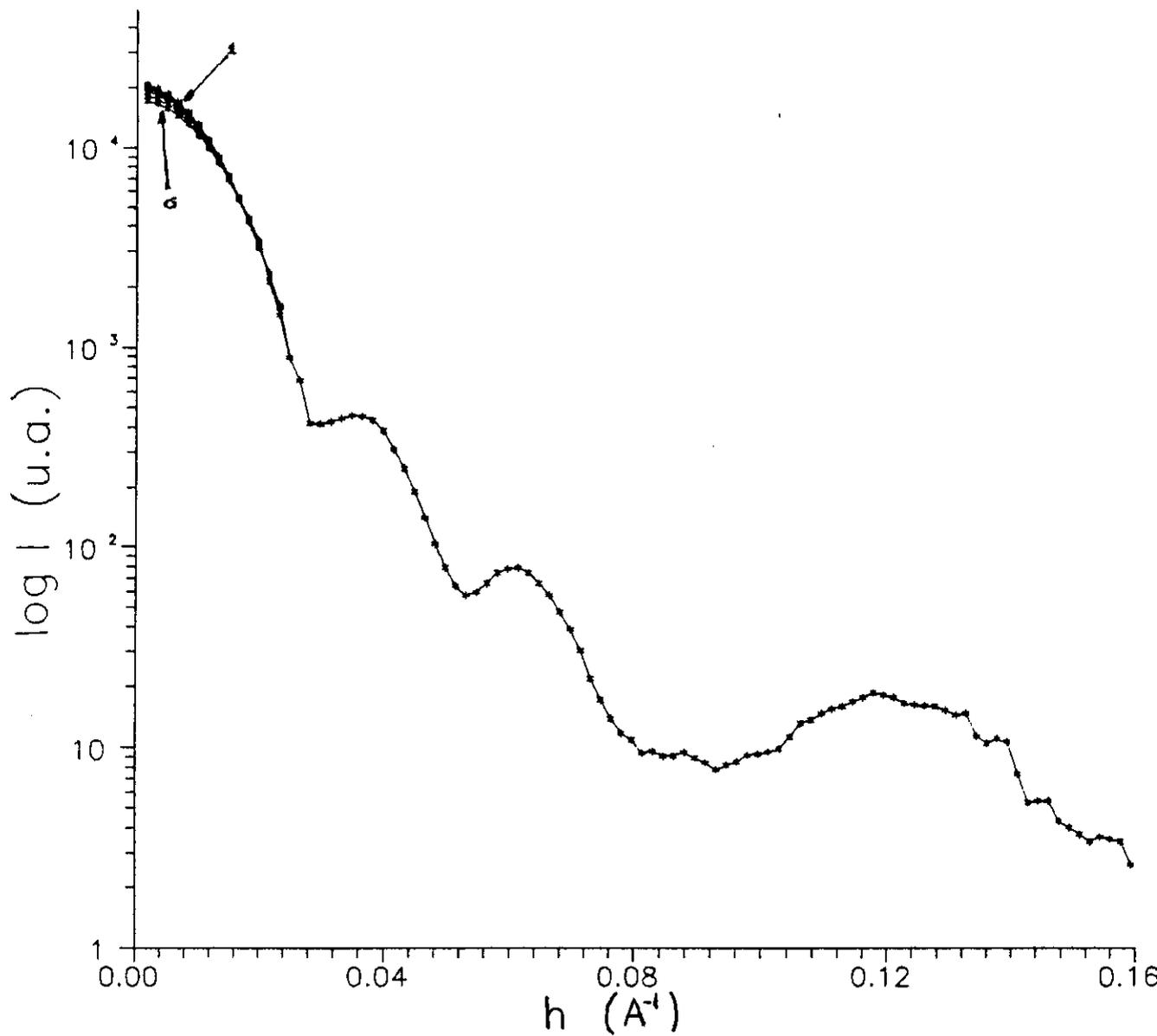


Figura IV.8

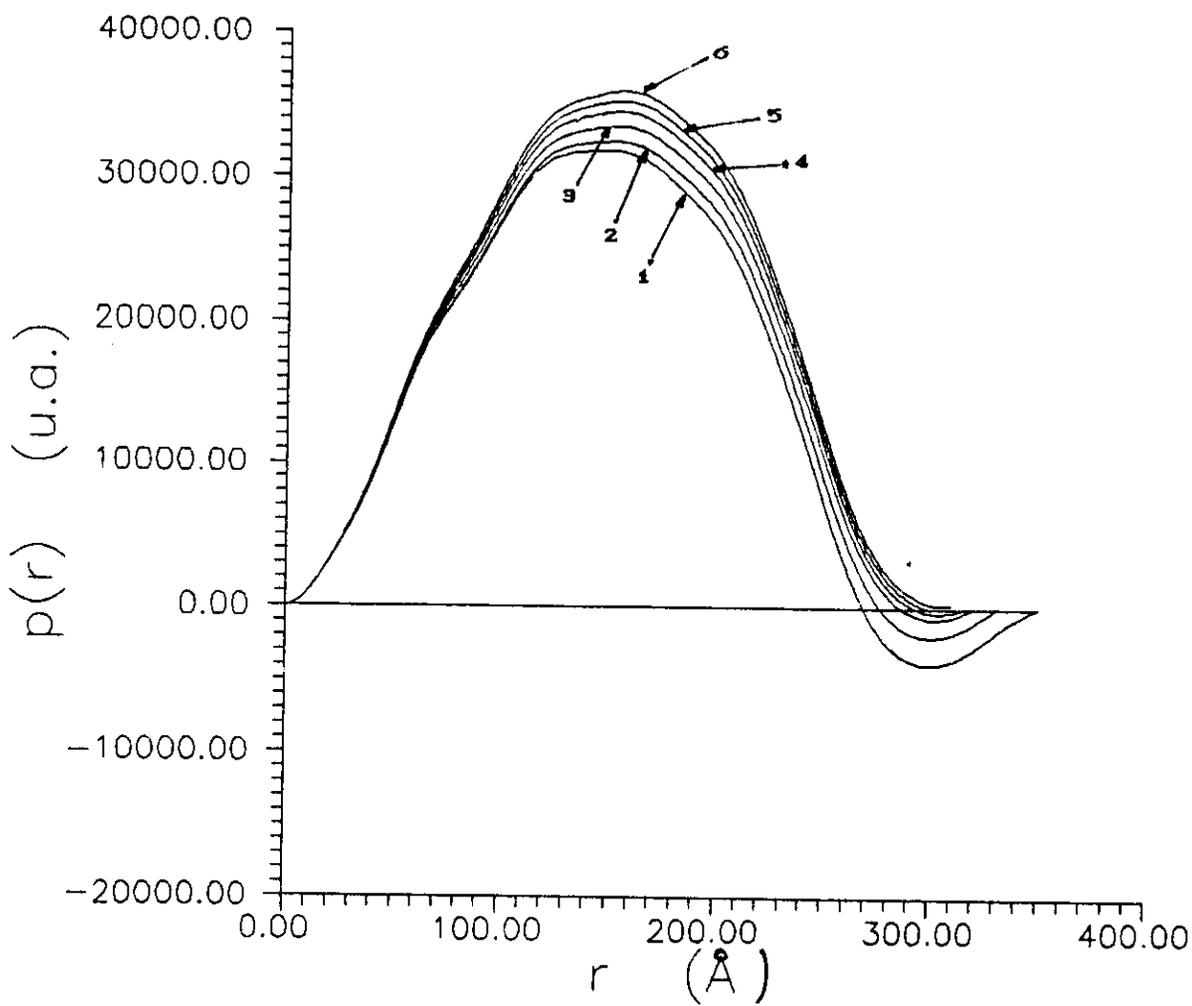


Figura IV.9

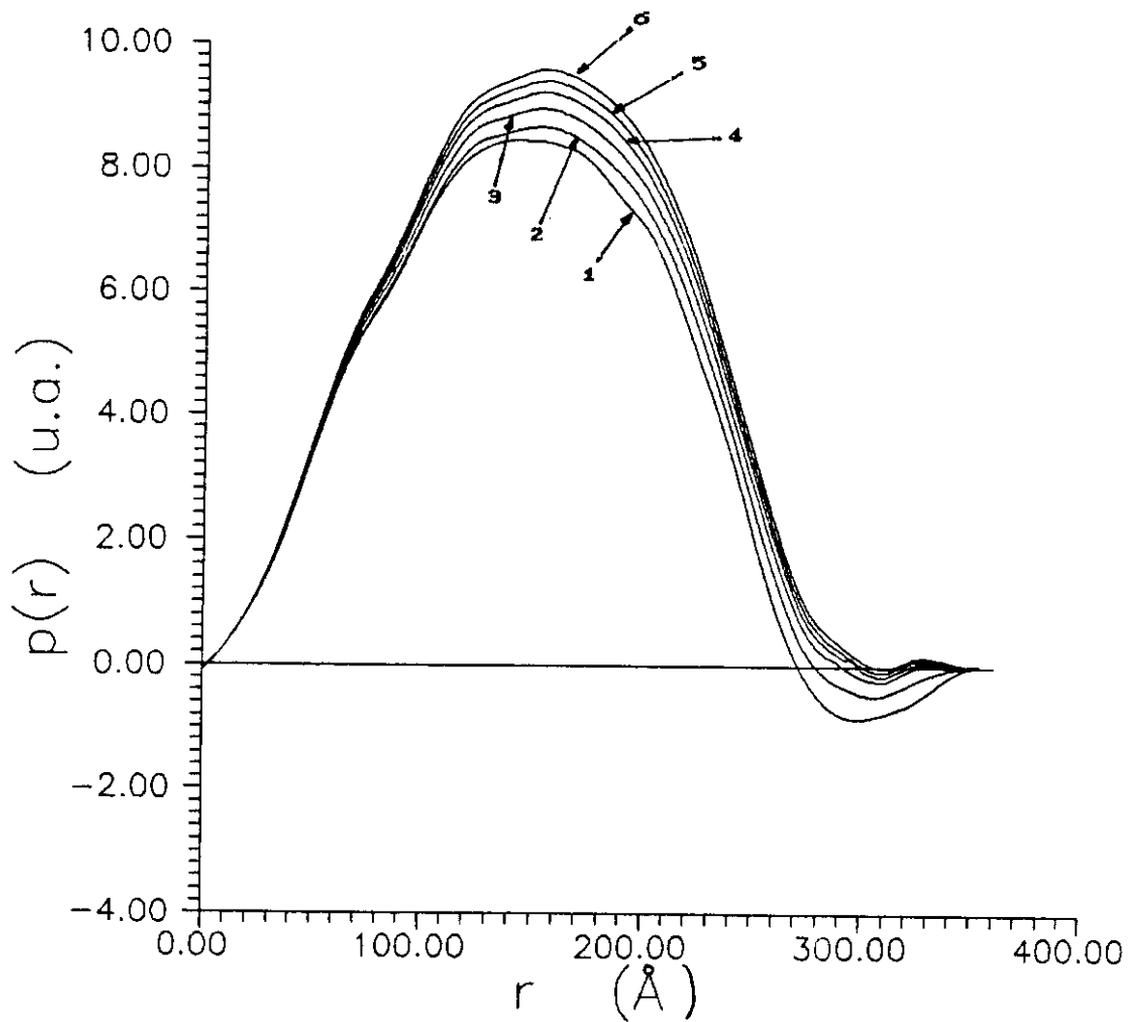


Figura IV.10

terminação que, no nosso caso, foram reduzidos, mas não totalmente eliminados. É de esperar, portanto, esta diferença de resultados. O valor para D_{\max} obtido por transformada direta foi $\sim 306\text{Å}$, enquanto que pela outra obteve-se $\sim 308\text{Å}$, conforme podemos ver nas Figs. IV.9 e IV.10.

Por fim, vemos, na tabela IV, que os valores de R_g calculados por transformada indireta são menores que os determinados por aproximação de Guinier (tabela III). Para a curva extrapolada à concentração zero, obtivemos um raio de giro igual a $114,6\text{Å}$, muito próximo do determinado usando os dados obtidos com gerador convencional (ver item anterior). Usamos tal curva e a sua

TABELA IV

curva	R_g (Å)
1	104,42
2	109,12
3	111,90
4	113,09
5	113,88
6	114,61

correspondente função $p(r)$ na obtenção de um provável modelo para a estrutura de subunidades da molécula conforme veremos a seguir.

IV.3- MODELO PARA ESTRUTURA DE SUBUNIDADES DA HEMOGLOBINA EXTRACELULAR DE *Glossoscolex paulistus*

No processo de obtenção do modelo, procuramos ajustar as curvas calculadas às curvas obtidas a partir dos dados experimentais: função de espalhamento e função distribuição de

distâncias, ambas correspondentes à extrapolada para concentração zero. Com base nos resultados de microscopia eletrônica, propusemos um modelo inicial, formado por 186 esferas idênticas de raio 21,08Å, composto do seguinte modo:

i) 12 subunidades principais que procuramos aproximar o máximo possível de uma forma esférica compondo cada uma com 14 esferas, conforme a Fig.IV.11. Estas subunidades viriam a formar os 2 hexágonos sobrepostos.

ii) uma subunidade formada por 6 esferas, de acordo com a Fig.IV.12, situada no centro dos hexágonos.

iii) 12 esferas que ligam as subunidades principais à central.

Escolhemos o raio das esferas de modo que seu diâmetro fosse maior que a distância (d) entre centros de 2 esferas adjacentes. Isto é necessário para assegurar que o modelo represente o volume correto. Para tal, utilizamos a relação $R_e = 0,62d_e$ obtida ao se formar um cubo com esferas de raio R_e .

Na Fig.IV.13, podemos ver o modelo inicial.

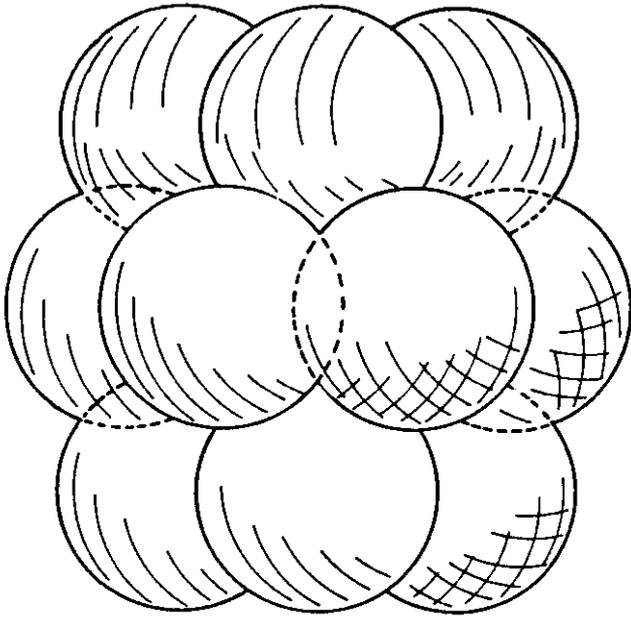
IV. 3.1-RESULTADOS OBTIDOS NOS CÁLCULOS DOS MODELOS

Apresentaremos a seguir apenas os resultados que julgamos necessários para o acompanhamento da evolução dos modelos propostos de um total de 570 modelos calculados. Nas figuras que tem índice α , poderão ser vistos o número do modelo e as modificações feitas em relação ao anterior.

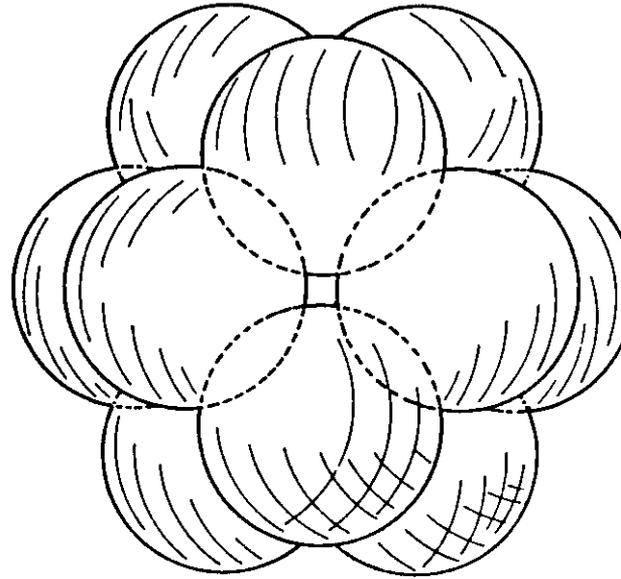
Nas Figs.IV.14 e IV.15, são mostradas as funções de espalhamento e distribuição de distâncias, respectivamente, calculadas pelas expressões (54) e (55) do cap.1 para o modelo inicial (Fig.IV.13). Nota-se, neste primeiro modelo, um ajuste razoavelmente bom na região de Guinier nas intensidades, mas um desacordo grande entre a curva experimental e a calculada. A função $p(r)$ também mostra diferenças notáveis.

A partir deste resultado, tentamos localizar os

SUBUNIDADE $1/12$



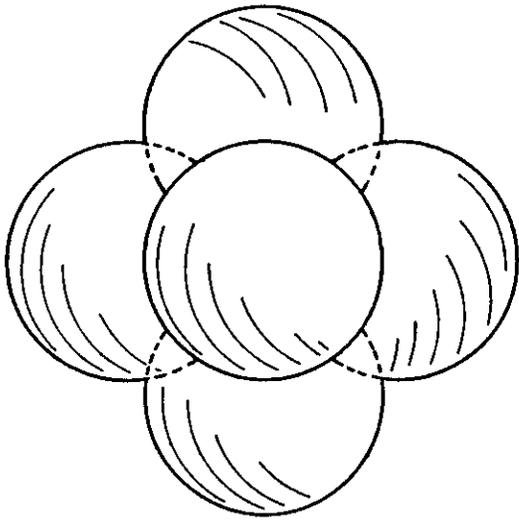
VISTA LATERAL



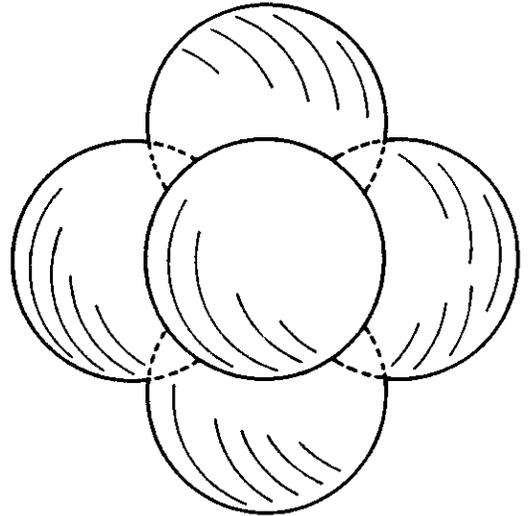
VISTA SUPERIOR

Figura IV.11

SUBUNIDADE CENTRAL

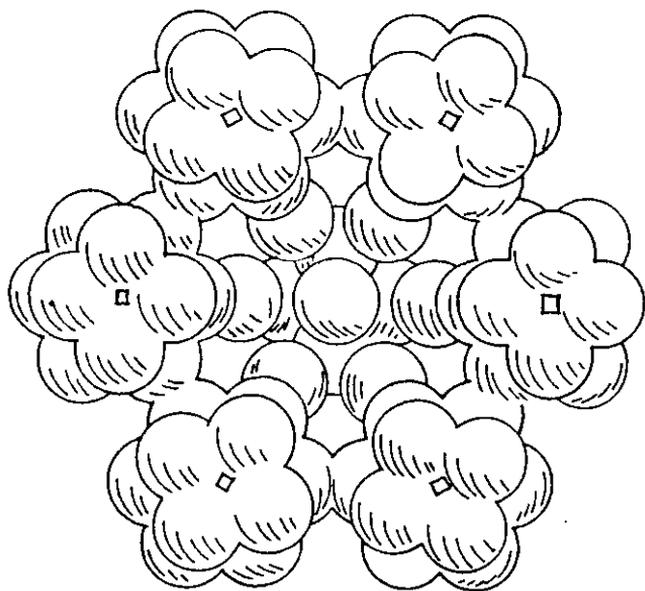


VISTA LATERAL

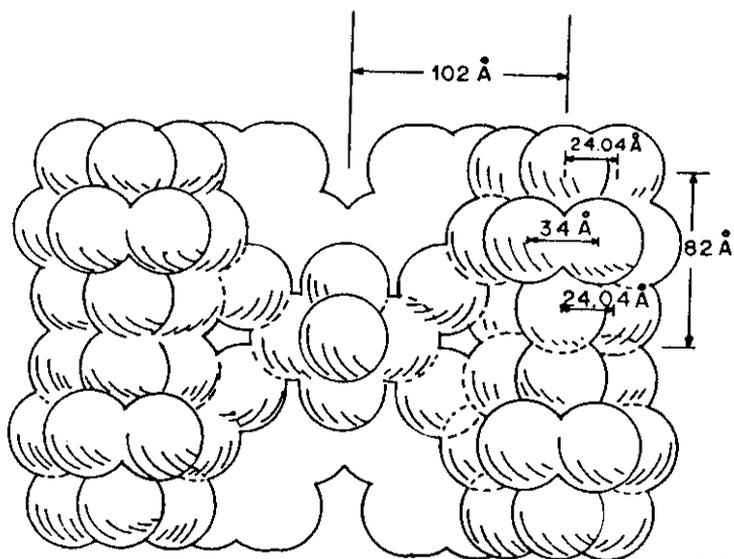


VISTA SUPERIOR

Figura IV.12



VISTA SUPERIOR



VISTA LATERAL

Figura IV.13

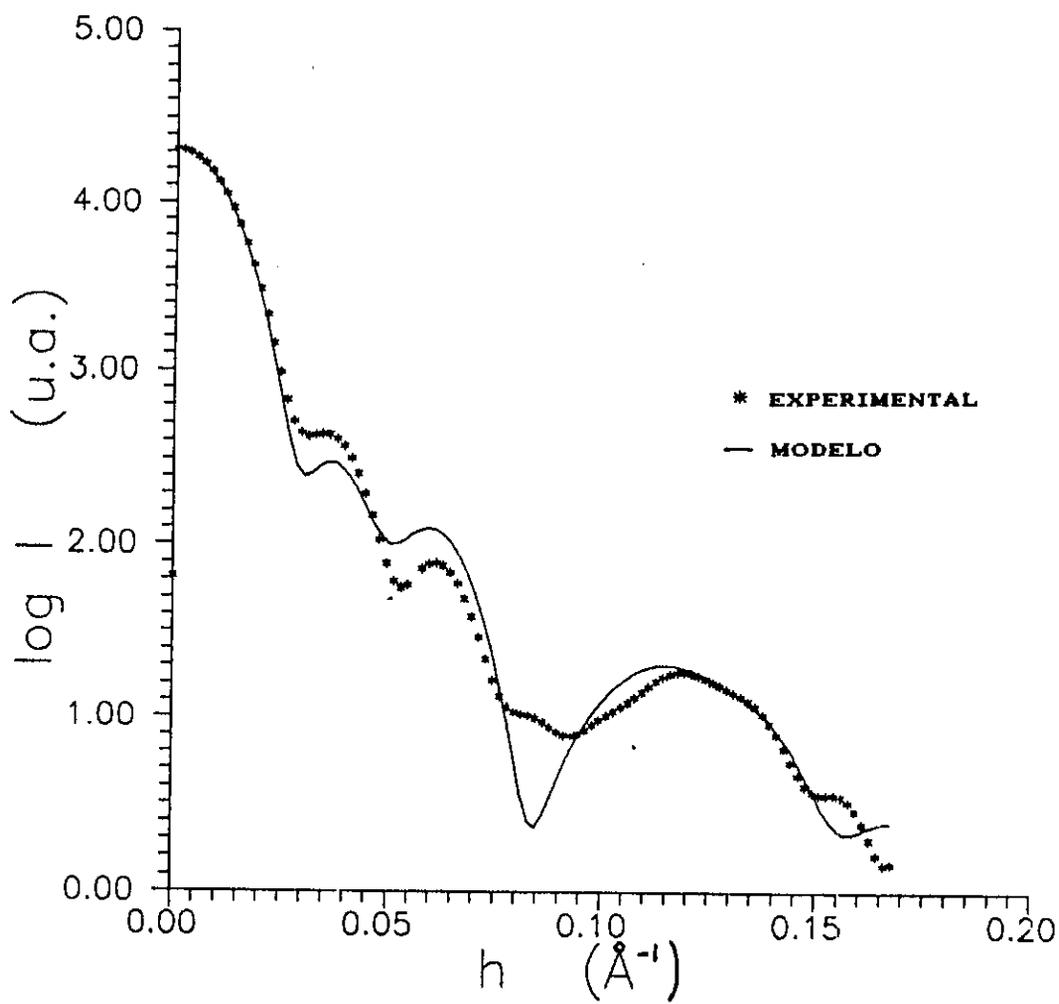


Figura IV.14

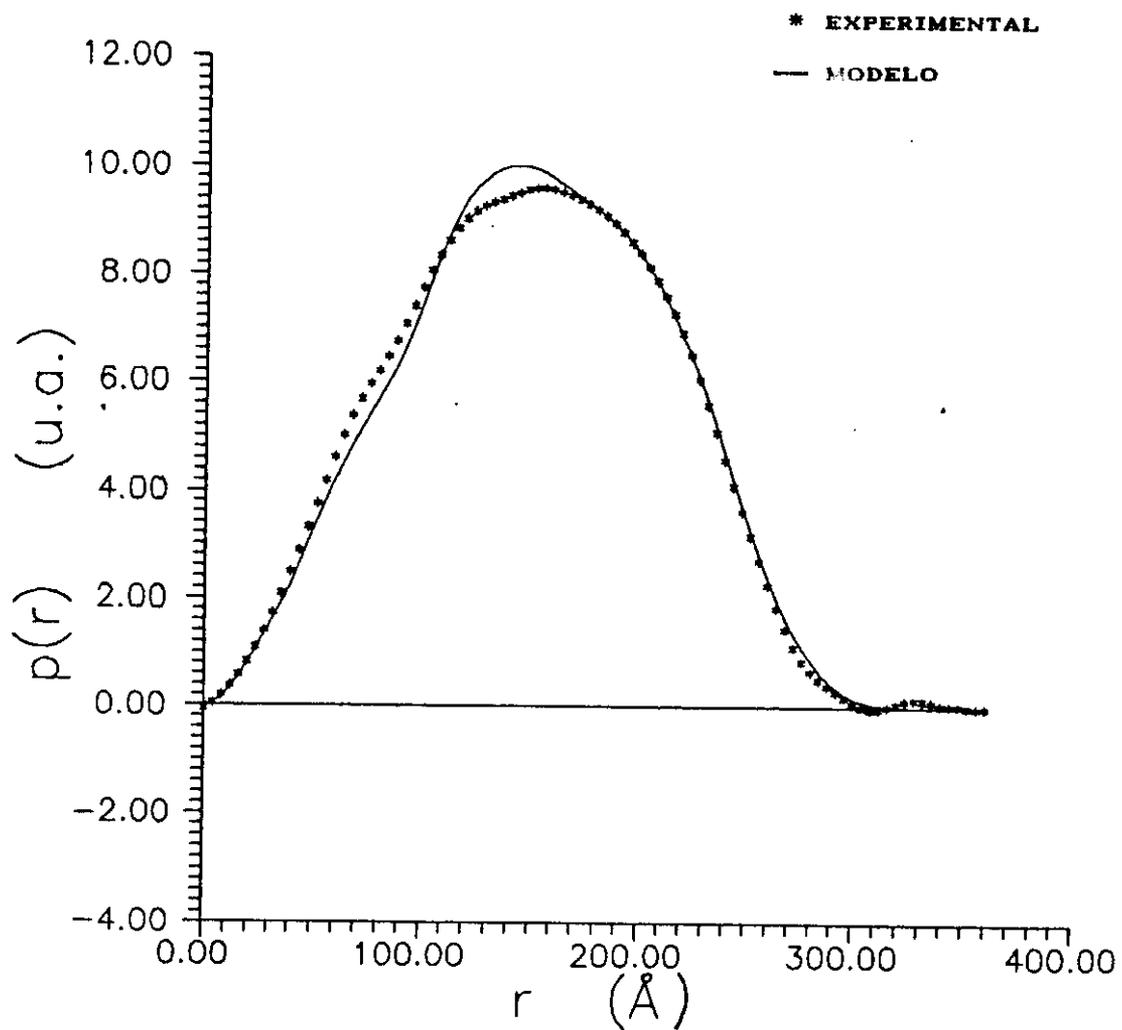


Figura IV.15

efeitos das mudanças na estrutura central. Tiramos 2 esferas da subunidade central (ver Fig.IV.16a). O vale que precede a banda em $\sim 0,12\text{\AA}^{-1}$ na curva $\log I(h) \times h$ foi suavizado (Fig.IV.16b). A função $p(r)$ pode ser vista na Fig.IV.17.

Em seguida, centramos nossa atenção na subunidade principal, diferenciando as distâncias entre as 4 esferas mais internas e as 4 mais externas de acordo com a Fig.IV.18a. Conseguimos, assim, o aparecimento do 3º pico secundário antes da banda na função $\log I(h) \times h$ (Fig.IV.18b). A forma da banda ficou mais próxima do que tínhamos experimentalmente, o mesmo acontecendo com a função $p(r)$ (Fig.IV.19).

Para acertar as posições dos picos secundários, novamente mudamos as distâncias envolvidas nos conjuntos de 4 esferas da estrutura 1/12 (Fig.IV.20a). Os picos 2 e 3 ficaram melhor ajustados com a curva experimental (Fig.IV.20b). Entretanto, ainda houve diferença entre os máximos da função $p(r)$ calculada e o da obtida experimentalmente (Fig.IV.21).

Como os cálculos pareciam indicar que a posição e a forma da banda em $\sim 0,12\text{\AA}^{-1}$ estavam relacionadas com as dimensões envolvidas na estrutura 1/12 e já havíamos modificado as distâncias nos conjuntos de 4 esferas para acertar as posições dos máximos secundários, decidimos fazer com que os conjuntos de 4 esferas e o de 6 da subunidade principal ficassem a distâncias diferentes do eixo central da molécula (Fig.IV.22a). Assim, deslocamos o máximo da banda para uma melhor posição (Fig.IV.22b). A função distribuição de distâncias ficou mais bem ajustada nas laterais, mas o máximo acentuou-se mais (Fig.IV.23).

Considerando que as posições dos máximos e mínimos estavam boas, resolvemos acertar as intensidades. Mudamos o peso do conjunto de 4 esferas mais internas da estrutura parcial principal (conforme Fig.IV.24a) aumentando-o para 1,5. Dessa forma, essa região ficou com densidade eletrônica 0,5 acima do resto da molécula. Portanto, devem ocorrer modificações nas

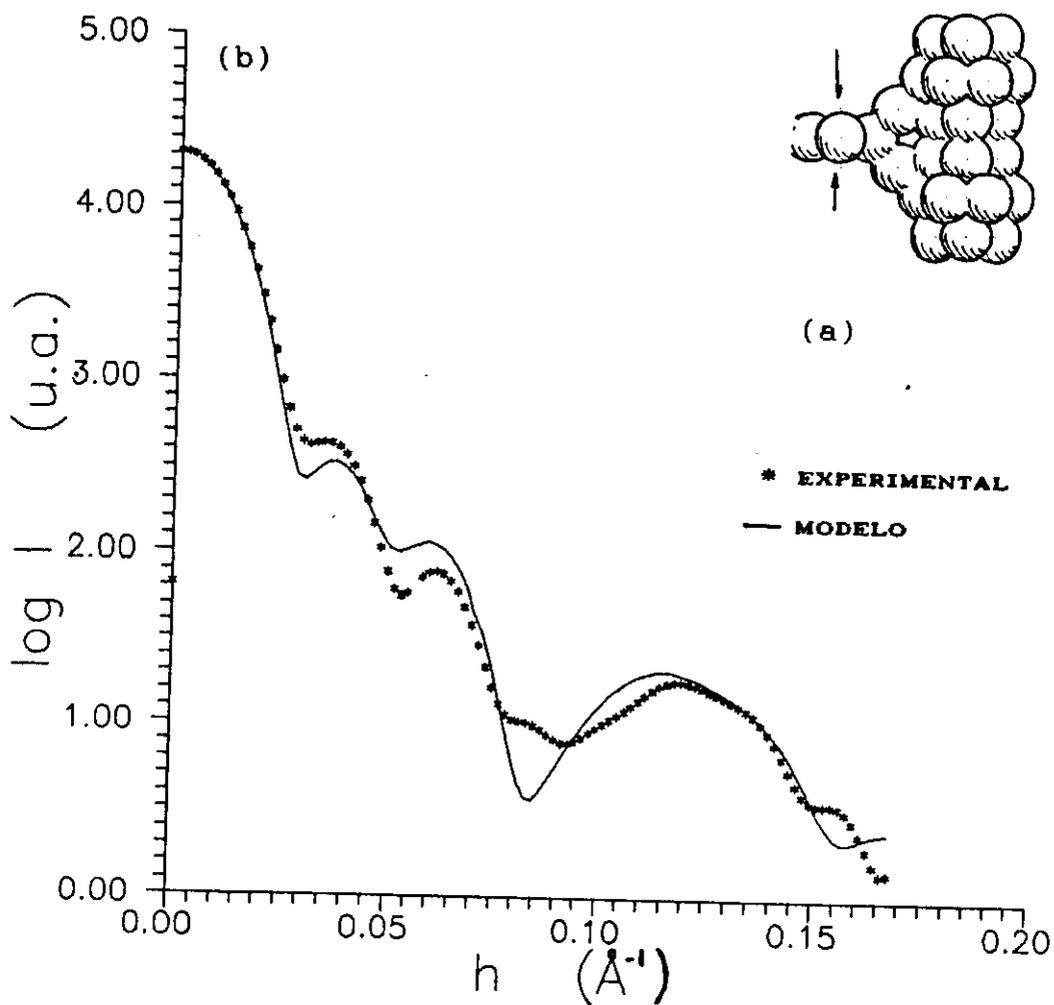


Figura IV.16

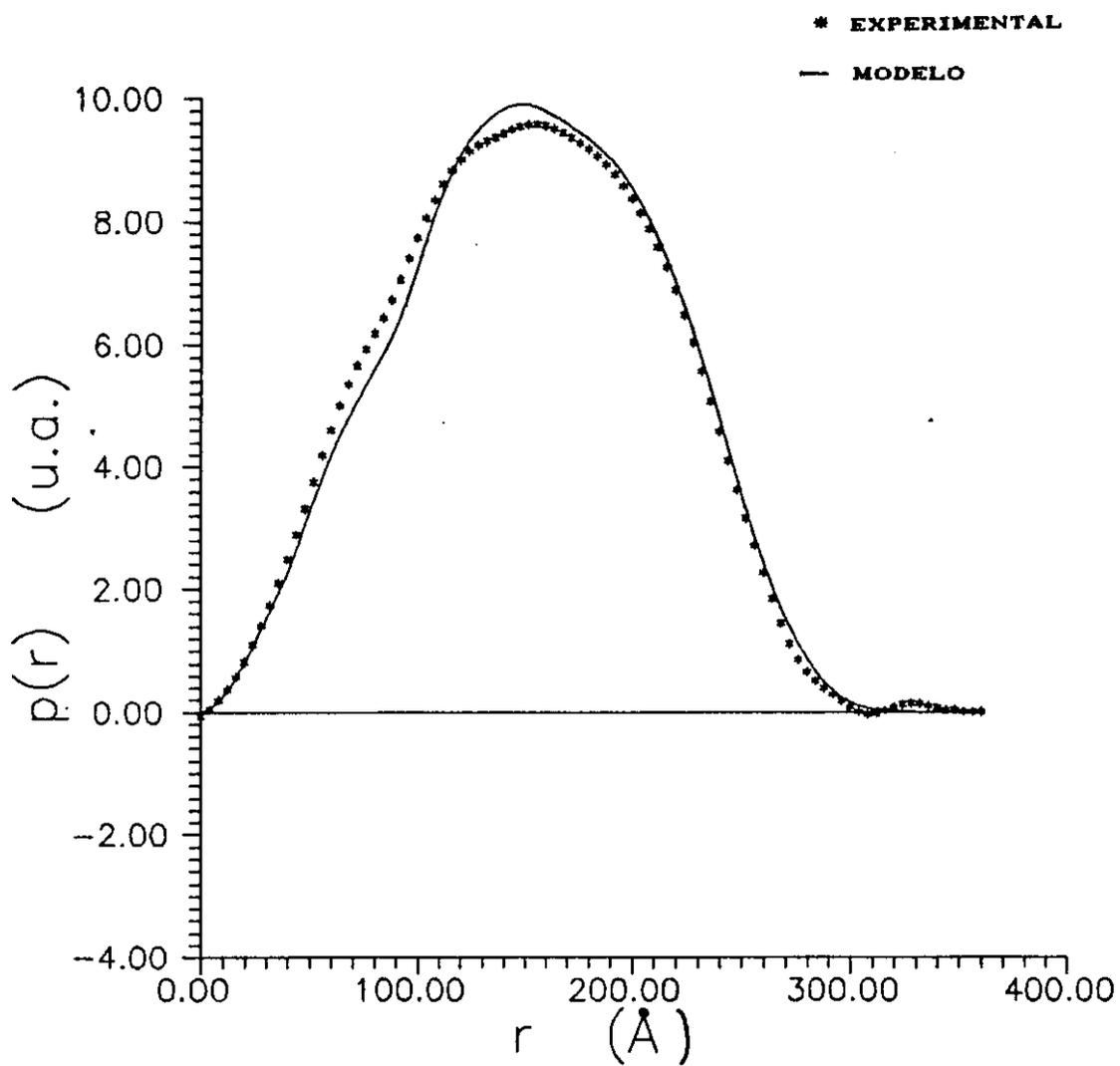
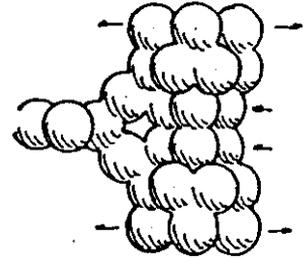


Figura IV.17

MODELO 75



(a)

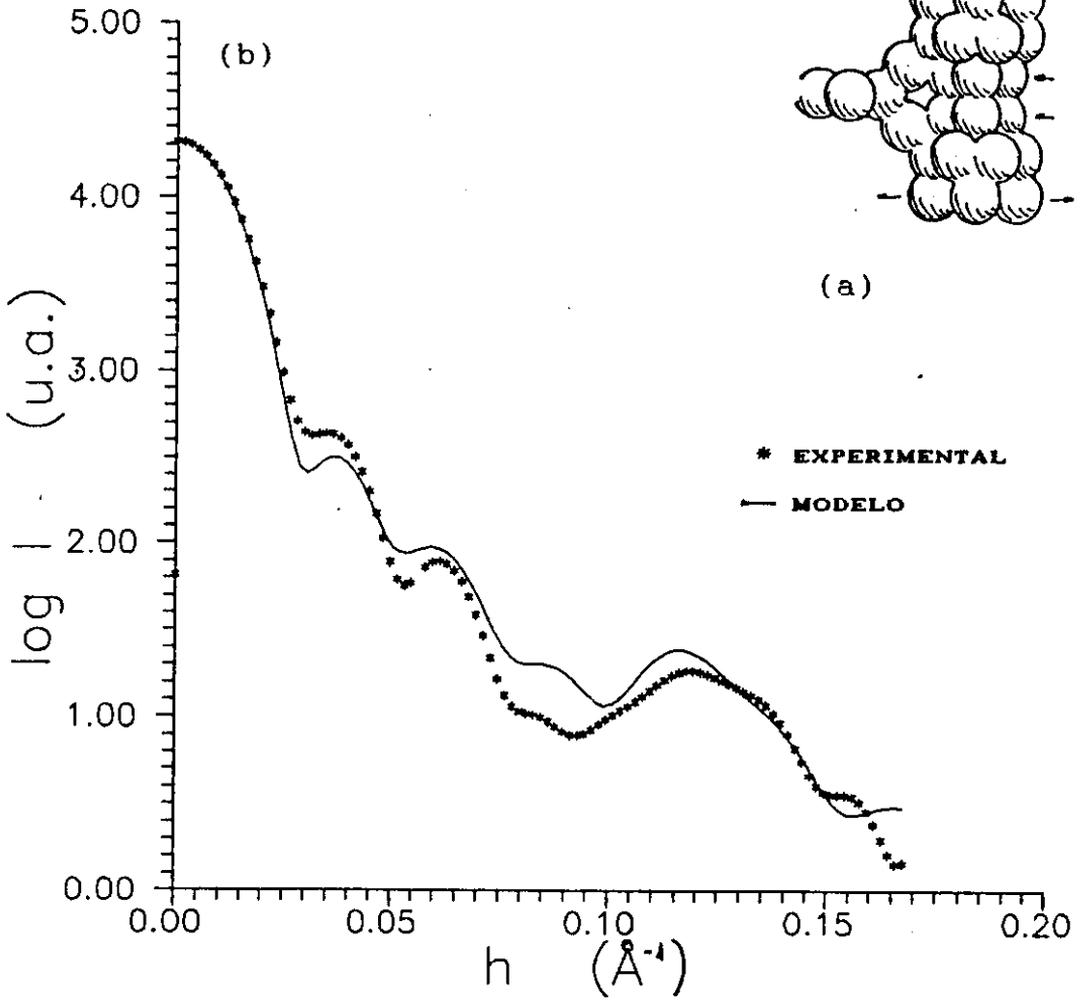


Figura IV.18

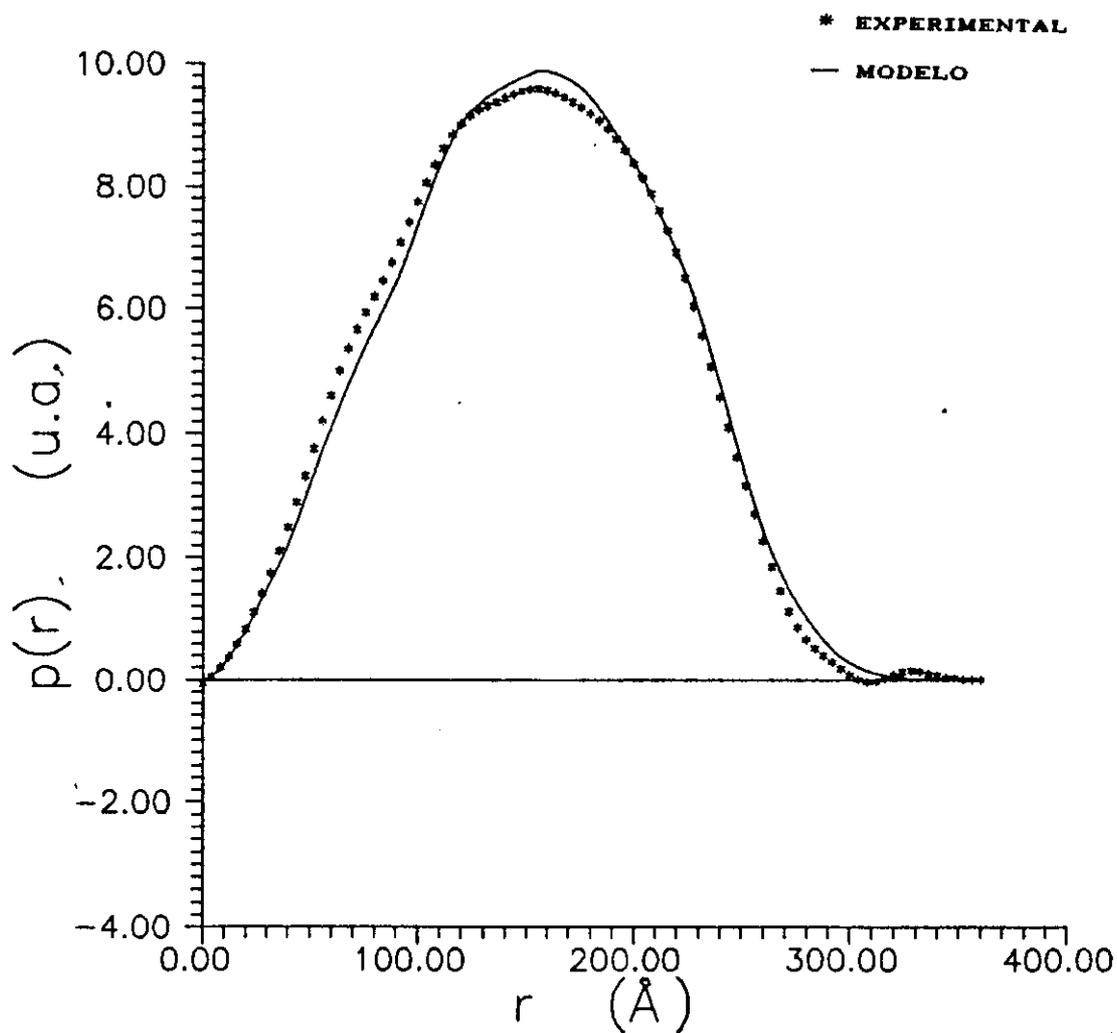


Figura IV.19

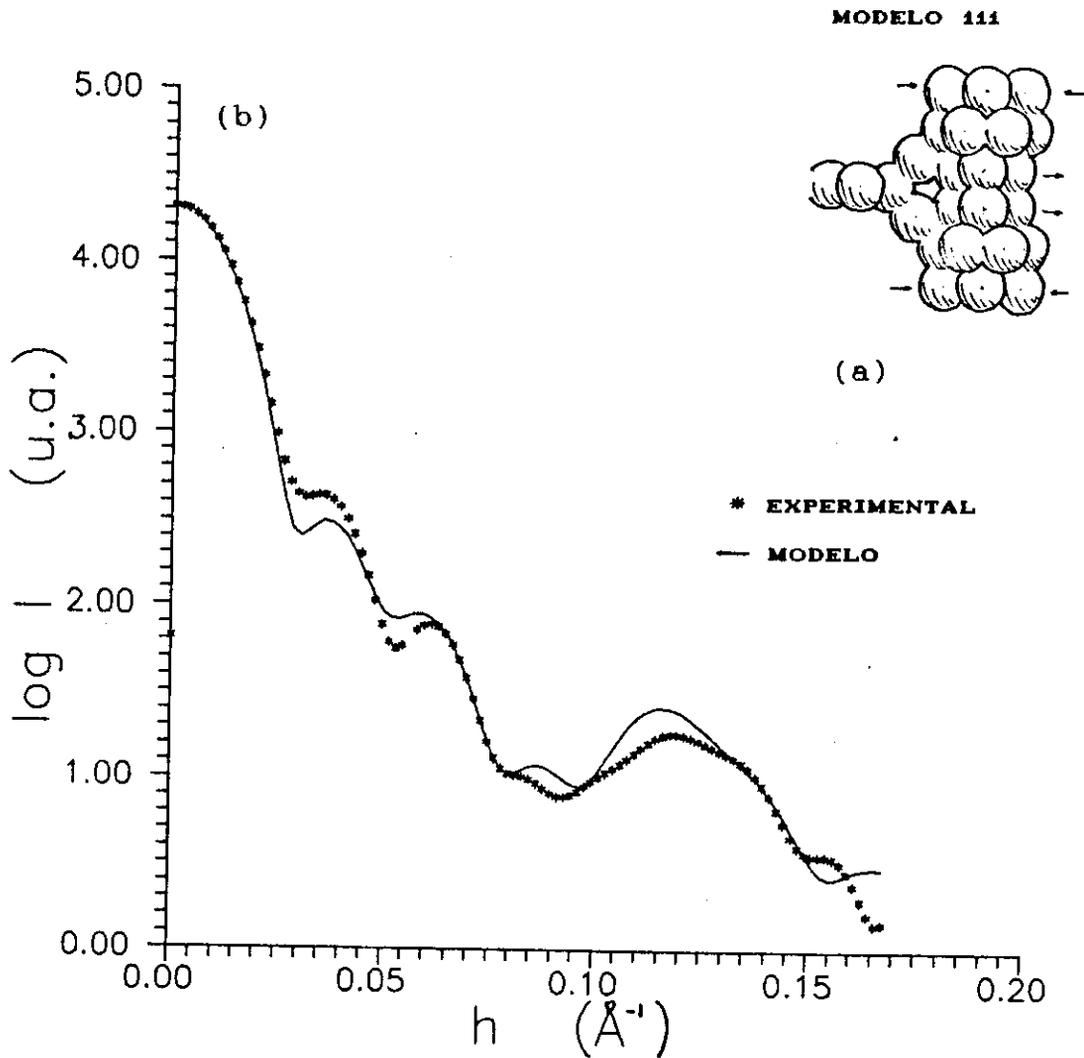


Figura IV.20

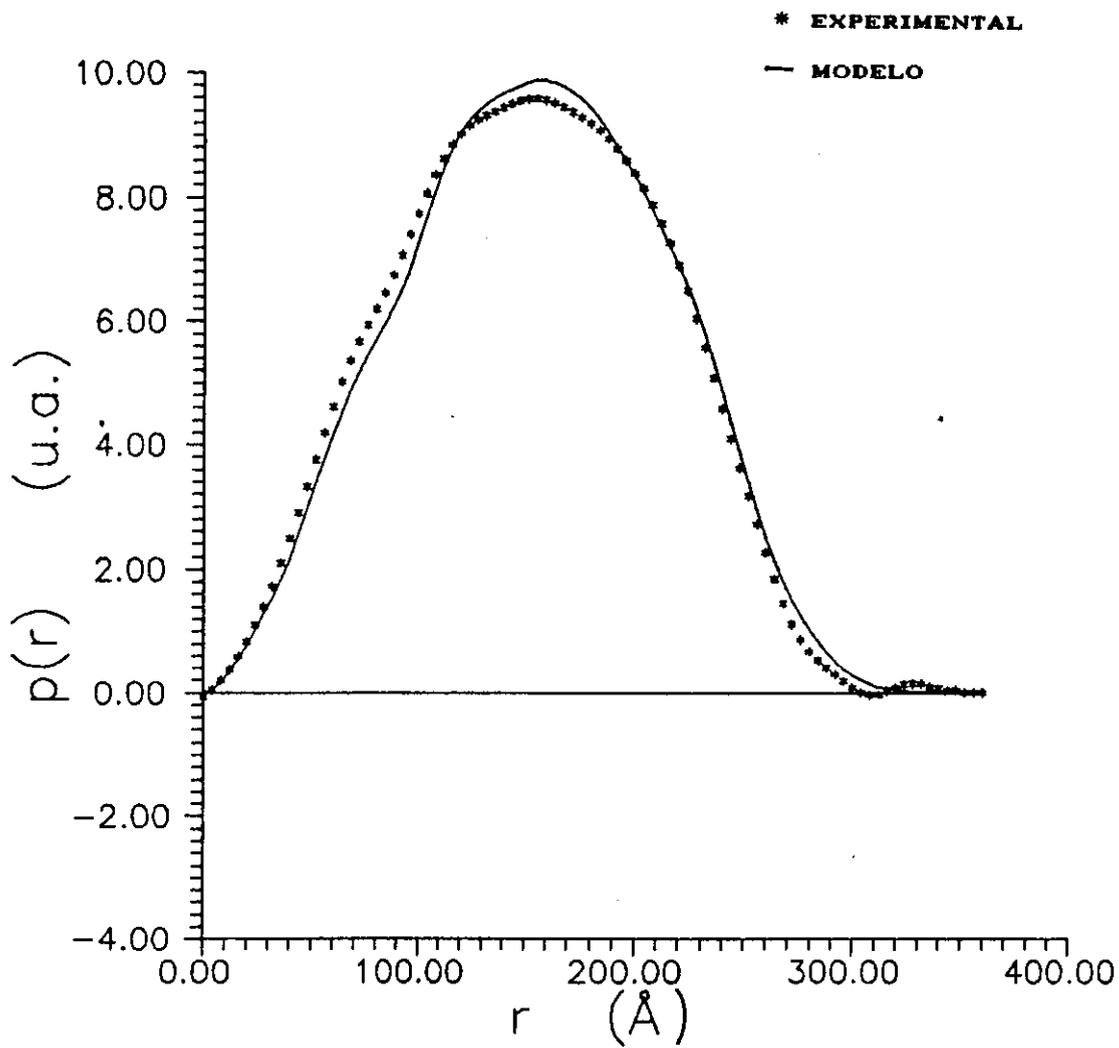
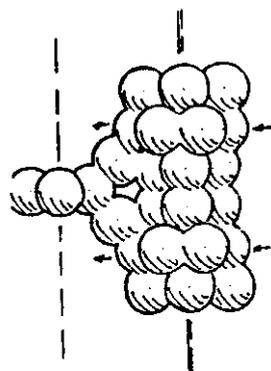


Figura IV.21

MODELO 284



(a)

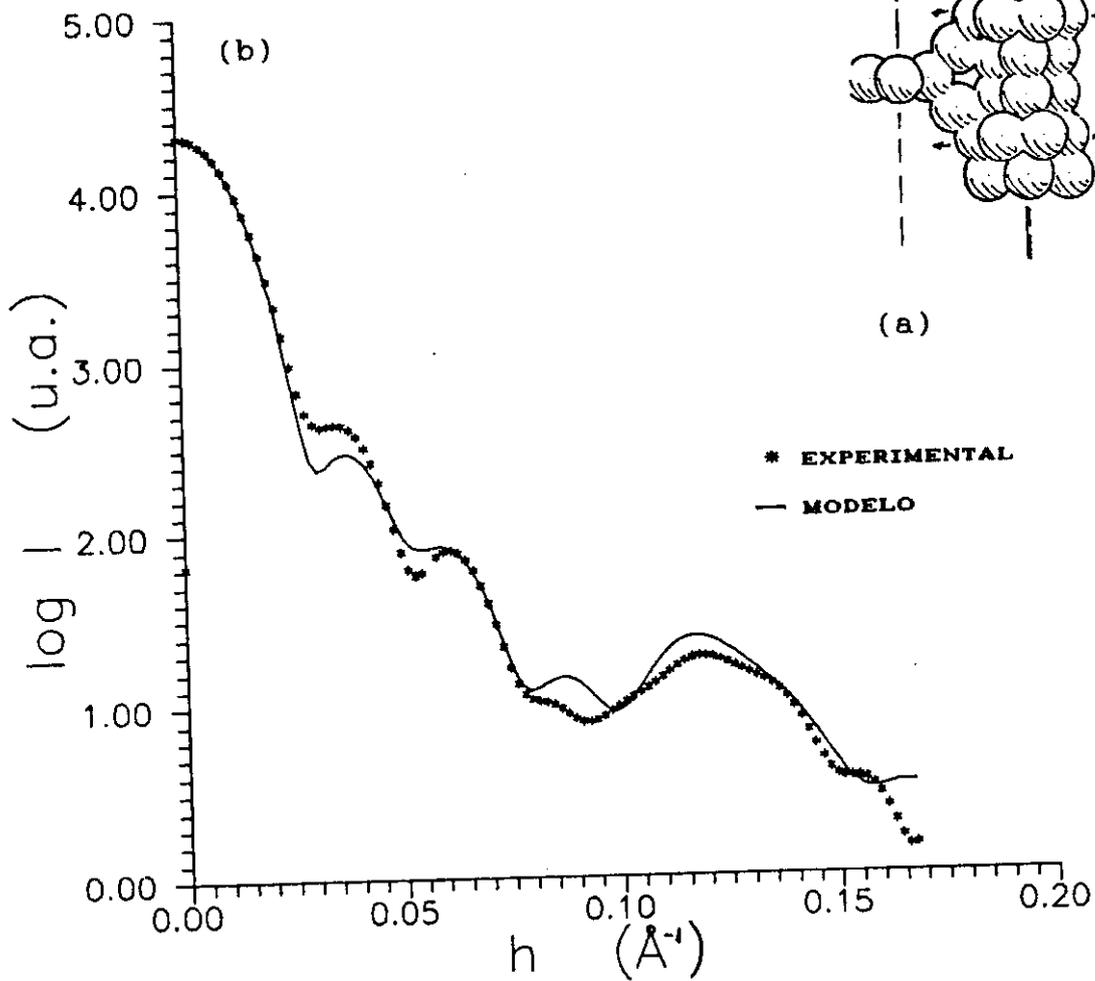


Figura IV.22

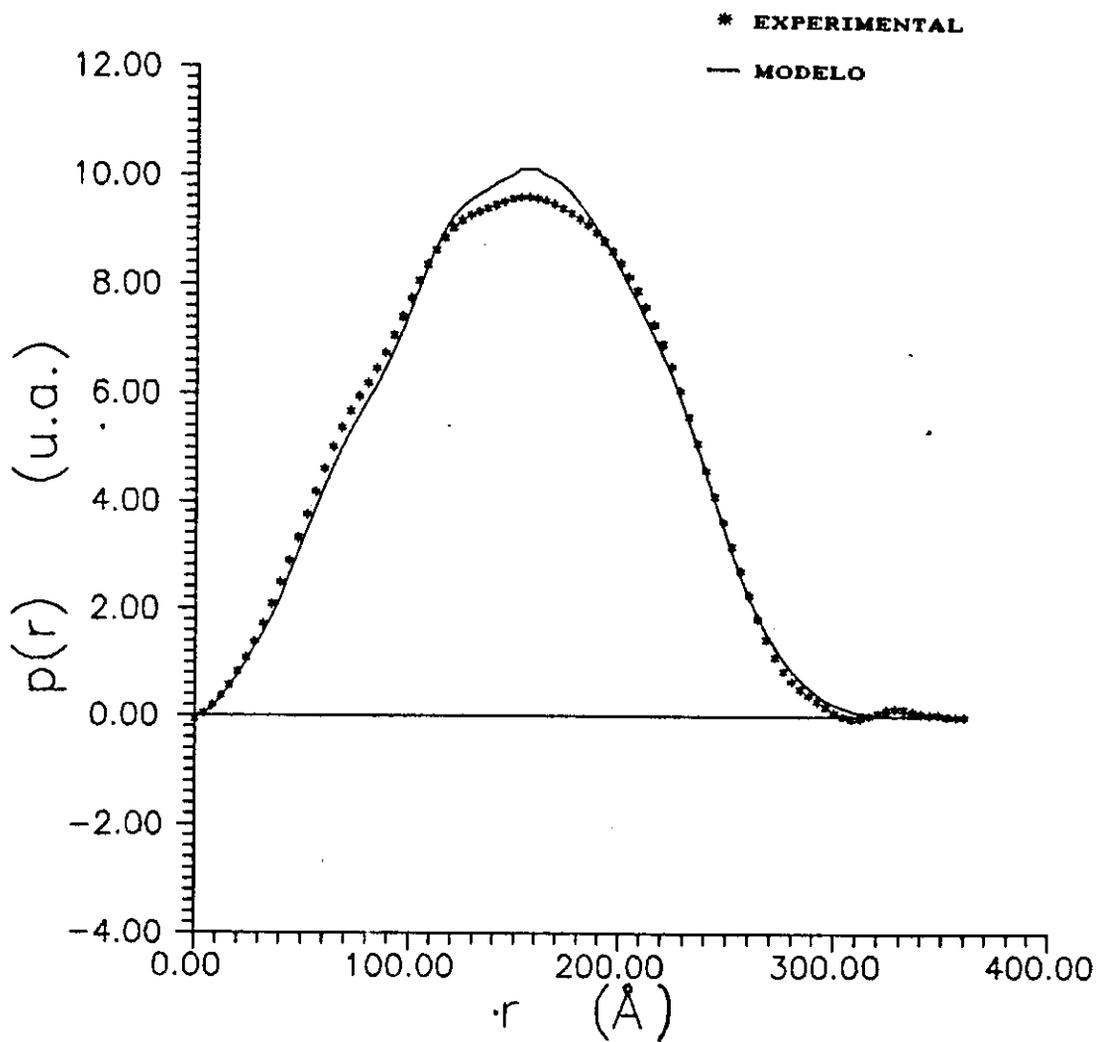


Figura IV.23

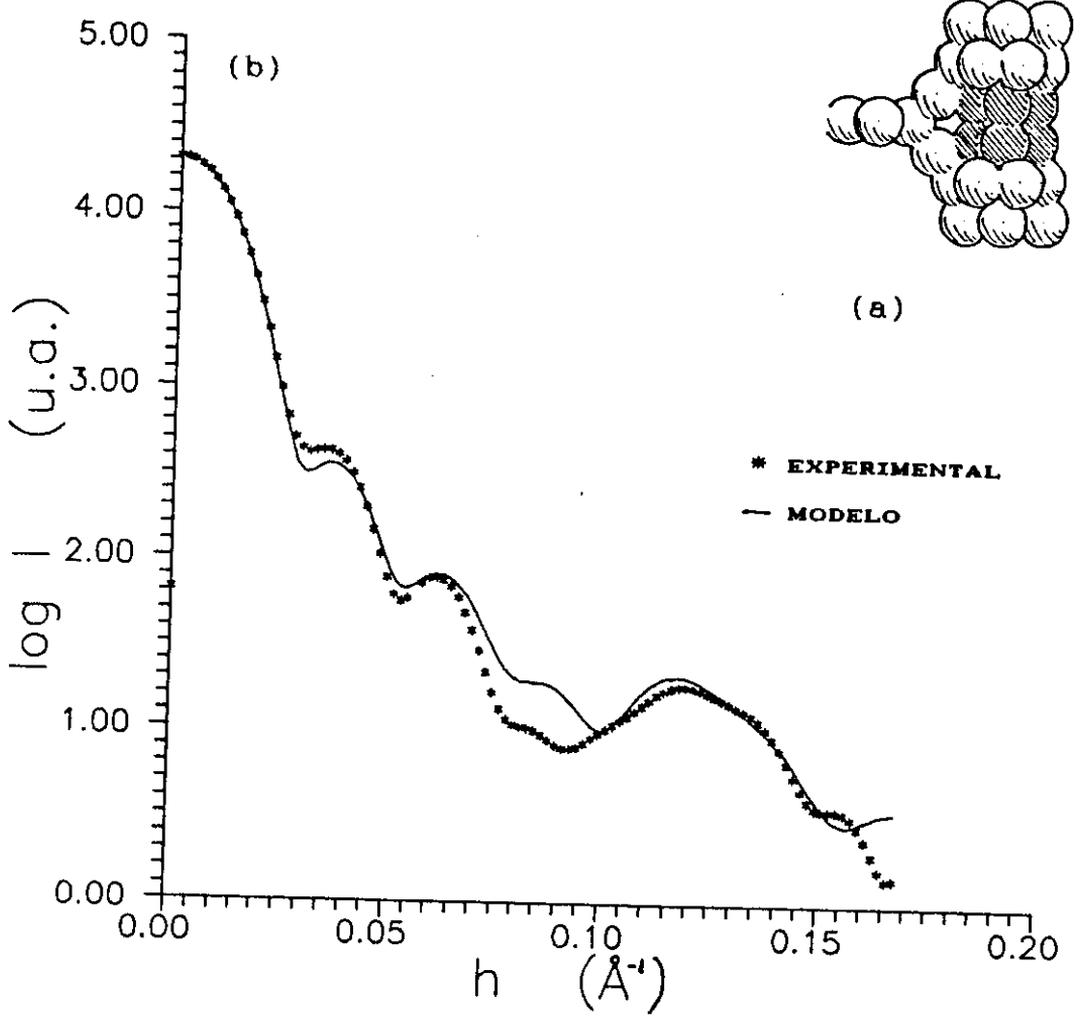


Figura IV.24

intensidades dos picos da função de espalhamento, assim como variações na função $p(r)$ devido a inhomogeneidades. Vemos, na Fig.IV.24b, que houve um melhor ajuste do 1º pico e da banda na curva de $\log I(h) \times h$, mas que se perdeu o ajuste do 3º pico. A $p(r)$ se aproximou bastante da experimental, principalmente nas laterais, mas seu máximo ficou com valor mais alto ainda (Fig.IV.25).

Para tentar obter um ajuste melhor da banda na curva $\log I(h) \times h$, modificamos novamente a distância do conjunto de 6 esferas em relação ao eixo central da molécula (Fig.IV.26a). Os resultados podem ser vistos nas Figs.IV.26b e IV.27.

A seguir, modificamos a distância entre as esferas do conjunto das 4 mais externas da subunidade principal para tentar melhorar o ajuste do 3º pico (Fig.IV.28a). Nas Figs.IV.28b e IV.29, temos as curvas obtidas.

Para ajustar melhor as intensidades, diminuimos o peso do conjunto de 4 esferas mais externas da estrutura 1/12 e, também, das esferas de ligação para 0,5. Ficaram, portanto, 0,5 abaixo do resto da molécula e 1,0 abaixo do outro conjunto de 4 esferas (Fig.IV.30a). Aumentamos, desse modo, as inhomogeneidades dentro da molécula e, conseqüentemente, deveriam ocorrer modificações nas intensidades dos picos na curva de $\log I(h) \times h$ e variações na função $p(r)$. De acordo com a Fig.IV.30b, a intensidade do 1º pico realmente se aproximou bastante da experimental, mas o resto da curva ficou desajustado. Em relação a $p(r)$ (Fig.IV.31), apesar do ajuste não ter ficado bom, sua forma e seu valor no máximo se aproximaram bem do experimental.

Aumentamos os pesos do conjunto de 4 esferas mais externas da subunidade 1/12 e das esferas de ligação de 0,5 para 0,7, diminuindo o contraste com o resto da molécula (Fig.IV.32a). Melhorou o ajuste dos picos 1 e 2 e da banda da função de espalhamento (Fig.IV.32b). Quanto à função distribuição de distâncias (Fig.IV.33), se ajustou melhor nas laterais, mas piorou

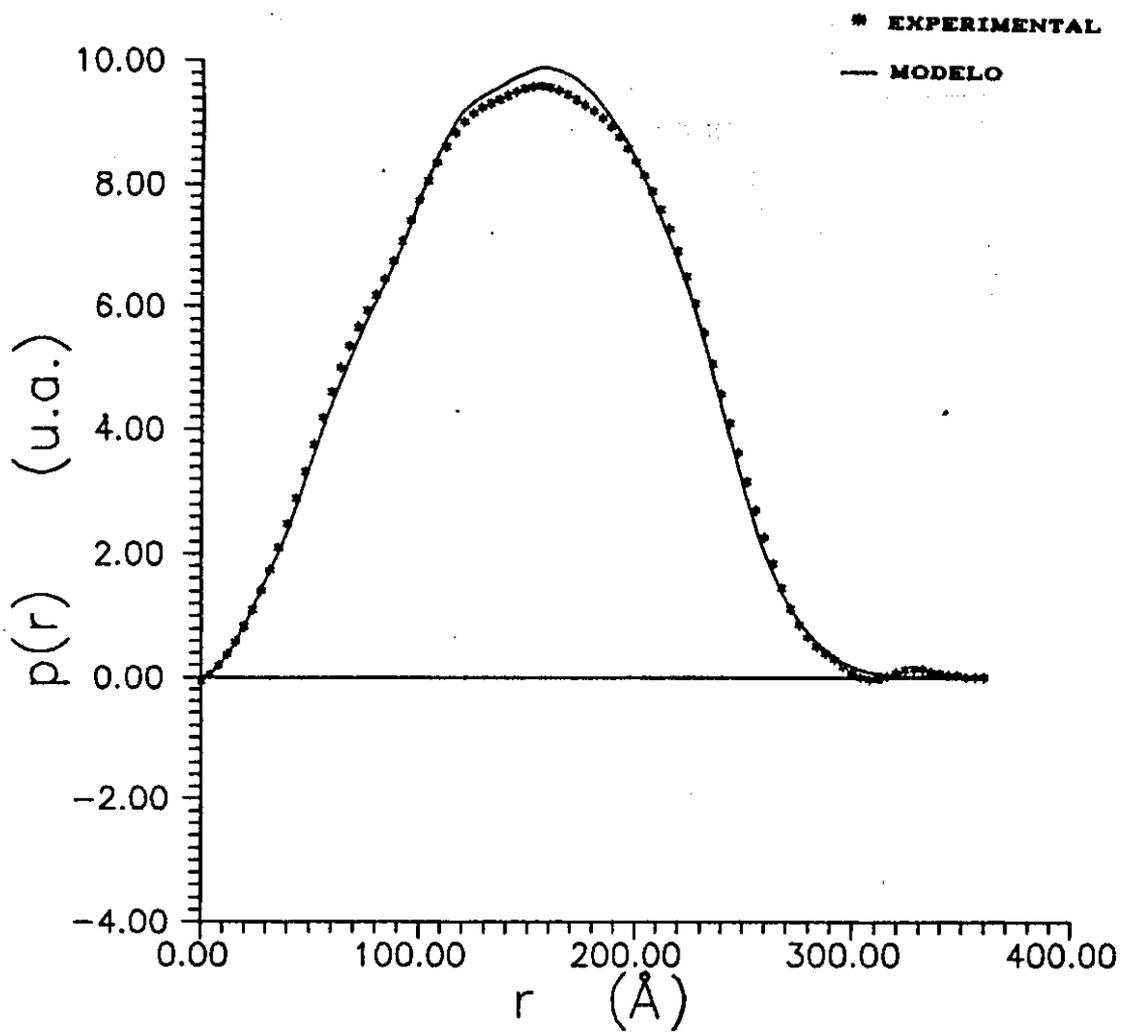


Figura IV.25

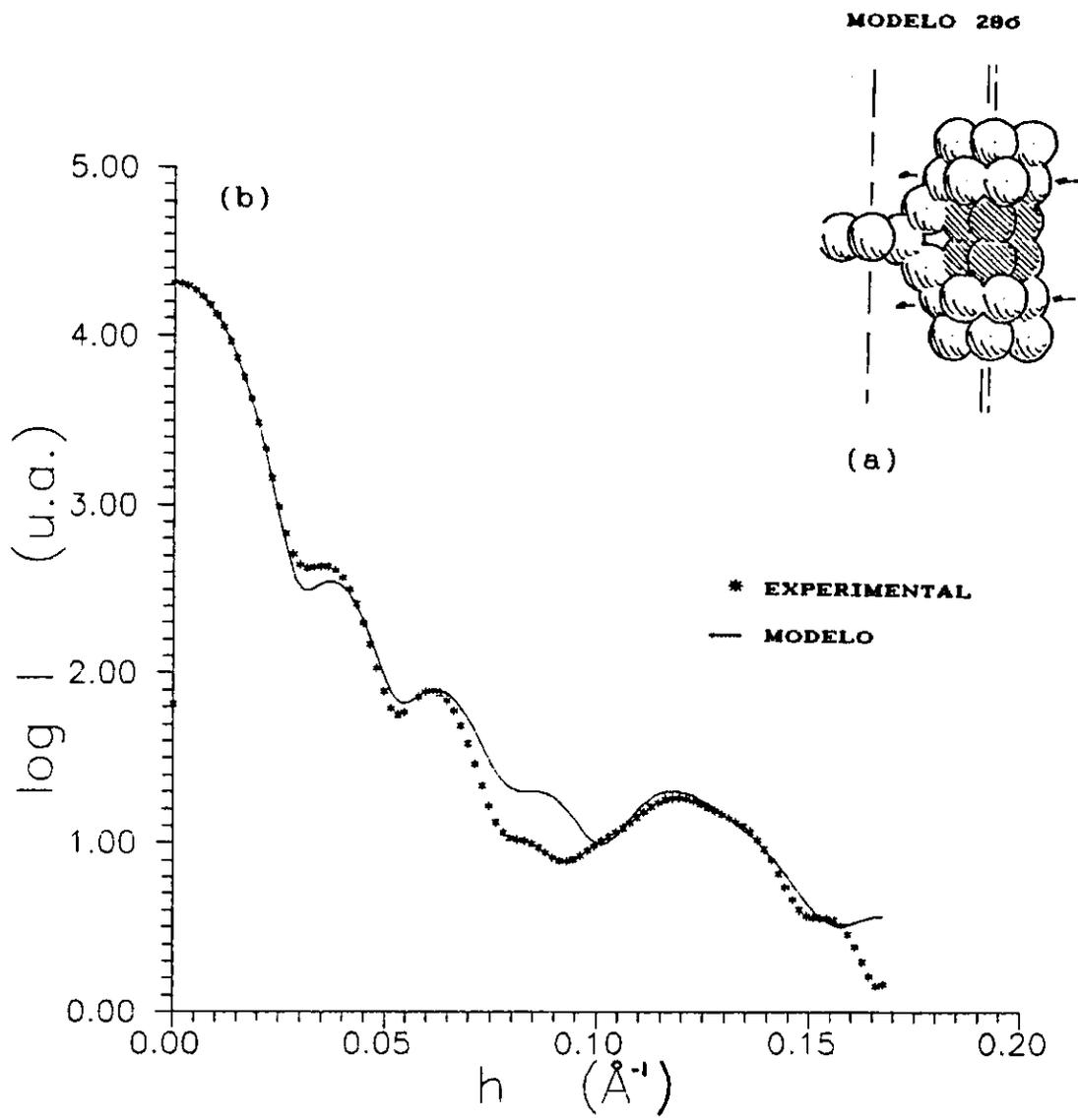


Figura IV.26

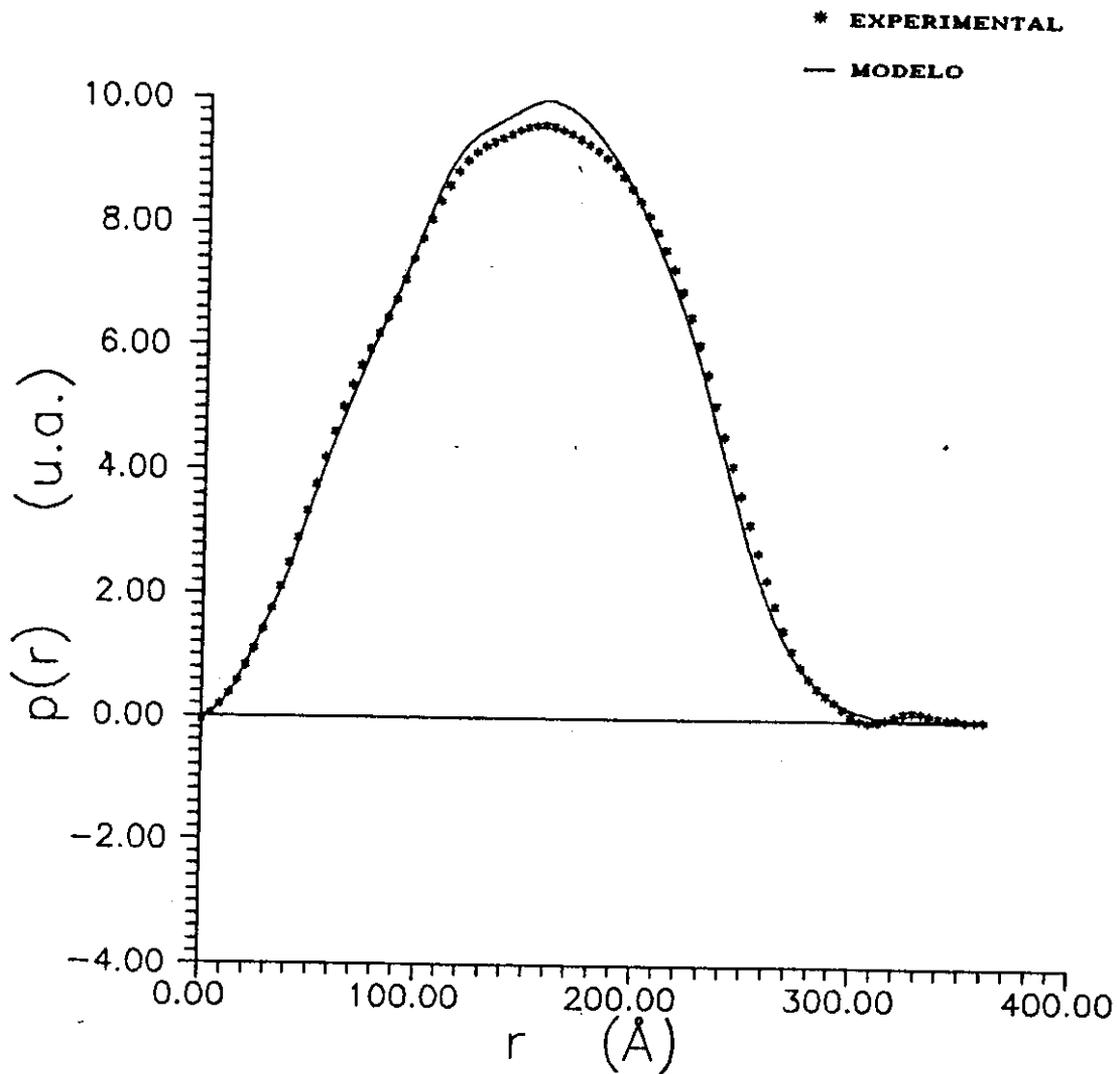


Figura IV.27

MODELO 288

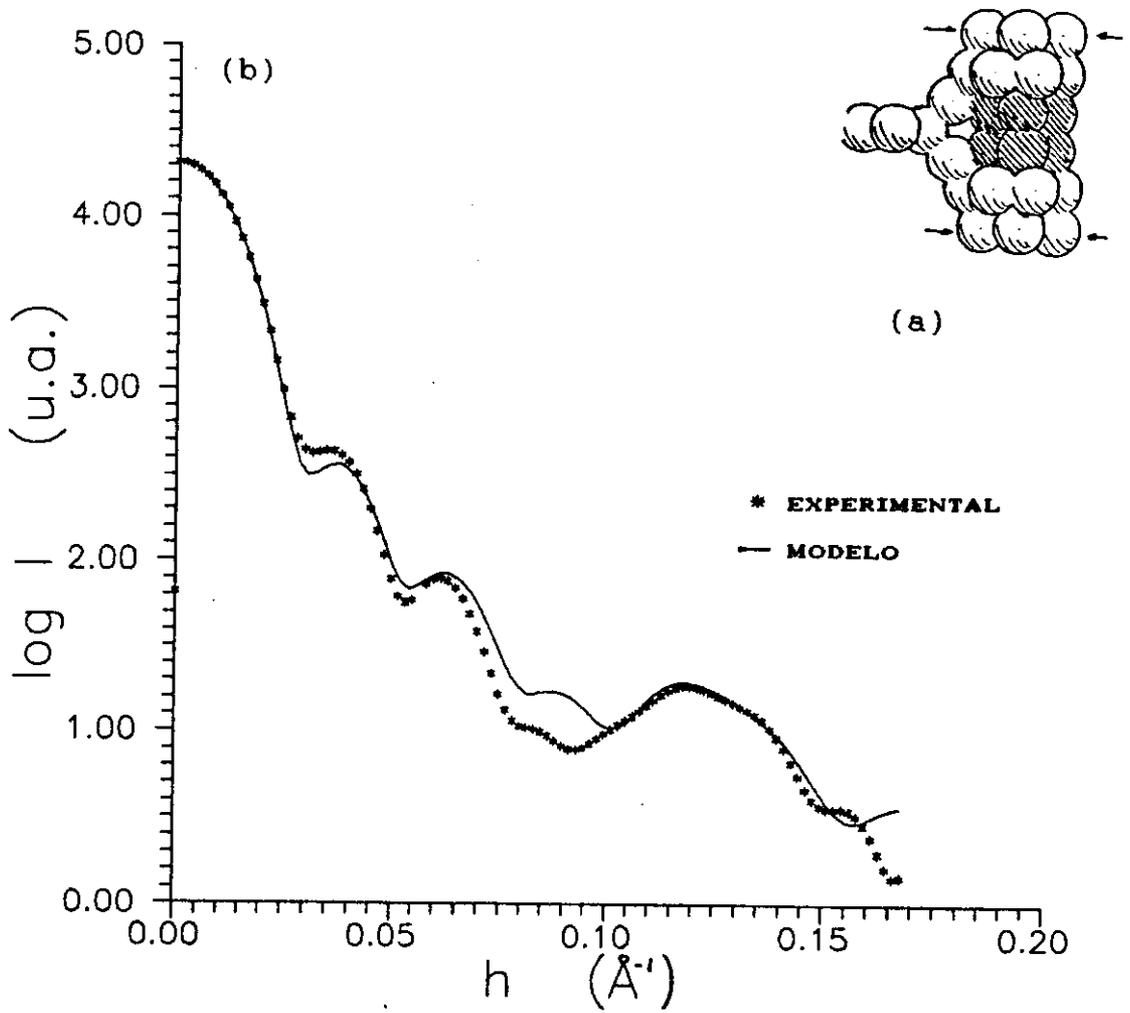


Figura IV.28

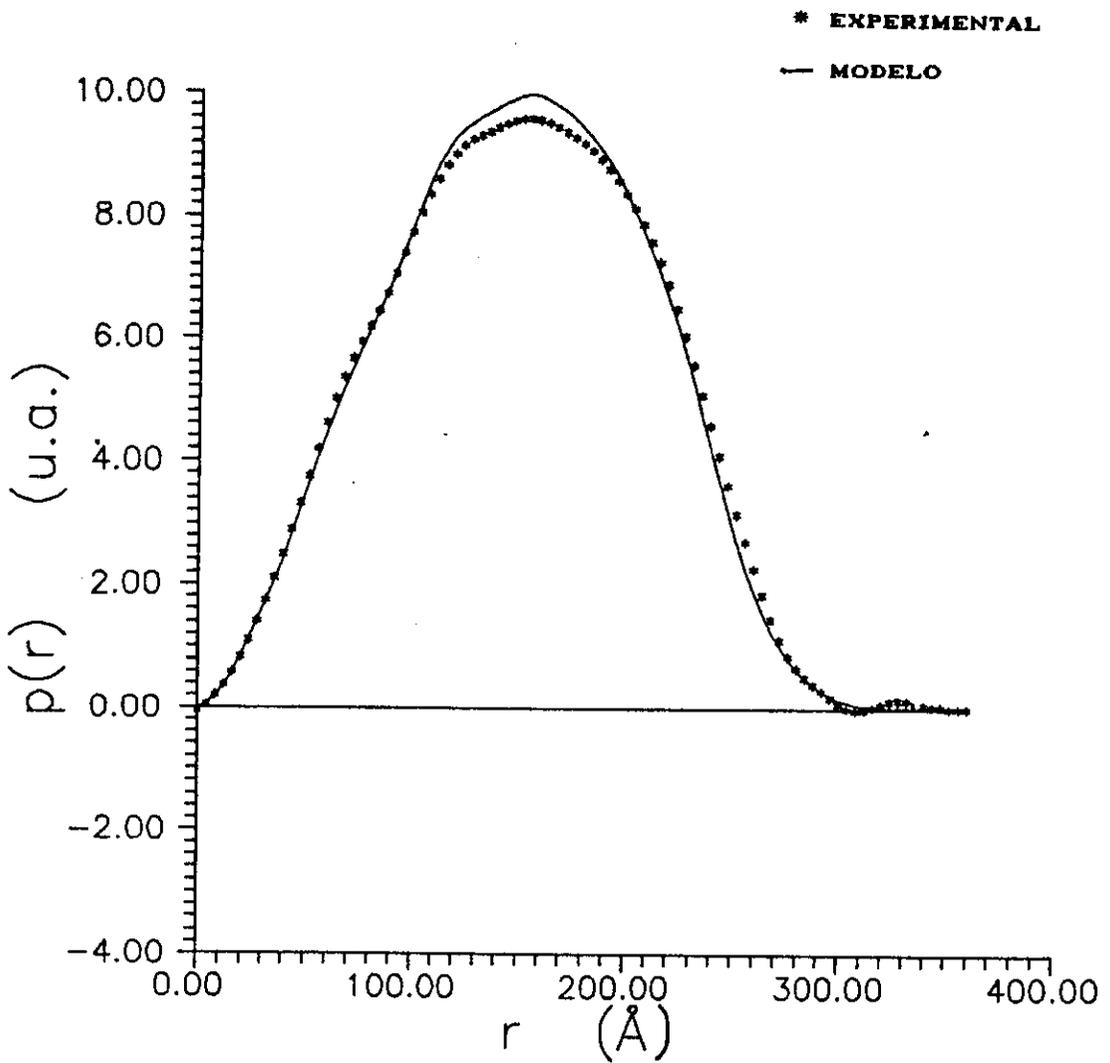


Figura IV.29

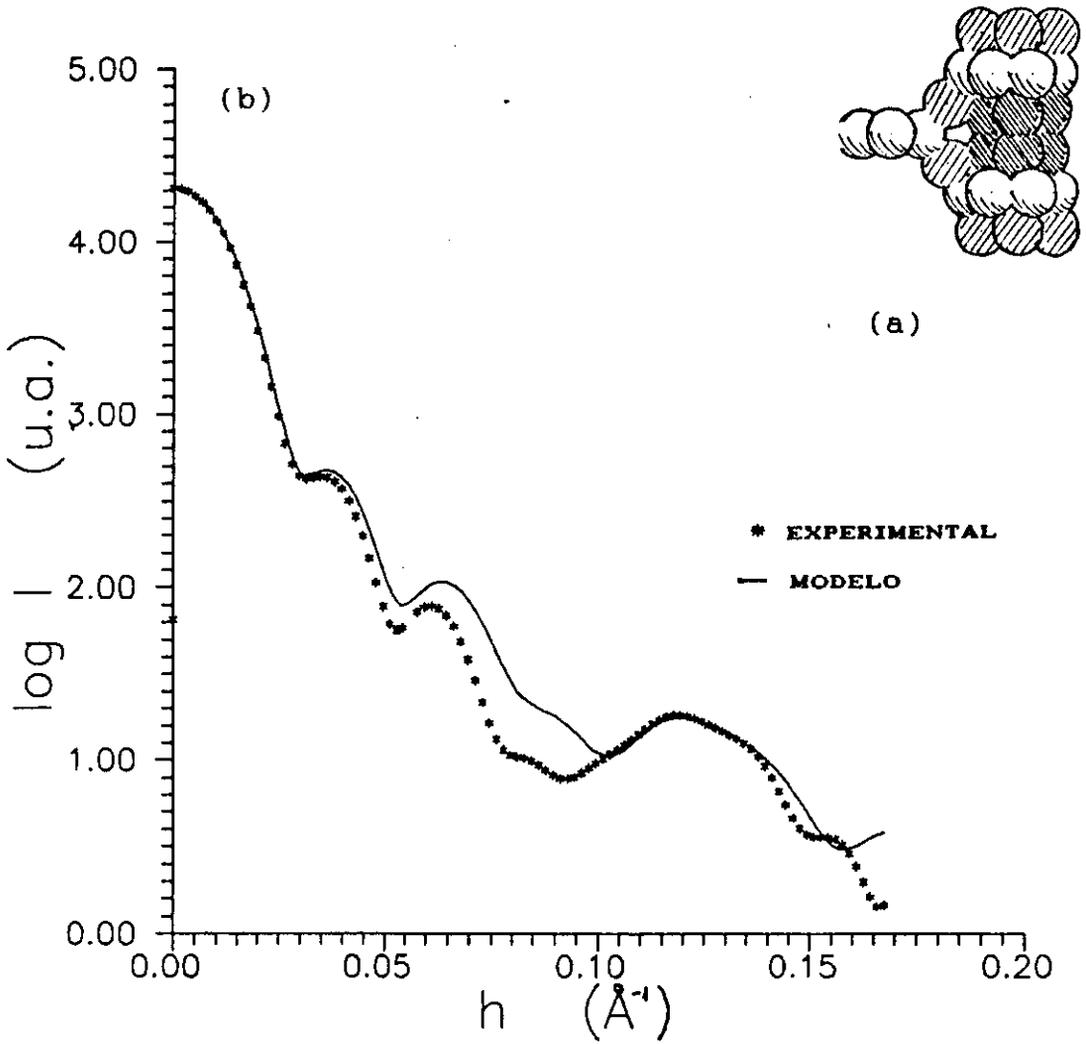


Figura IV. 30

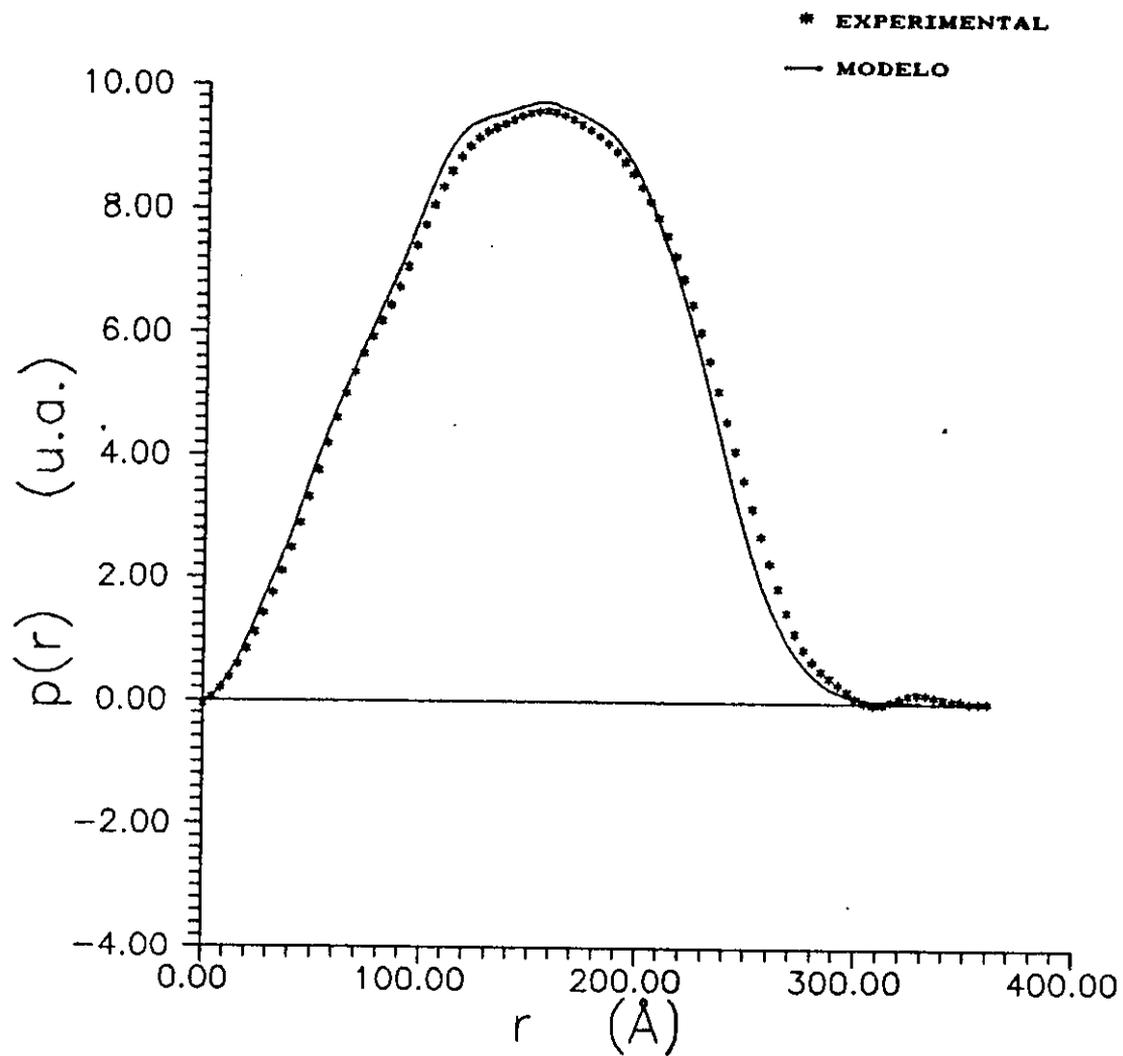


Figura IV. 31

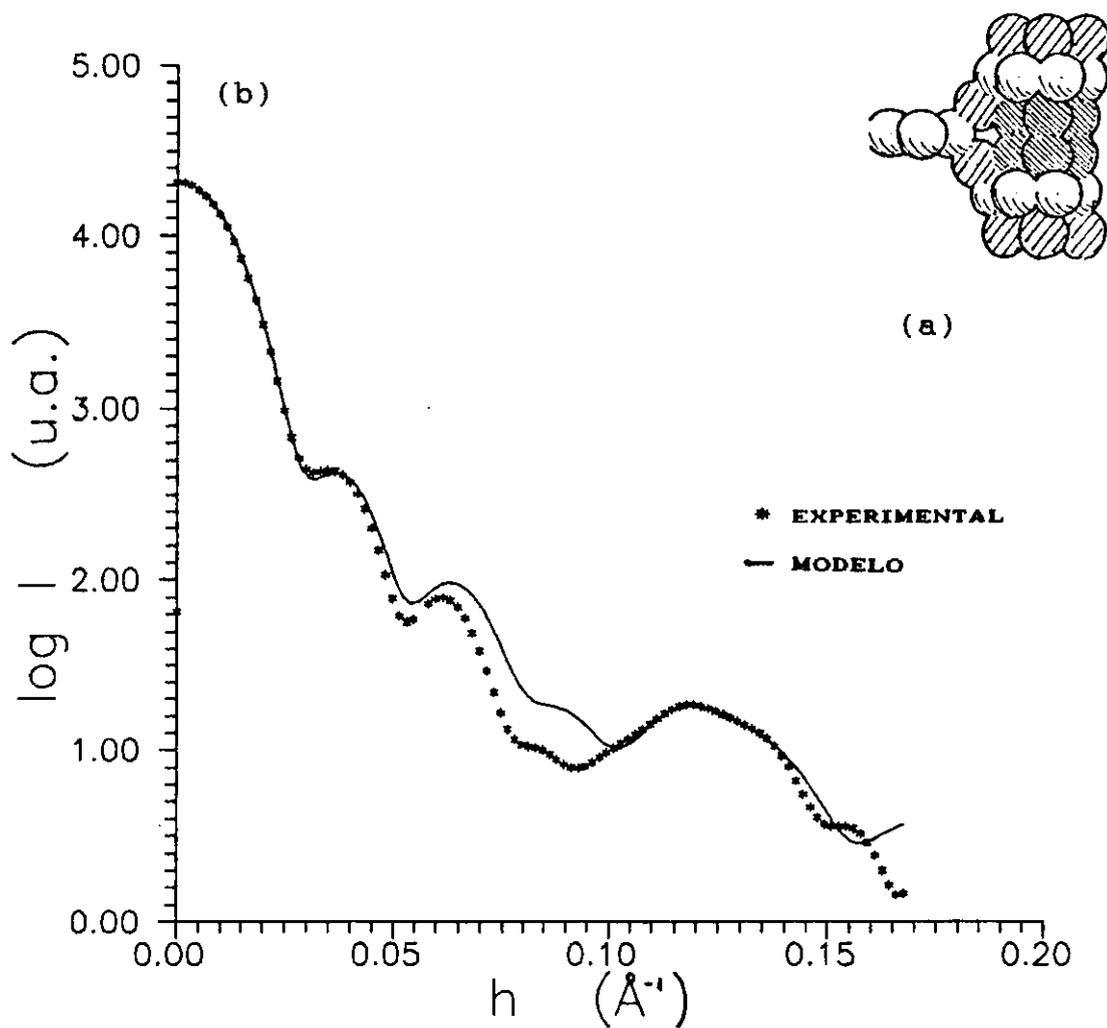


Figura IV.32

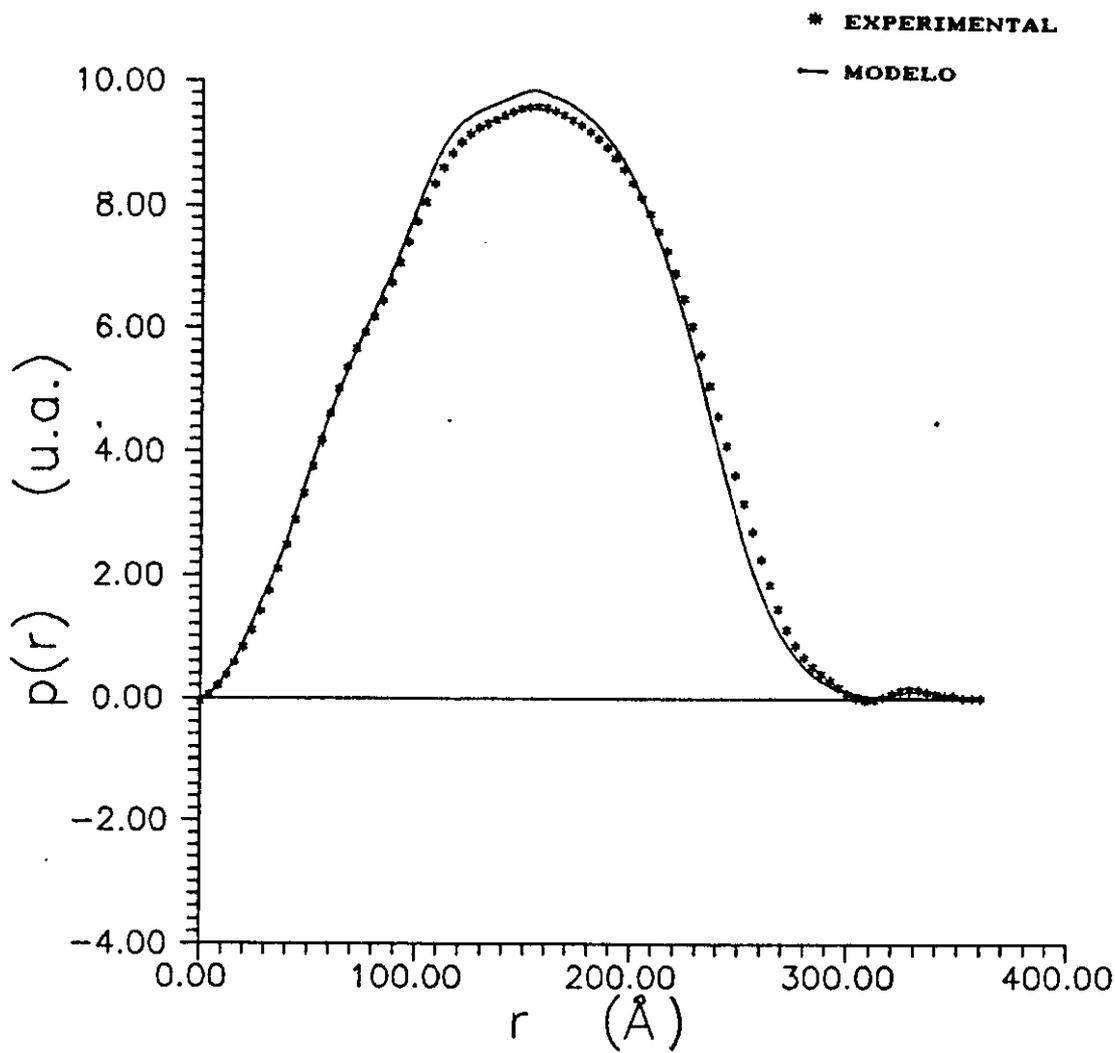


Figura IV.33

no máximo.

Mudamos as distâncias dos conjuntos de 4 esferas da subunidade principal em relação ao eixo central da molécula (Fig.IV.34a). Suas duas curvas, muito boas, podem ser vistas nas Figs.IV.34b e IV.35.

Aumentamos a distância entre as esferas do conjunto de 4 mais internas da estrutura principal (Fig.IV.36a) para melhorar o ajuste dos picos 2 e 3 na curva de espalhamento. Os resultados podem ser vistos nas Figs.IV.36b e IV.37.

Modificamos o peso das esferas de ligação para obtermos um melhor ajuste do máximo da função distribuição de distâncias (Fig.IV.38a). Melhorou a forma do 3º pico na curva de espalhamento (Fig.IV.38b). A $p(r)$ se ajustou quase que perfeitamente (Fig.IV.39).

A partir deste último modelo, tentamos dois caminhos com o objetivo de obter um ajuste melhor da função de espalhamento sem piorar o da função $p(r)$. No primeiro, mudamos o peso do conjunto de 6 esferas da subunidade 1/12 de 1,0 para 0,9 (Fig.IV.40a). Os resultados foram muito bons conforme podemos ver nas Figs.IV.40b e IV.41. No outro, primeiro, aumentamos a distância entre as esferas do conjunto das 4 mais internas da estrutura principal para melhorar o ajuste dos picos 2 e 3 da curva $\log I(h) \times h$ (Fig.IV.42a). Podemos ver as funções resultantes nas Figs.IV.42b e IV.43. Em seguida, reduzimos o peso do conjunto de 6 esferas da estrutura 1/12 de 1,0 para 0,95 (Fig.IV.44a). Nas Figs.IV.44b e IV.45, temos os resultados. Por último, diminuimos o peso das esferas de ligação de 0,6 para 0,55 (Fig.IV.46a). As curvas obtidas estão nas Figs.IV.46b e IV.47.

Os dois modelos finais são muito semelhantes e podem ser vistos nas Figs.IV.48a e b. As respectivas curvas de espalhamento calculadas (Figs.IV.40b e IV.46b) diferem da experimental dentro dos limites de erro. As funções $p(r)$ se ajustam muito bem (Figs.IV.41 e IV.47). Os valores de R_g obtidos

para estes modelos foram 115A (Fig. IV. 48a) e 115,2A (Fig. IV. 48b). O D_{\max} determinado foi de $\sim 312A$ para ambos.

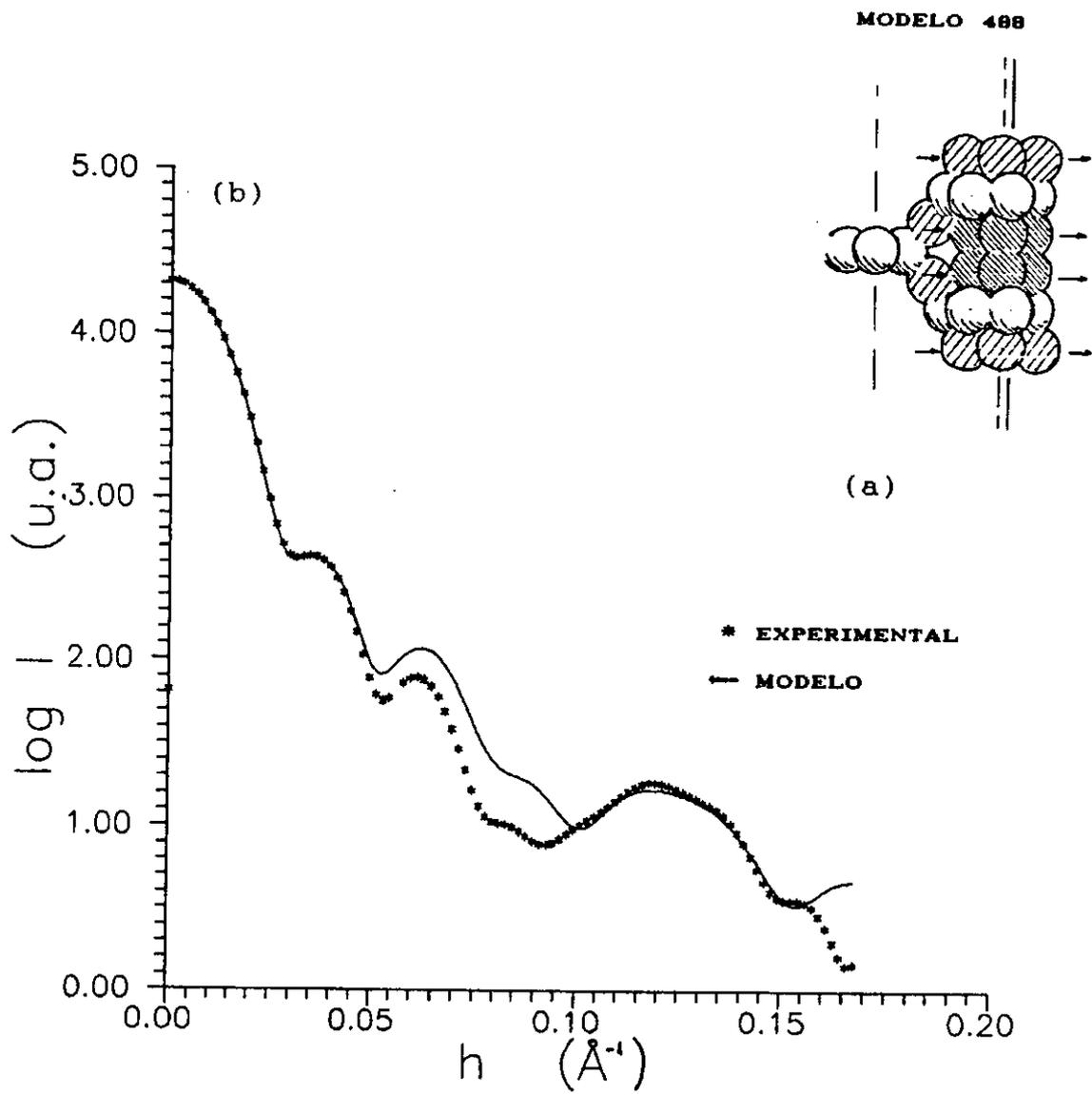


Figura IV.34

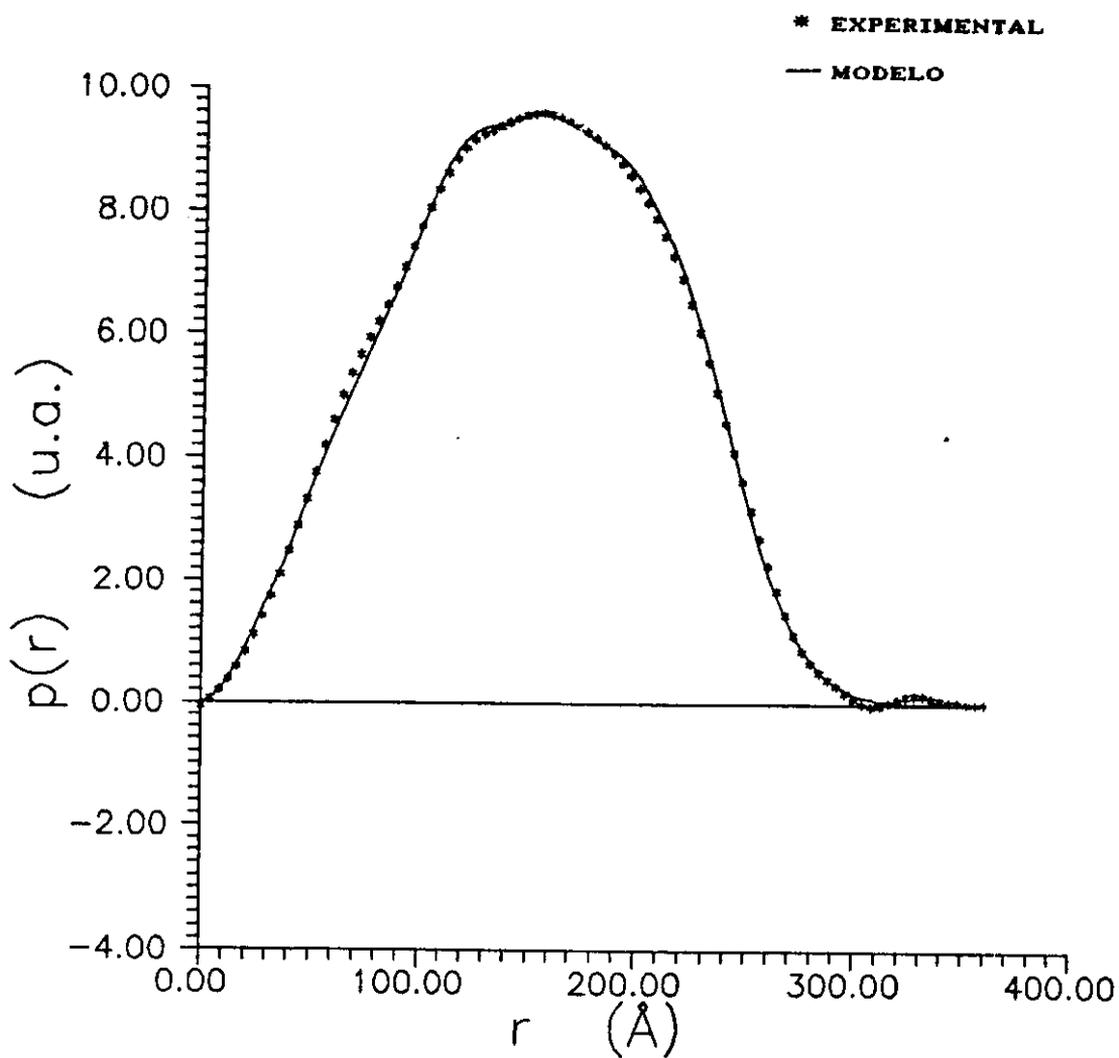


Figura IV.35

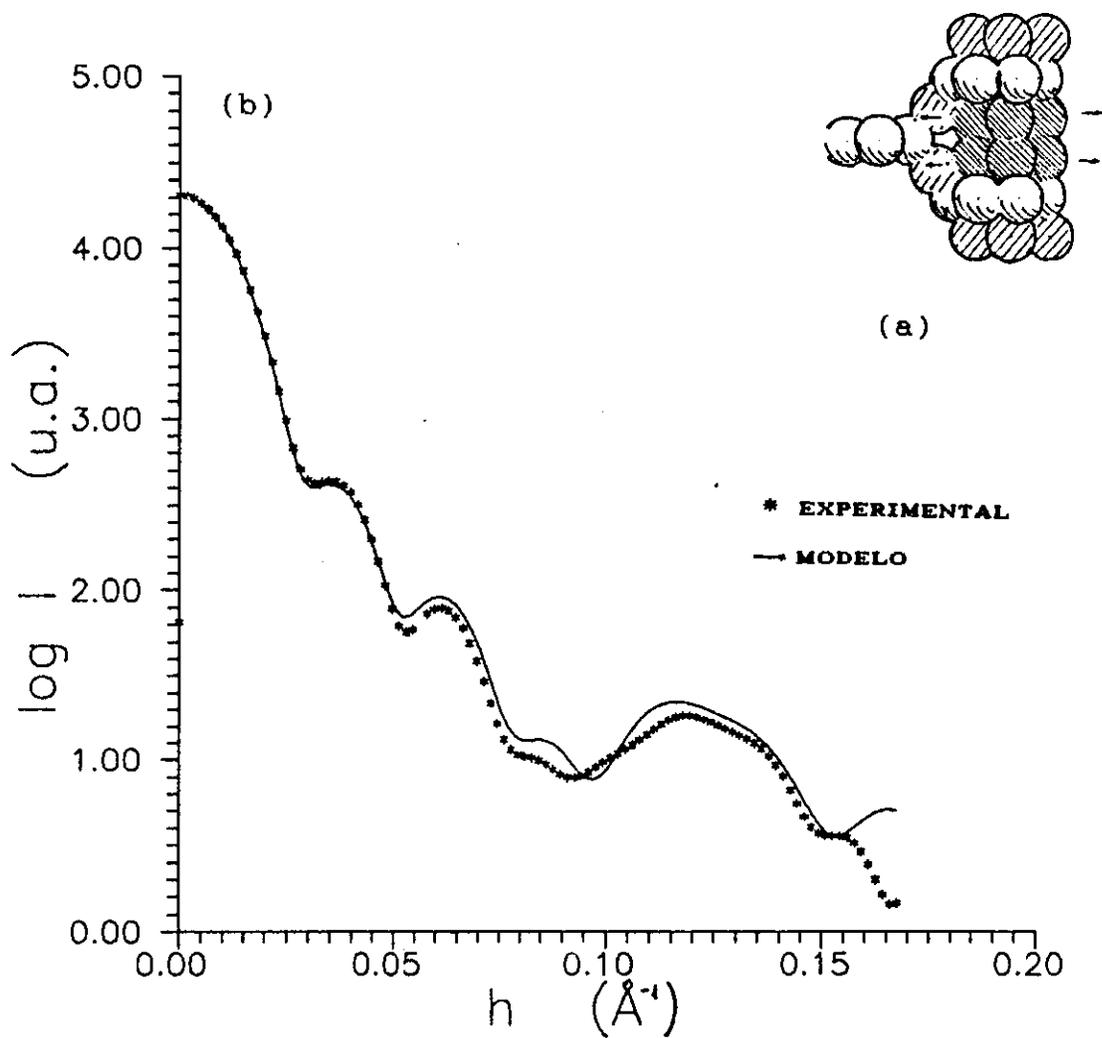


Figura IV.36

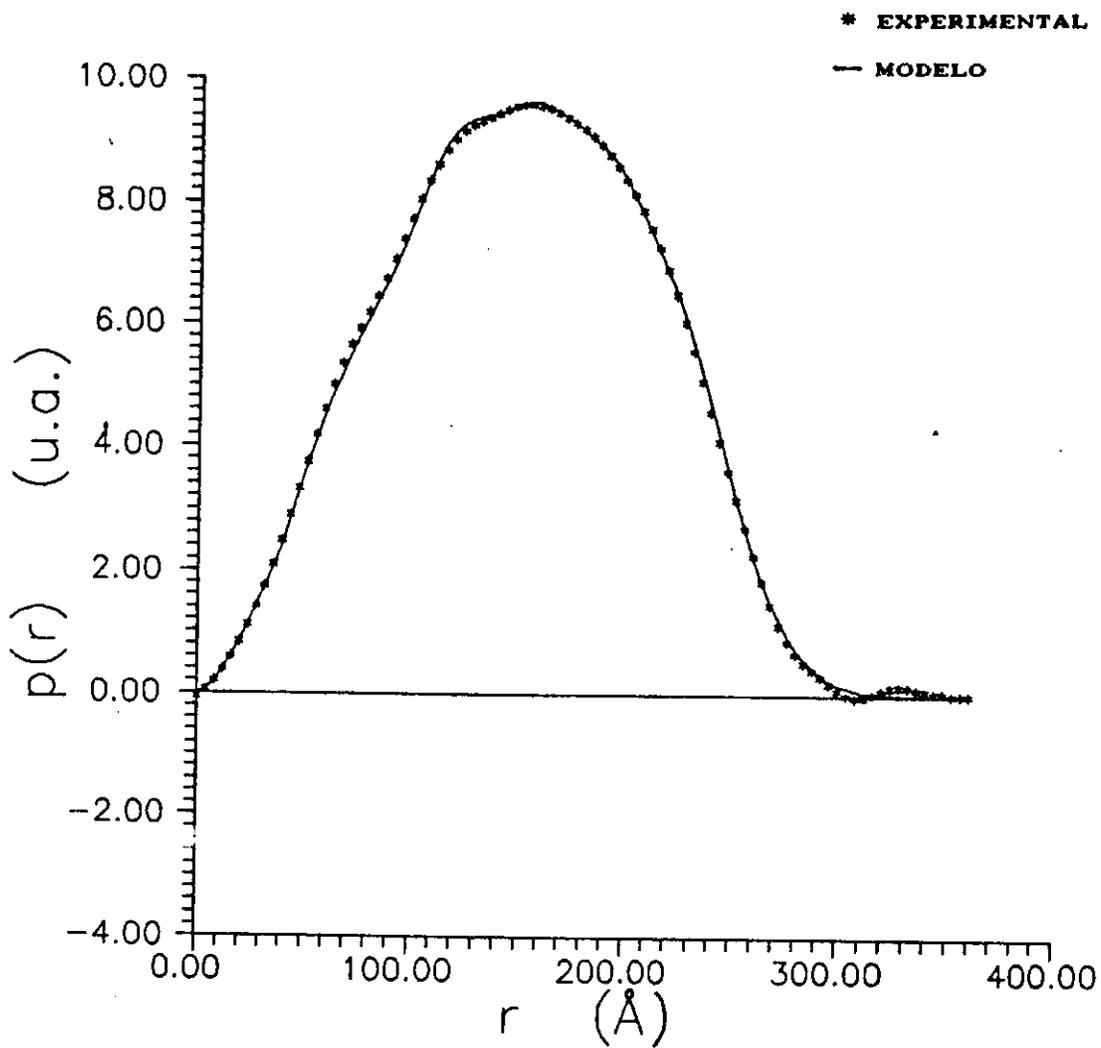


Figura IV.37

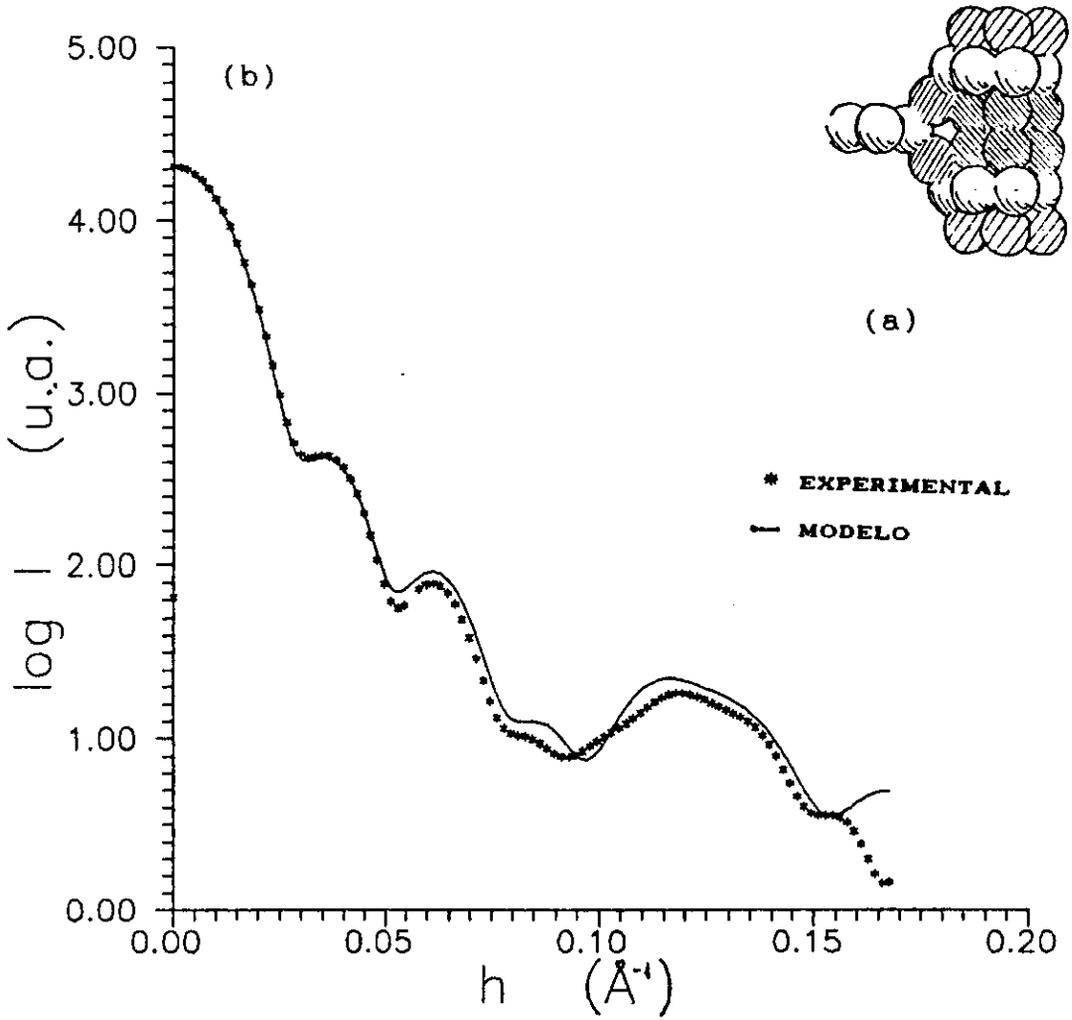


Figura IV. 38

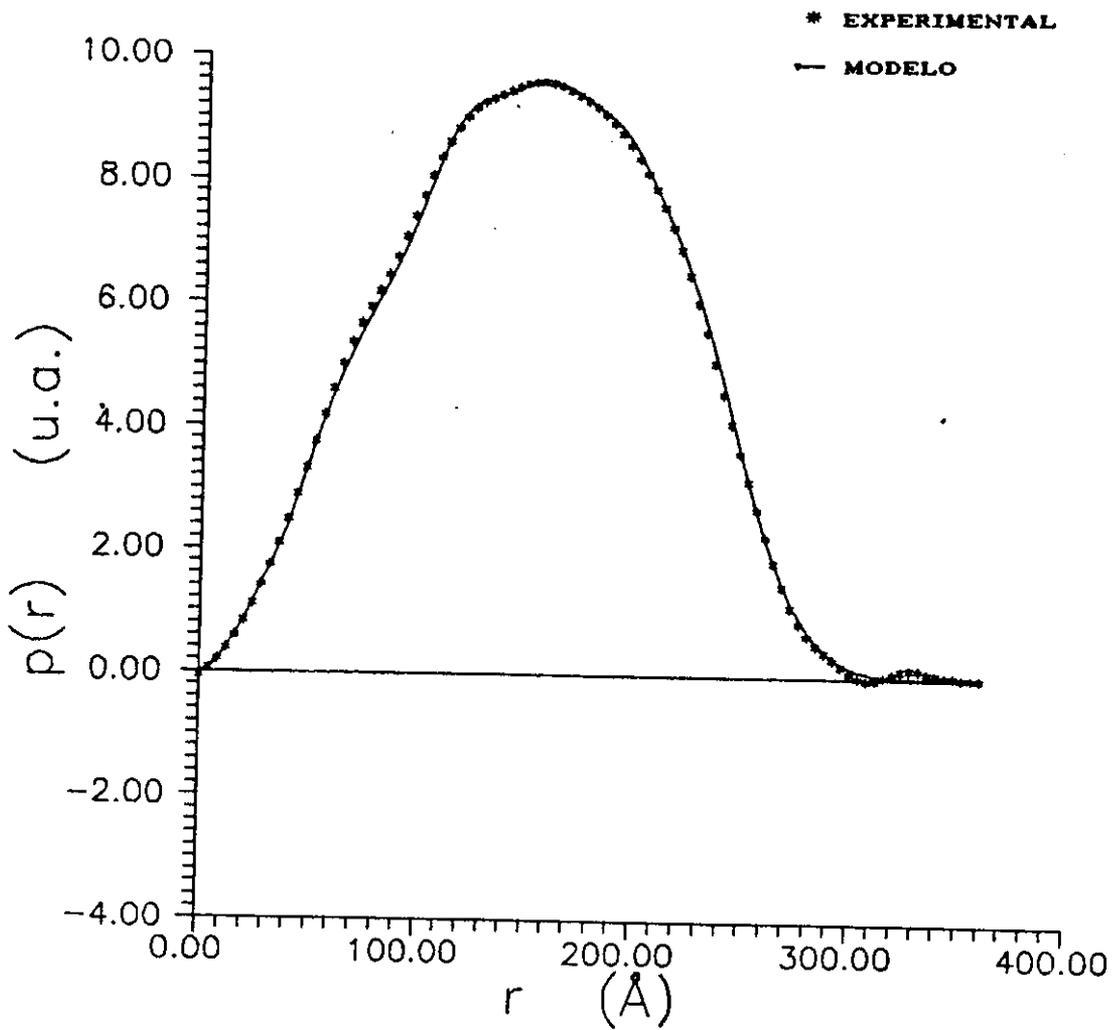


Figura IV.39

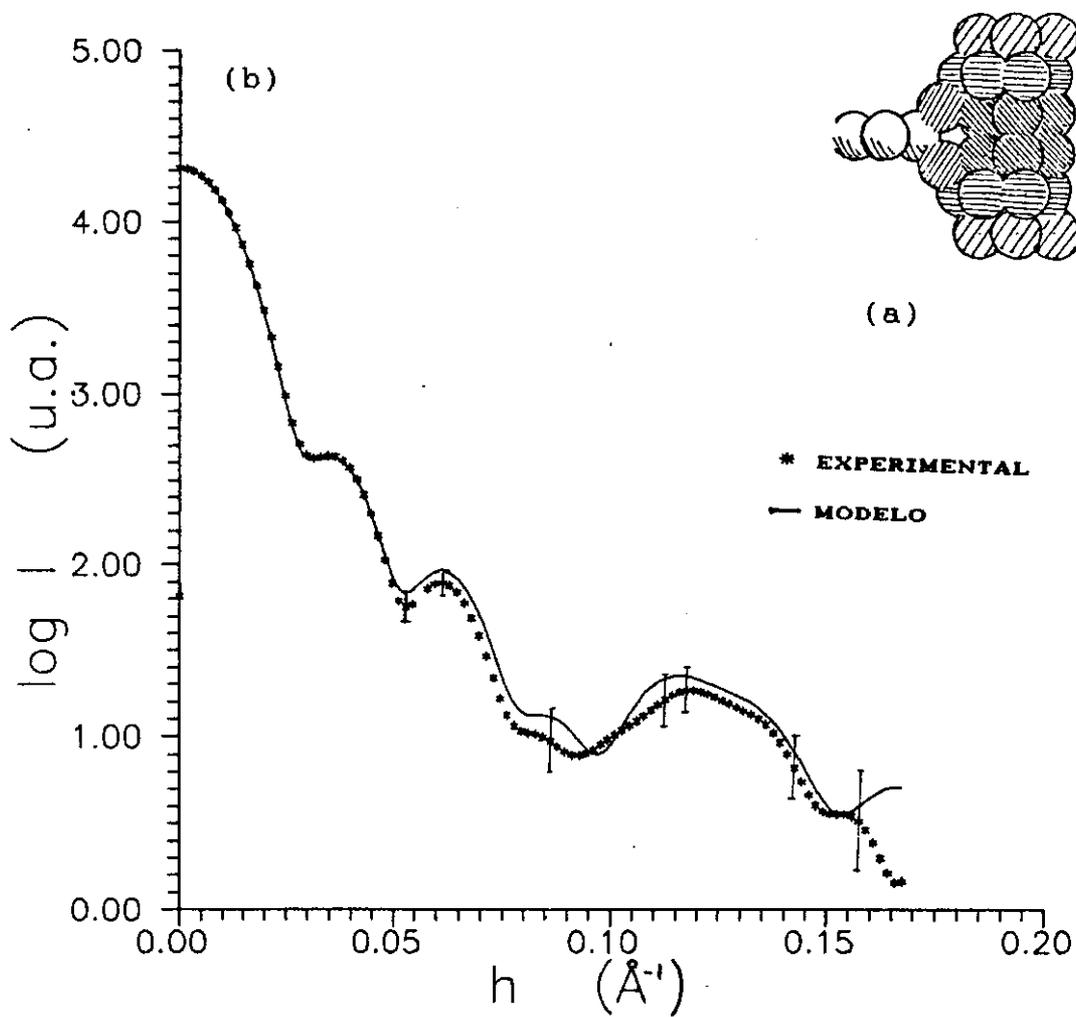


Figura IV. 40

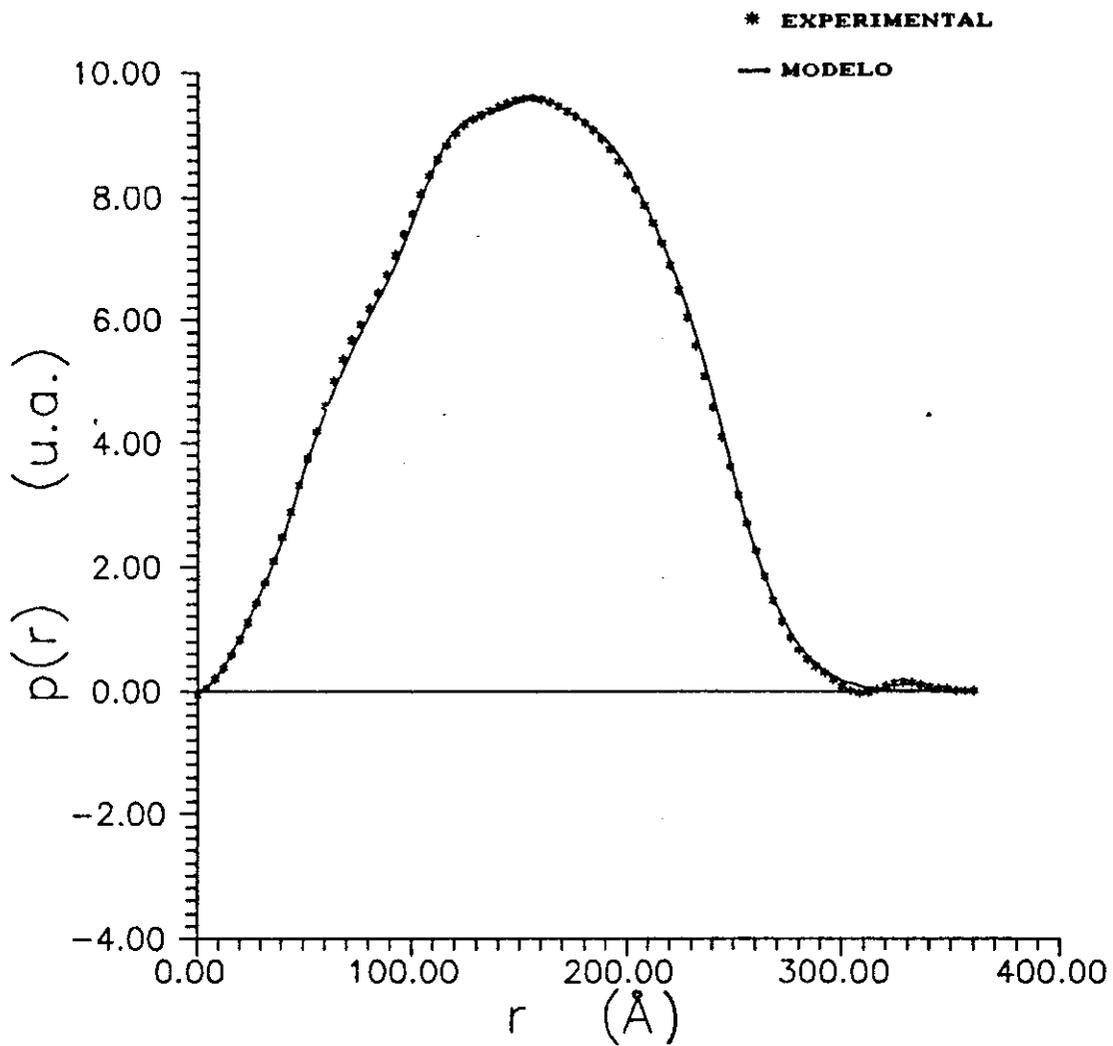


Figura IV. 41

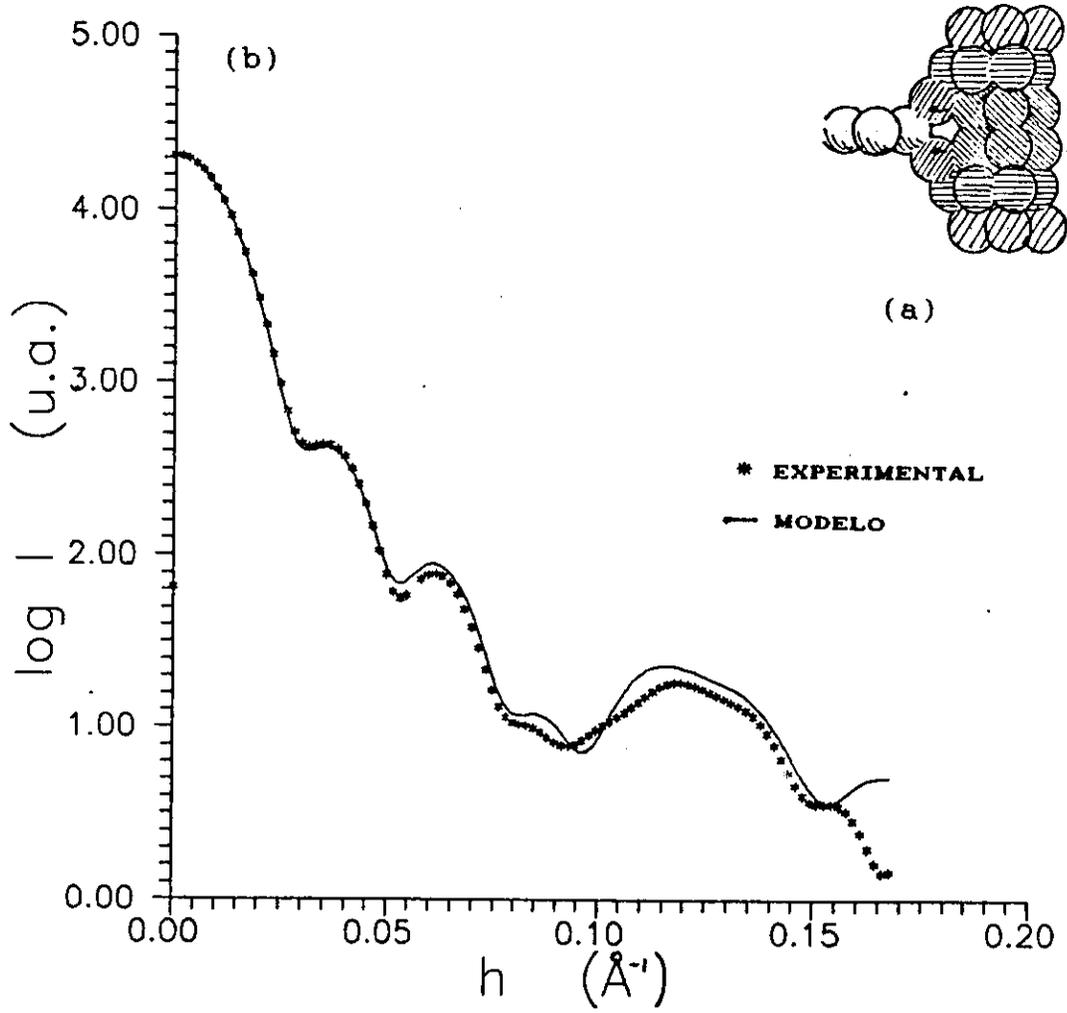


Figura IV. 42

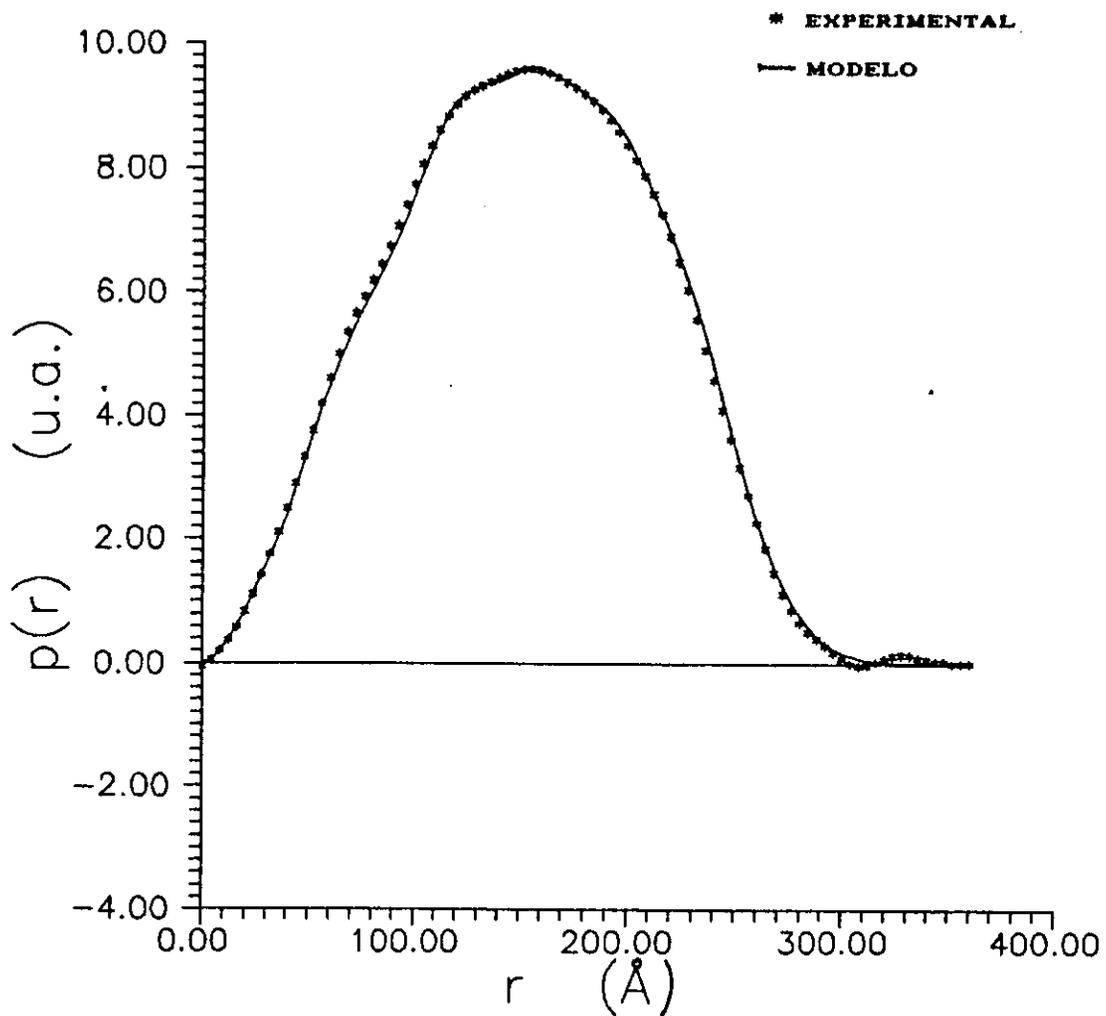


Figura IV.43

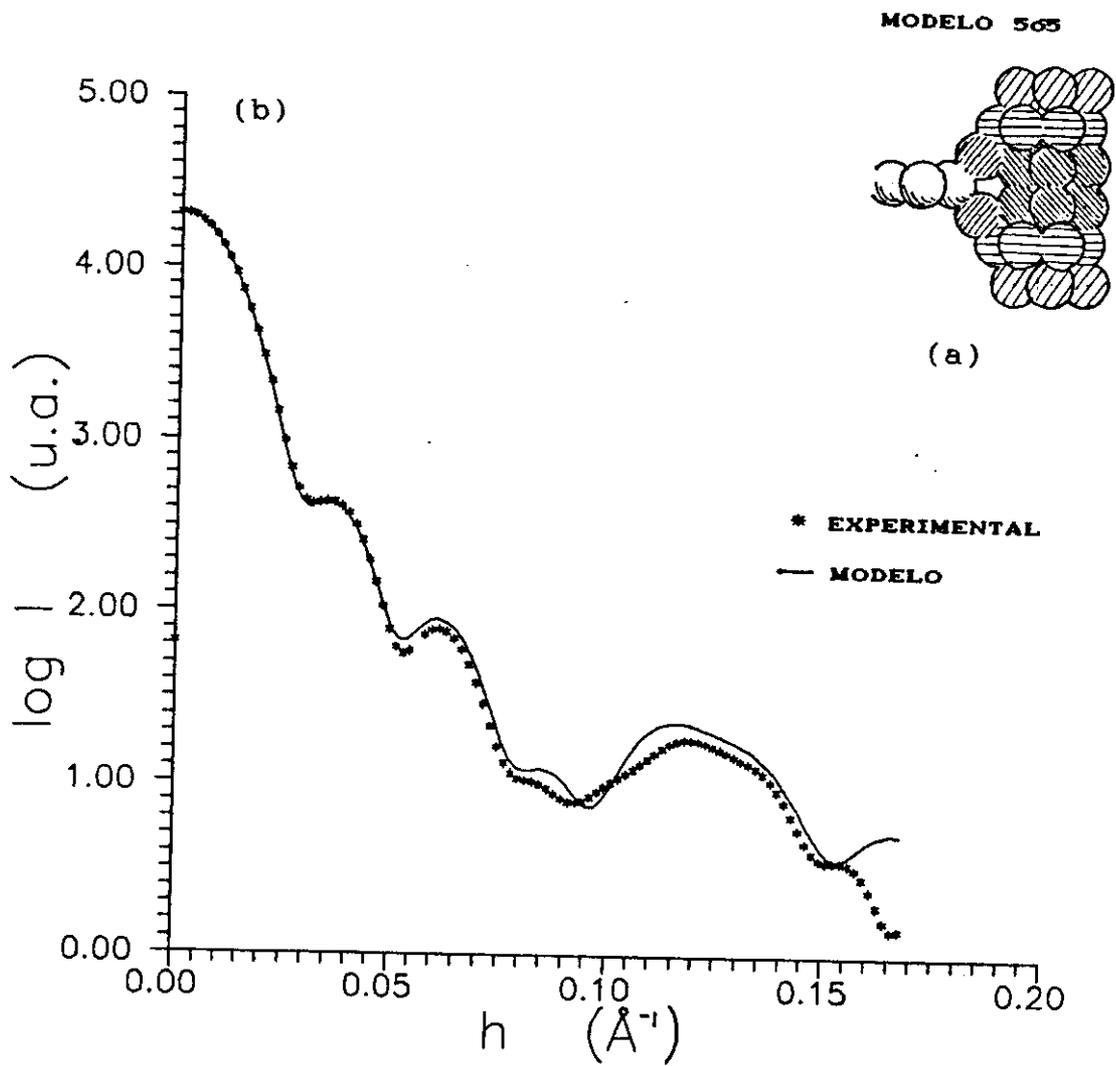


Figura IV. 44

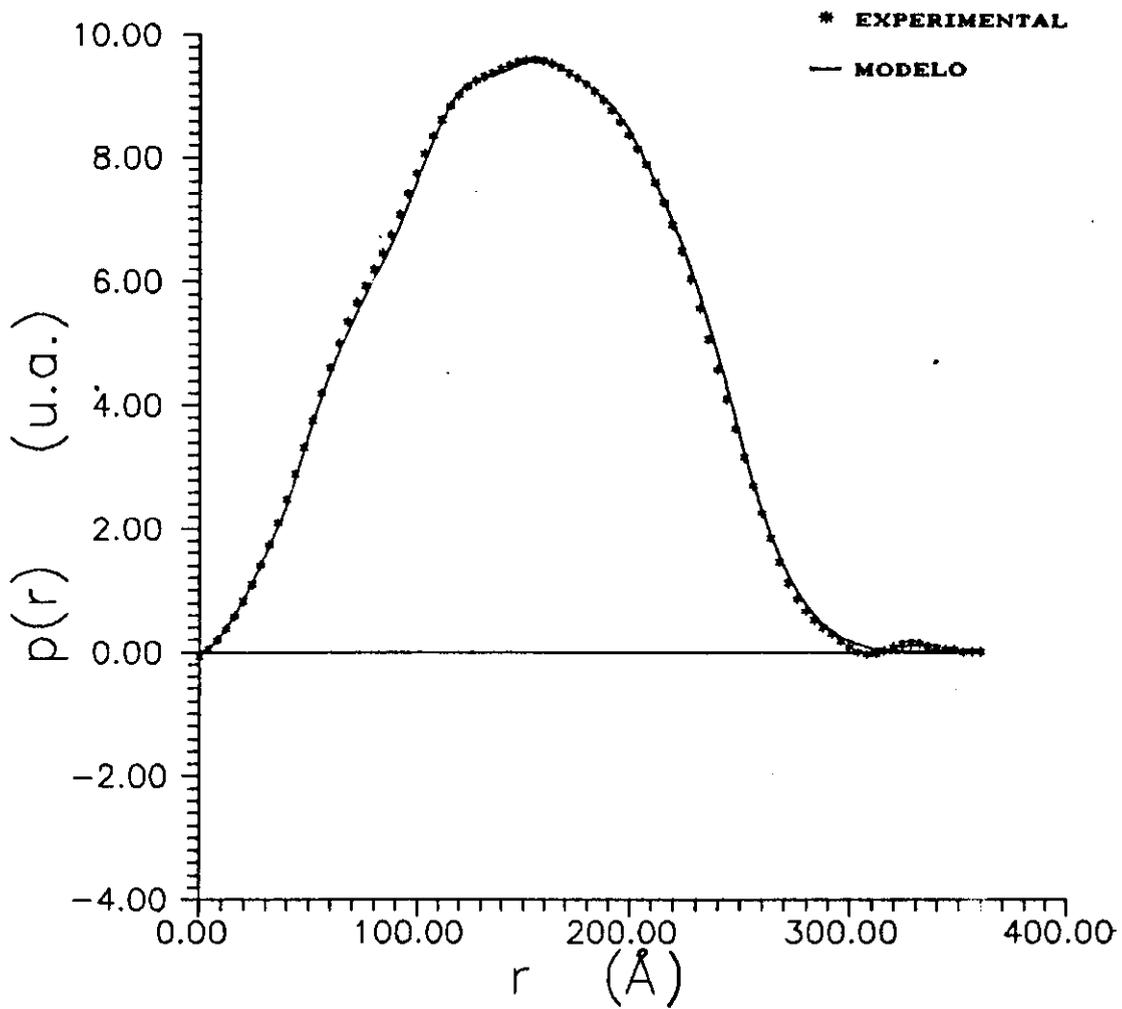


Figura IV. 45

MODELO 570

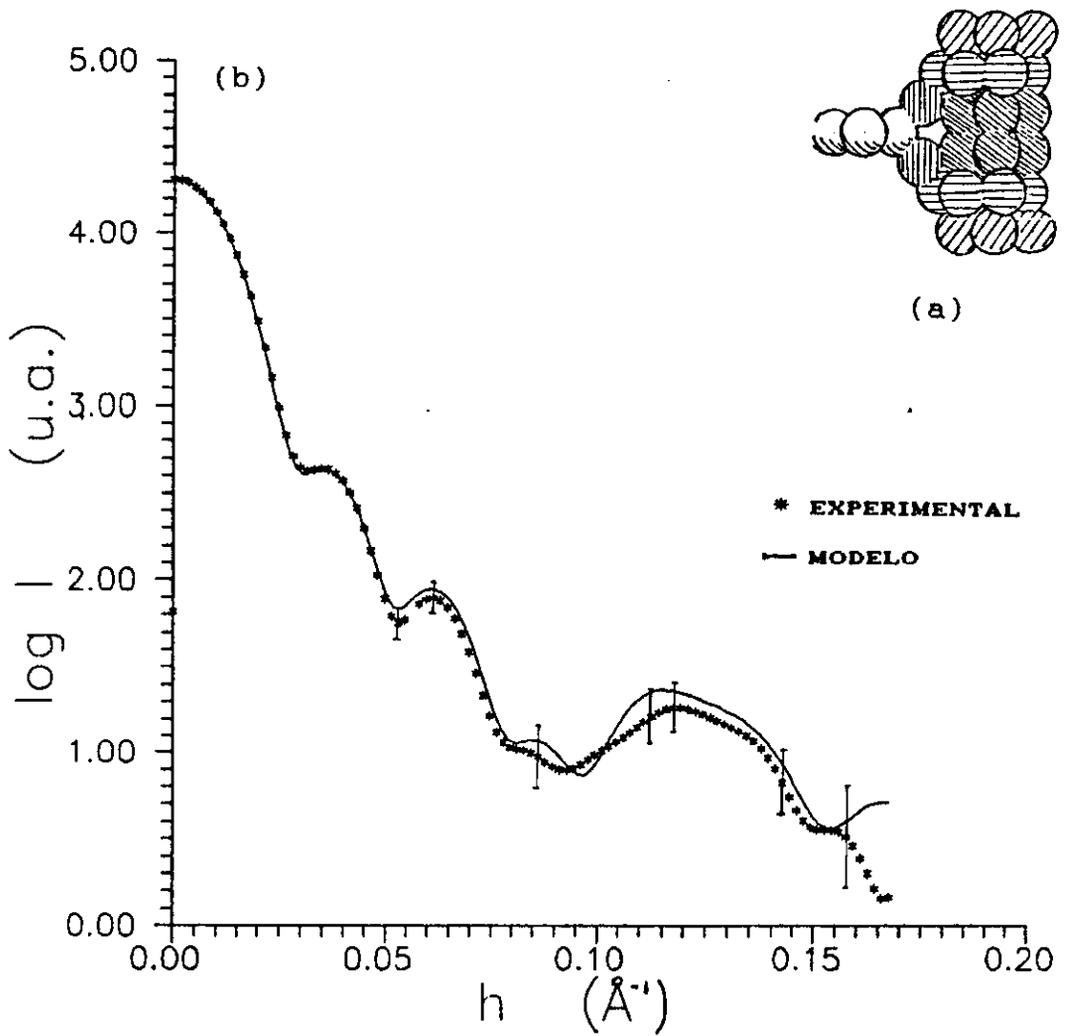


Figura IV.46

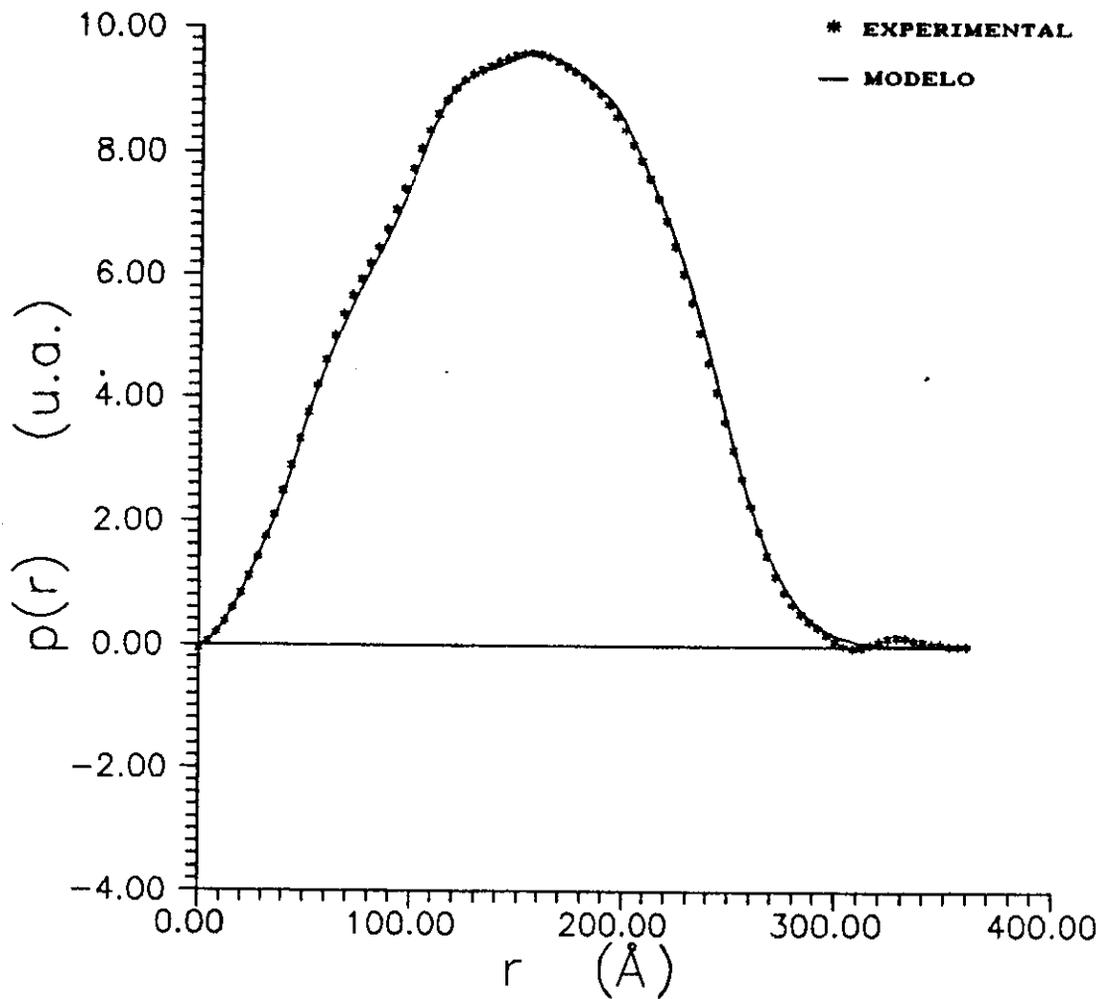
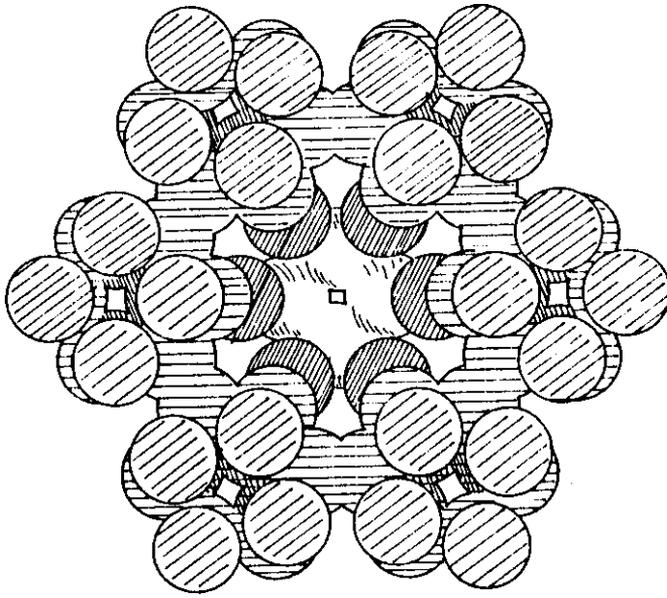
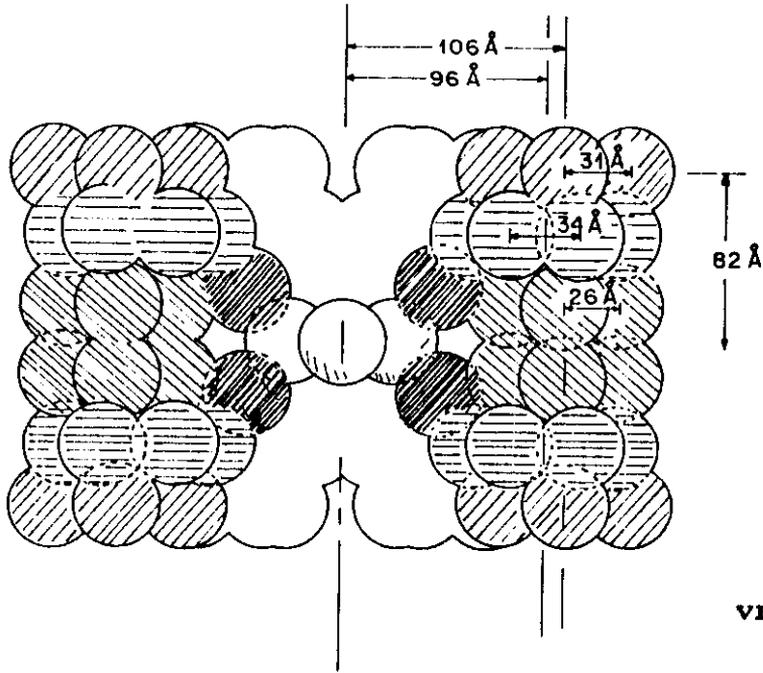


Figura IV.47



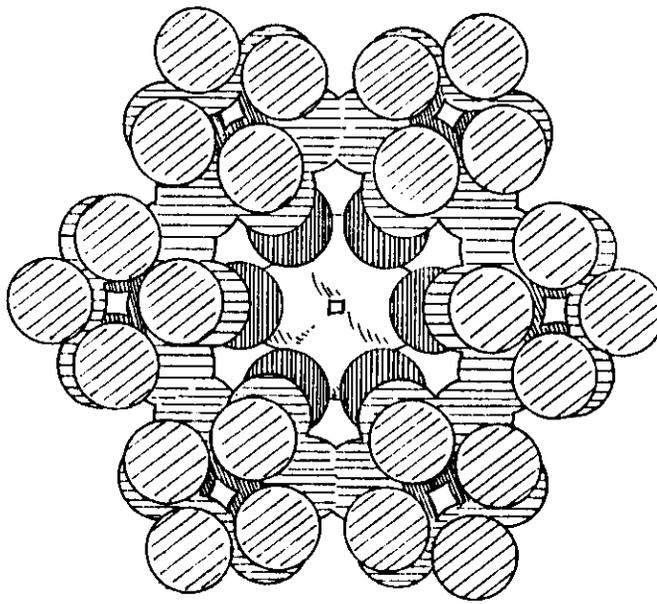
VISTA SUPERIOR

- PESO 1,0
- ▨ PESO 0,7
- ▤ PESO 0,9
- ▧ PESO 1,5
- ▩ PESO 0,6



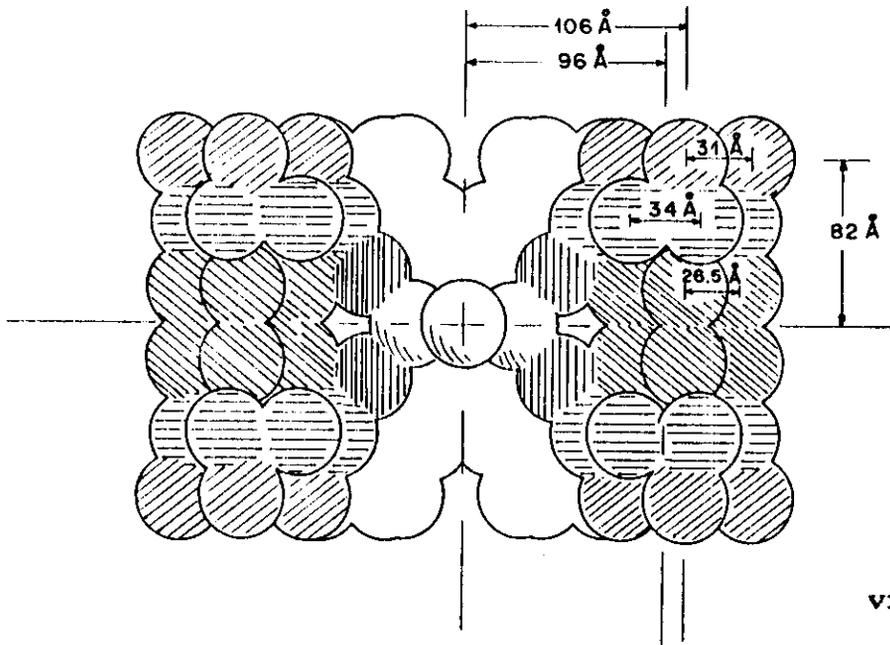
VISTA LATERAL

Figura IV. 48a



VISTA SUPERIOR

-  PESO 1,0
-  PESO 0,7
-  PESO 0,95
-  PESO 1,5
-  PESO 0,55



VISTA LATERAL

Figura IV. 48b

V - CONCLUSÕES

As curvas de espalhamento de alta resolução obtidas com radiação síncrotron provaram ser bastante adequadas ao cálculo de um modelo para a eritrocruorina em solução. O fato de apresentarem máximos secundários já era uma indicação de que a molécula deveria apresentar certa simetria esférica. O aparecimento da banda em valores maiores de h , por sua vez, indicava que ela deveria ser constituída por subunidades quase esféricas [13]. Isto se confirmou quando obtivemos os modelos para a estrutura quaternária da proteína agrupando esferas pequenas com mesmo raio em unidades maiores globulares.

O raio de giro da molécula, calculado pelo método de transformada indireta de Fourier parece ser o mais acurado com um valor de 114,6Å. A dimensão máxima, também determinada por este método, é de ~308Å. Tais valores se parecem bastante com o calculado para o raio de giro por aproximação de Guinier a partir dos dados obtidos com o gerador convencional, que é de 114Å, e o da dimensão máxima determinada para estes mesmos dados que é de 308Å.

Os modelos que obtivemos consistem de 184 esferas que formam 12 subunidades principais arranjadas em duas camadas hexagonais sobrepostas contendo uma subunidade central (Figs. IV.48a e b). Foram determinados através de modificações sistemáticas de um modelo inicial de 186 esferas. As 2 esferas a menos foram retiradas da subunidade central.

A concordância que conseguimos entre os resultados dos modelos e os obtidos através dos dados experimentais foi muito boa:

i) As curvas de intensidade calculadas simulam as determinadas experimentalmente em todos os seus detalhes dentro do erro experimental (Figs. IV.40 e IV.46).

ii) As funções distribuição de distâncias calculadas para os modelos se ajustam quase que perfeitamente às determinadas a partir do espalhamento da proteína (Figs. IV. 41 e IV. 47).

iii) Os valores obtidos para o raio de giro também estão muito próximos: 115Å e 115,2Å para os modelos e 114,6Å para a curva experimental.

iv) O mesmo acontece com os valores para a dimensão máxima na molécula: ~312Å para os modelos contra ~308Å para os dados das soluções de proteínas.

Um dos recursos usados durante o processo de ajuste do modelo foi a atribuição de pesos a esferas em diferentes posições. Isto levou a uma diferenciação em regiões na estrutura com relação à densidade eletrônica. As regiões com maior densidade eletrônica são representadas por 124 do total de 184 esferas. É um número bem próximo ao de grupos heme calculado para esta molécula: 128. Se as esferas com maior peso fossem identificadas com as cadeias que contém heme, sua localização na molécula poderia ser considerada bastante adequada, pois os grupos heme estariam menos expostos (Fig. V.1).

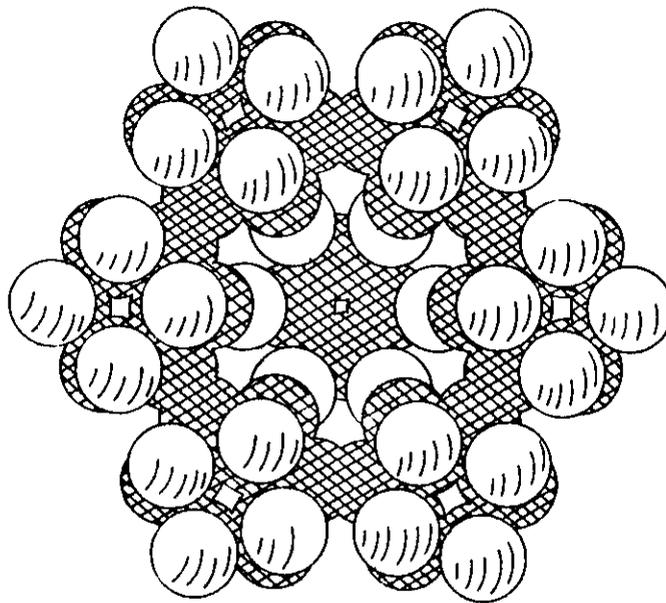
Apesar de termos consciência de que as esferas elementares usadas para construir o modelo não representam necessariamente uma subunidade química da proteína, há um outro fato que deve ser mencionado. Se dividimos a massa molecular da eritrocruorina pelo número de esferas usadas no modelo, obtemos uma massa de 17500 para cada uma, valor bem próximo de 16000 Da determinado para o monômero desta hemoglobina [46].

Devemos observar, ainda, que, de acordo com os modelos, existe alguma densidade proteica na cavidade central da molécula. Os dados de microscopia eletrônica haviam sido inconclusivos a este respeito.

Um caminho muito interessante para dar continuidade a este trabalho seria o estudo das frações dissociadas desta

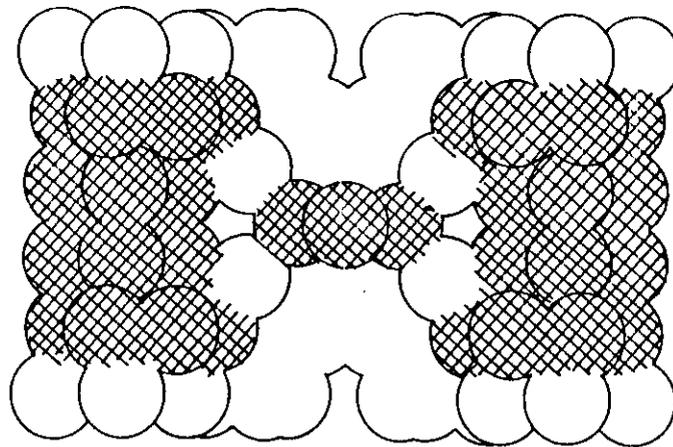
hemoglobina. A análise do espalhamento de soluções de proteínas dissociadas nos daria informações sobre a distribuição de frações contidas na amostra com relação aos tamanhos ou volumes envolvidos [35]. Por outro lado, o espalhamento de soluções que tivessem um só tipo de subunidade da molécula dissociada, principalmente a 1/12, daria a chance de propor modelos para esta e chegar a um estrutura mais definida para a proteína inteira.

Seria importante para a compreensão das propriedades funcionais da eritrocruorina, tentar acompanhar por espalhamento a baixo ângulo mudanças estruturais causadas ao se variar parâmetros como temperatura e pH das soluções de proteínas. Isto pode ser feito através da análise das variações de parâmetros dimensionais como raio de giro e dimensão máxima na molécula ou por ajuste de modelos aos dados experimentais.



VISTA SUPERIOR

■ PESO $\geq 0,9$
□ PESO $< 0,9$



VISTA LATERAL

FIGURA V. 1

BIBLIOGRAFIA

- [1] W. E. Royer, Jr. e W. A. Hendrickson *J. Biol. Chem.* (1988) 263, 13762.
- [2] A. Guinier e G. Fournet *Small Angle Scattering of X-Rays*, J. Wiley, 1955.
- [3] H. Pessen, F. Kumosinski e S. N. Timasheff *Methods in Enzimology*, vol. XXVII, Academic Press, 1973.
- [4] A. Guinier *Ann. Phys.* (1939) 12, 161.
- [5] O. Glatter e O. Kratky *Small-Angle X-Ray Scattering*, Academic Press, 1982.
- [6] O. Glatter *J. Appl. Cryst.* (1979) 12, 166.
- [7] O. Glatter *Acta Phys. Austriaca* (1980) 52, 243.
- [8] O. Glatter *J. Appl. Cryst.* (1974) 7, 147.
- [9] O. Glatter *Acta Phys. Austriaca* (1977) 47, 83.
- [10] O. Glatter *J. Appl. Cryst.* (1977) 10, 415.
- [11] J. Schelten e F. Hosfeld *J. Appl. Cryst.* (1971) 4, 210.
- [12] I. Pilz, O. Glatter e O. Kratky *Methods in Enzimology*, vol. 61, Academic Press, 1979.
- [13] O. Glatter *Acta Phys. Austriaca* (1972) 36, 307.
- [14] M. C. M. Chung e H. D. Ellerton *Prog. Biophys. molec. Biol.* (1979) 35, 53.
- [15] L. Stryer *Bioquimica*, 2^a ed., Madrid, Editorial Reverté, 1982.
- [16] S. N. Vinogradov *Comp. Biochem. Physiol.* (1985) 82B, 1.
- [17] S. N. Vinogradov, S. D. Lugo, M. G. Mainwaring, O. H. Kapp e A. V. Crewe *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83, 8034.
- [18] U. Messerschmidt, P. Wilhelm, I. Pilz, O. H. Kapp e S. N. Vinogradov *Biochim. Biophys. Acta* (1983) 742, 366.

- [19] P. Wilhelm, I. Pilz e S. N. Vinogradov *Int. J. Biol. Macromol.*(1980)2, 383.
- [20] V. Mezzasalma, L. di Stefano, S. Piazzese, M. Zagra, B. Salvato, G. Tognon e A. Ghiretti-Magaldi *Biochim. Biophys. Acta*(1985)829, 135.
- [21] C. F. S. Bonafé *Tese de Mestrado*, Instituto de Biologia, UNICAMP (1988).
- [22] K. Fushitani e A. F. Riggs *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1988)85, 9461.
- [23] O. H. Kapp, M. G. Mainwaring, S. N. Vinogradov e A. V. Crewe *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1987)84, 7532.
- [24] A. S. Abe e N. C. Meirelles *Com. Biochem. Physiol.* (1985)80A, 53.
- [25] O. Kratky *Small-Angle X-Ray Scattering* (H. Brumberger, ed.), New York, Gordon and Breach, 1965.
- [26] M. H. J. Koch, H.B. Stuhrmann, P. Vachette e A. Tardieu *Small-Angle X-Ray Scattering of Solutions*
- [27] W. E. Royer, Jr., W. A. Hendrickson e W. E. Love *J. Mol. Biol.*(1987)197, 149.
- [28] W. E. Royer, Jr. e W. A. Hendrickson *Abstracts of the Symposium on Invertebrate Dioxygen Carriers*, Louvain, Bélgica, 1989, p.72.
- [29] A. Ghiretti-Magaldi, Z. Cejka, G. Tognon, F. Ginevra e G. Zanotti *Abstracts of the Symposium on Invertebrate Dioxygen Carriers*, Louvain, Bélgica, 1989, p.33.
- [30] W. E. Royer, Jr. e W. A. Hendrickson *Abstracts of the Symposium on Invertebrate Dioxygen Carriers*, Louvain, Bélgica, 1989, p.73.

- [31] J. H. Ahlberg, E. N. Nilson e J. L. Walsh *The Theory of Splines and Their Applications*, Academic Press, 1967.
- [32] T. N. E. Greville *Theory and Applications of Spline Functions*, Academic Press, 1969.
- [33] O. Glatter *J. Appl. Cryst.*(1980)13, 577.
- [34] M. F. Perutz *Sci. Amer.*(1978)92, 88.
- [35] O. Glatter *J. Appl. Cryst.*(1980)13, 7.
- [36] I. Pilz, E. Schwarz e S. N. Vinogradov *Int. J. Biol. Macromol.*(1980)2, 279.
- [37] A. Ghiretti-Magaldi, G. Zanotti, G. Tognon e V. Mezzasalma *Biochim. Biophys. Acta*(1985)829, 144.
- [38] O. H. Kapp, S. N. Vinogradov, M. Ohtsuki e A. V. Crewe *Biochim. Biophys. Acta*(1982)704, 546.
- [39] O. H. Kapp e A. V. Crewe *Biochim. Biophys. Acta* (1984)789, 294.
- [40] L. Waxman *J. Mol. Chem.*(1975)250, 3790.
- [41] J. M. Shlom e S. N. Vinogradov *J. Biol. Chem.*(1973)248, 7904.
- [42] M. M. David e E. Daniel *J. Mol. Biol.*(1974)87, 89.
- [43] S. N. Vinogradov, J. M. Shlom, B. C. Hall, O. H. Kapp e H. Mizukami *Biochim. Biophys. Acta*(1977)492, 136.
- [44] M. C. P. Costa, C. F. S. Bonafé, N. C. Meirelles e F. Galembek *Brazilian J. Med. Biol.*(1988)21, 115.
- [45] C. F. de Souza, I. L. Torriani, C. F. S. Bonafé e N. C. Meirelles *Acta Cryst.*(1987)A43, C27.
- [46] N. C. Meirelles, B. Oliveira, E. Paula, S. Marangoni e M. R. F. Marques *Comp. Biochem. Physiol.*(1985)82B, 203.