

**Projeto de Pesquisa:**

**Desenvolvimento de  
Métodos de Análise e  
modelagem de dados de  
Difração e Espalhamento  
a Baixos Ângulos**

*Proponente:*

**Prof. Dr. Cristiano Luis Pinto de Oliveira**  
Instituto de Física  
Universidade de São Paulo

## **Resumo**

Técnicas experimentais espectroscópicas são amplamente utilizadas para o estudo dos mais variados tipos de sistemas. Estas técnicas são baseadas nas diversas formas de interação que a radiação possui com a matéria, o que, por outro lado, depende das características intrínsecas da radiação bem como de sua faixa de energia. Uma grande classe de métodos espectroscópicos são os métodos de espalhamento de luz, particularmente luz visível e raios X, bem como espalhamento de nêutrons. Nestes casos os dados experimentais podem fornecer informações estruturais importantes sobre o sistema como, por exemplo, forma das partículas, arranjo estrutural, variação da densidade de contraste eletrônico, resposta a agentes externos como temperatura, pH, força iônica etc. No entanto, uma das principais dificuldades da utilização destes métodos consiste na análise e interpretação dos resultados. Proponho neste projeto o desenvolvimento de métodos de simulação, análise e modelagem de dados experimentais de difração e espalhamento a baixos ângulos que são utilizados em uma vasta gama de aplicações, permitindo a correta análise e descrição de dados experimentais obtidos bem como a obtenção de parâmetros estruturais pertinentes. Este conjunto de ferramentas será utilizado em diversos projetos que desenvolvo bem como disponibilizado à comunidade científica para aplicação em modelagem de dados experimentais.

## **Abstract**

Spectroscopic techniques are widely used for the investigation of several types of systems. These techniques are based on the several types of interaction of the used radiation with matter, which, on the other hand, depends on the intrinsic characteristics of the radiation and its energy. A wide class of spectroscopic methods is the scattering methods: light scattering, X-ray scattering and Neutron scattering. In these cases the experimental data can provide interesting structural information about the studied system as, for example, particle shape and its internal structure, overall structural arrangement of particles, response to the variation of environmental conditions as temperature, pH, ionic strength, etc. However, one of the main difficulties when using scattering methods is the analysis and interpretation of the results. In this project it is proposed the development of methods of simulation, analysis and modeling for small angle scattering experimental data, which can be used in a broad range of applications, providing the correct determination of the structural parameters. The analysis tools developed in this project will be used on the several projects that I coordinate as well as will also be made available for the scientific community for its use on the modeling of experimental data.

## Índice

1. Introdução e Motivação .....	4
a) Modelagem independente da forma .....	7
b) Modelagem dependente da forma .....	9
c) Modelagem ab initio .....	12
2. Projetos a serem desenvolvidos.....	15
a) Método de Transformada Inversa de Fourier Generalizado.....	16
b) Modelagem de sistemas com ordenamento bem definido .....	17
c) Sistemas Planares – Deconvolução Gaussiana.....	18
d) Método de Deconvolução Generalizado.....	19
e) Desenvolvimentos adicionais .....	20
3. Resultados Esperados.....	22
4. Cronograma.....	23
5. Contribuições para a Instituição.....	23
6. Bibliografia.....	24

## 1. Introdução e Motivação

Para compreender experimentos de espalhamento a baixos ângulos pode-se iniciar com uma partícula fixa no espaço. Isso é mostrado na Figura 1 onde uma onda incidente com vetor de onda  $\vec{k}_0$  incide nos pontos O e P separados por um vetor  $\vec{r}$ .

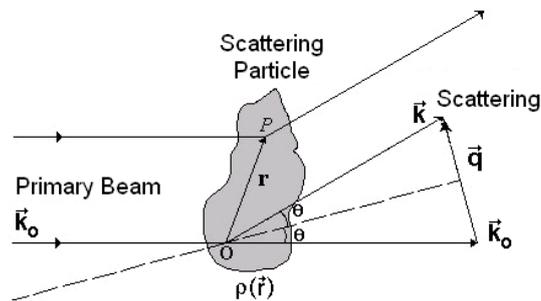


Figura 1 – Representação do processo de espalhamento por uma partícula fixa. Figura tirada de (Oliveira, 2011).

Como o espalhamento é assumido como elástico (primeira aproximação de Born), a onda espalhada com vetor de onda  $\vec{k}$  possui o mesmo módulo da onda incidente e então a diferença entre os feixes incidentes e espalhados é dado por:

$$\left. \begin{aligned} \vec{q} &= \vec{k} - \vec{k}_0, & |\vec{k}| &= |\vec{k}_0| \\ q &= 2k \sin \theta \\ k &= \frac{2\pi}{\lambda} \end{aligned} \right\} \Rightarrow q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (1)$$

O que fornece a definição do vetor transferência de momento do espaço recíproco,  $q$ . A amplitude de espalhamento  $f(\vec{q})$  é dada pela transformada de Fourier da densidade de comprimento de espalhamento do centro espalhador,  $\rho(\vec{r})$ :

$$f(\vec{q}) = \frac{1}{4\pi} \int_V \rho(\vec{r}) \exp(-i\vec{q} \cdot \vec{r}) d\vec{r} \quad (2)$$

A quantidade mensurável é a intensidade de espalhamento,  $I(q)$  que é o modulo quadrático da amplitude de espalhamento,

$$I_1(\vec{q}) = |f(\vec{q})|^2 = f(\vec{q}) \cdot f(\vec{q})^* \quad (3)$$

$$I_1(\vec{q}) = \int_V \int_V \rho(\vec{r}') \rho(\vec{r}' - \vec{r}) \exp(-i\vec{q} \cdot \vec{r}) d\vec{r} d\vec{r}'$$

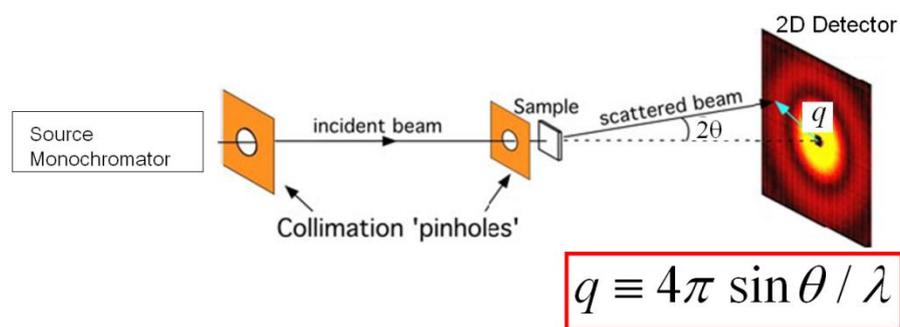
Em geral, assume-se que a particular não está fixa, mas sim que pode assumir qualquer orientação. Desta forma, devem-se realizar médias da intensidade de espalhamento para as possíveis orientações da partícula. Estas operações de promediação permitem a escrita da intensidade de espalhamento média para uma partícula como sendo dada por (Feigin & Svergun, 1987):

$$I_1(q) = 4\pi \int_0^\infty p(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (4)$$

$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I_1(q) \frac{\sin(qr)}{qr} dq$$

Sendo que a função  $p(r)$  é similar à função de Patterson obtida em métodos cristalográficos, mas promediada para todas as orientações da partícula espalhadora.

Um esquema de uma configuração típica de SAS (*Small Angle Scattering*) é mostrado na Figura 2. Quando este método é utilizado com fontes de raios X recebe o nome de SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) e com fontes de nêutrons SANS (*Small Angle Neutron Scattering*).



**Figura 2 – Esquema de uma configuração experimental de SAXS. O feixe de raios X proveniente de uma fonte é colimado utilizando elementos óticos (fendas, pinholes, etc) e incide na amostra. O feixe transmitido é coletado e pelo perfil de espalhamento é possível obter-se informações pertinentes à amostra.**

Para um sistema de partículas em solução, a intensidade espalhada pode ser representada pela seguinte expressão,

$$I(q) = N_s \langle f^2(\bar{q}) \rangle \langle S(\bar{q}) \rangle \quad (5)$$

sendo  $N_s$  o número de partículas iluminadas pelo feixe incidente,  $\langle f^2(\bar{q}) \rangle = P(q)$  é o fator de forma da particular espalhadora, com  $f(\bar{q})$  a amplitude de espalhamento e  $\langle S(\bar{q}) \rangle$  é o fator de estrutura do sistema. Diferentes variações da expressão (5) podem ser obtidas dependendo do sistema em estudo. O fator de forma fornece informações sobre a forma, dimensões, anisotropia e contrastes de densidade eletrônica da partícula espalhadora. O fator de estrutura fornece informações sobre possíveis interações entre as partículas, estados de oligomerização, agregação, etc.

Os “brackets”  $\langle \rangle$  indicam uma média sobre todas as orientações da partícula. Isso se deve ao fato de termos um sistema de partículas randomicamente orientadas, as quais, quando submetidas a medidas de espalhamento, fornecem um espalhamento isotrópico. Desta maneira uma curva de SAXS típica é o resultado da média sobre todas as possíveis orientações da partícula e esta operação diminui enormemente a quantidade de informação do sistema fazendo com que, por exemplo, diferentes tipos de modelos possam ajustar igualmente os dados experimentais.

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para se obter informações estruturais a partir de dados de espalhamento. Usualmente a informação desejada é a distribuição de contraste de comprimento de espalhamento  $\Delta\rho(r)$ , que pode fornecer informações sobre forma, tamanho, polidispersidade, periodicidade, etc. Este procedimento é chamado “problema inverso de espalhamento”, ou seja, obter informação a partir de dados no espaço recíproco. A principal dificuldade decorre do fato de que não temos acesso experimental à amplitude de espalhamento, mas sim à intensidade de espalhamento,  $I(q) \propto \langle f^2(\bar{q}) \rangle$ . Das características intrínsecas de experimentos de espalhamento, o teste  $\chi^2$  (*chi-square*) é uma boa função de minimização para procedimentos de otimização e ajuste de dados (Knoll, 2010, Press, 1992). Dado um número  $N$  de pontos experimentais,  $I_{exp}(q_i)$ , com desvios padrões  $\sigma(q_i)$  e a intensidade teórica  $I_{teo}(q_i)$  calculada para os mesmos valores de  $q$ , a função  $\chi^2$  é definida como:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(I_{exp}(q_i) - I_{teo}(q_i))^2}{\sigma(q_i)^2} \quad (6)$$

Uma prática comum é a utilização do  $\chi^2$  reduzido,  $\chi_R^2 = \chi^2 / (N - M)$ , sendo  $N$  o número de pontos experimentais e  $M$  o número de parâmetros independentes no modelo teórico. Um bom ajuste dos dados experimentais ocorre quando as diferenças entre o modelo e os dados experimentais são menores do que os desvios  $\sigma(q_i)$ . Deste modo, como  $\chi_R^2$  é normalizado por  $(N-M)$ , se  $N$  é razoavelmente maior que  $M$  o valor de  $\chi_R^2$  para um bom ajuste deve ser próximo a 1. Valores consideravelmente maiores que 1 podem provavelmente indicar discrepâncias entre o modelo e os dados experimentais ou incertezas subestimadas. Por outro lado, valores consideravelmente menores que 1 indicam incertezas superestimadas. Este teste, bem como variações do mesmo, pode ser

utilizado para minimização nos processos de ajuste de dados experimentais pela utilização de modelos teóricos.

Várias metodologias de análise de dados podem ser utilizadas. Pode-se dividir estas metodologias em várias classes: *Modelagem independente da forma*, *Modelagem dependente da forma*, *Modelagem ab initio* e *Deconvolução Quadrática*. Todas estas classes se subdividem em sub-classes com diferentes aplicações.

### **a) Modelagem independente da forma**

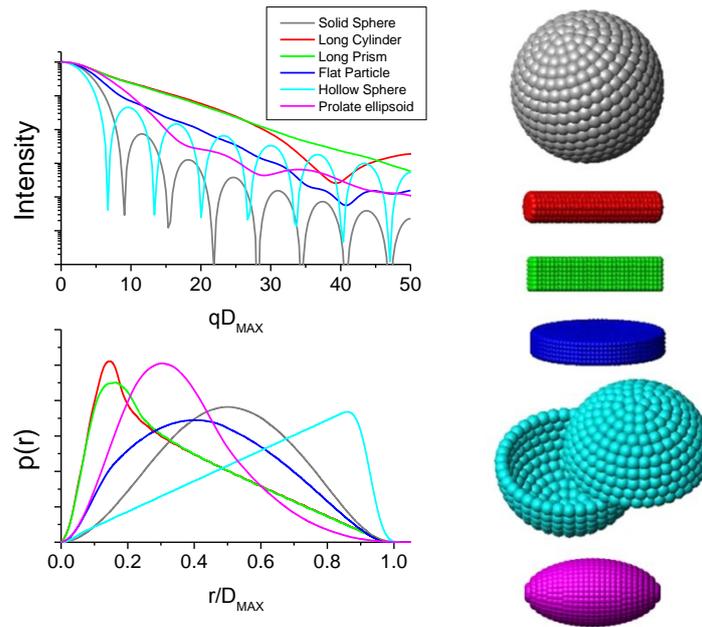
Para sistemas bastante diluídos possíveis interações entre partículas espalhadoras podem ser negligenciadas de modo que o fator de estrutura  $S(q)$  tem valor unitário. Nestes casos a intensidade de espalhamento medida é proporcional à intensidade de uma única partícula, a qual pode ser representada através da transformada de Fourier de uma função do espaço real,  $p(r)$ :

$$I(q) = N_s \langle f^2(\vec{q}) \rangle = N_s I_1(q) \quad (7)$$

$$I_1(q) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr$$

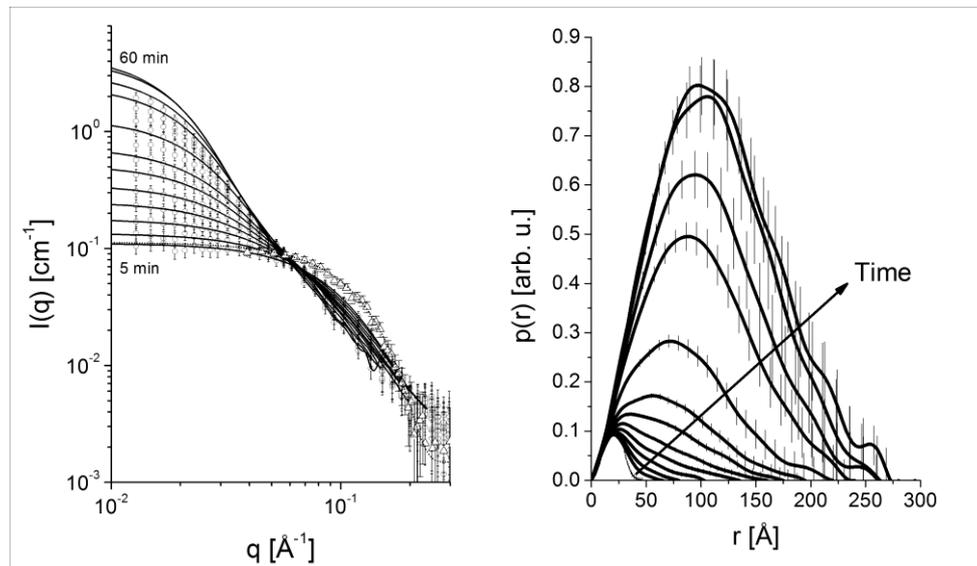
$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^{\infty} q^2 I_1(q) \frac{\sin(qr)}{qr} dq$$

A função  $p(r)$ , também conhecida como função de distribuição de distâncias entre pares, tem o significado físico de histograma de distribuição de distâncias no interior de uma partícula. Existem na literatura diversos procedimentos capazes de fornecer esta função a partir de dados experimentais (programa ITP and GIFT (Glatter, 1977, Bergmann et al., 2000, Fritz & Glatter, 2006) ; programa GNOM (Semenyuk & Svergun, 1991); programa WIFT e WGIFT (Oliveira *et al.*, 2009, Oliveira, Monteiro, *et al.*, 2014, Oliveira, Santos, *et al.*, 2014a), entre outros. A forma desta curva fornece informações importantes sobre a forma das partículas espalhadoras, como mostrado na Figura 3. Uma informação direta desta curva é o valor da máxima dimensão da partícula, fornecido pelo valor em  $r$  no qual esta função vai para zero.



**Figura 3 – Curvas teóricas para intensidades de espalhamento e correspondentes funções  $p(r)$  para corpos com formas simples. As intensidades foram normalizadas. Figura tirada de (Oliveira, 2011).**

Em um exemplo de aplicação deste método, mostrado na Figura 4, a agregação de lisozima foi induzida pelo aumento da temperatura, e os dados experimentais são descritos pelo método de IFT (Oliveira, 2011). Neste caso, apesar de sabermos que a lisozima é a subunidade agregadora base, olhamos para o sistema como um todo, isto é, a função  $p(r)$  fornece informações sobre a forma do agregado formado.



**Figura 4 – Agregação de Lisozima induzida por calor. Esquerda: Dados experimentais (círculos abertos) e ajustes teóricos (linhas sólidas). Os frames foram coletados com o sistema à 80°, em intervalos de 5 minutos. Direita: curvas de distribuição de distâncias  $p(r)$  para cada curva. Figura tirada de (Oliveira, 2011).**

Em outras situações pode-se tentar utilizar a forma da subunidade e explicitamente introduzir o fator de estrutura no sistema. Este procedimento foi proposto por Glatter no programa GIFT (Bergmann et al., 2000) e também por Oliveira no programa WGIFT (Oliveira *et al.*, 2009, Oliveira, Monteiro, *et al.*, 2014, Oliveira, Santos, *et al.*, 2014a). O desenvolvimento deste método de IFT generalizado é uma das propostas deste projeto.

### **b) Modelagem dependente da forma**

Para formas simples pode-se integrar a equação (2) e obter o fator de forma de amplitude  $f(\vec{q})$ . Com esta expressão para a amplitude pode-se fazer a média angular e de modo a obter a intensidade e de espalhamento  $I(q)$ . Alguns exemplos são mostrados na tabela 1. Uma lista mais completa de fatores de forma pode ser encontrada na literatura (Pedersen, 1997), bem como diversas implementações mais avançadas (Szekely et al., 2010, Giehm et al., 2010).

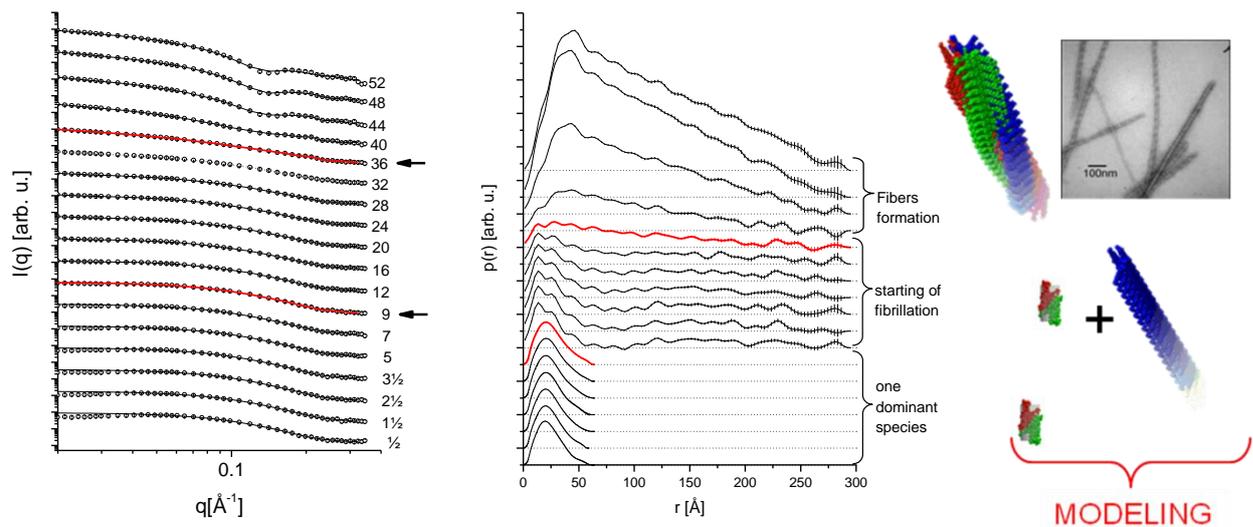
**Tabela 1 – Alguns exemplos de expressões semi-analíticas para intensidades de espalhamento calculadas para partículas com formas simples**

<b>Forma</b>	<b>Fator de Forma Normalizado</b>
Esfera Homogênea com raio R	$I_1(q) = f_1(q)^2 = \left( \frac{3[\sin(qR) - qR \cos(qR)]}{(qR)^3} \right)^2$
Casca esférica com raio externo R1 e raio interno R2	$I_1(q) = \left[ \frac{V(R_1)f_1(q, R_1) - V(R_2)f_2(q, R_2)}{V(R_1) - V(R_2)} \right]^2$ $V(R) = 4\pi R^3 / 3$
Cilindro Homogêneo com raio R e comprimento L	$I_1(q) = \int_0^{\pi/2} \left[ \frac{2J_1(qR \sin \alpha)}{qR \sin \alpha} \frac{\sin(qL \cos \alpha / 2)}{qL \cos \alpha / 2} \right]^2 \sin \alpha d\alpha$
Elipsóide de revolução com semi-eixos R, R and $\epsilon R$	$I_1(q) = \int_0^{\pi/2} f_1(q, r(R, \epsilon, \alpha)) \sin \alpha d\alpha$ $r(R, \epsilon, \alpha) = R(\sin^2 \alpha + \epsilon \cos^2 \alpha)^{1/2}$

A principal vantagem de se utilizar uma expressão analítica ou semi-analítica é o fato de que, em geral, utiliza-se um número relativamente pequeno de parâmetros para descrever o modelo. Além disso, expressões para modelos simples podem ser combinadas formando estruturas mais complexas (Yan et al., 2009, Giehm et al., 2010). Em diversas aplicações a forma da partícula é conhecida, mas o cálculo analítico é impraticável. Nestes casos é possível utilizar o método de elementos finitos para construir a partícula utilizando subunidades esféricas, e utilizar a equação de Debye para o cálculo da intensidade (Debye, 1915, Glatter, 1980):

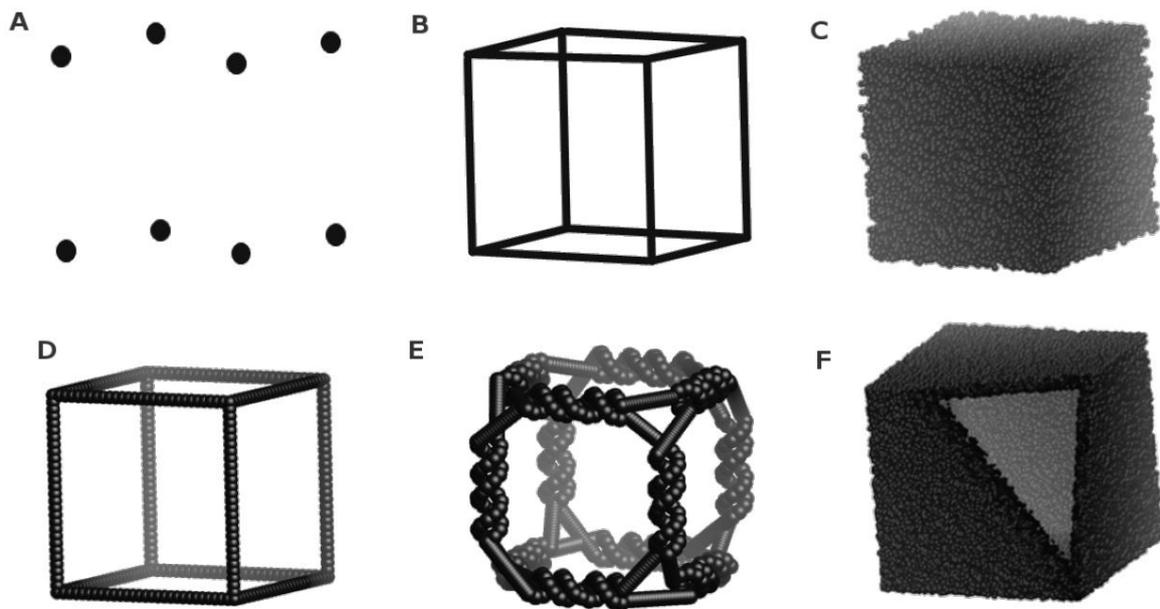
$$P_{Model}(q) = \frac{f_1(q, r_{bead})^2}{N^2} \sum_{i,j=1}^N \frac{\sin(qr_{ij})}{qr_{ij}} \quad (8)$$

Este procedimento permite o cálculo e otimização de modelos bastante complexos (Oliveira et al., 2010, Pedersen et al., 2012, Oliveira et al., 2009, Oliveira, 2005, 2001). Em todos estes casos pode-se incluir possíveis interações entre as partículas utilizando a aproximação de desacoplamento (equação 14). Um exemplo de aplicação é mostrado na Figura 5 onde é mostrado um estudo in situ da fibrilação da molécula glucagon. Neste estudo foi possível modelar as fibras no estágio final como sendo compostas por três fibras mais finas entrelaçadas (Oliveira et al., 2009).



**Figura 5 – Estudos de SAXS para agregação de glucagon em fibras amilóides. Da esquerda para a direita: Serie de dados de SAXS coletados em função da temperatura, curvas de distribuição de pares de distâncias  $p(r)$  para cada curva de espalhamento, modelos obtidos através da construção por elementos finitos e uma imagem de TEM obtida para o sistema de fibras amilóides maduras. Figura baseada em (Oliveira et al., 2009).**

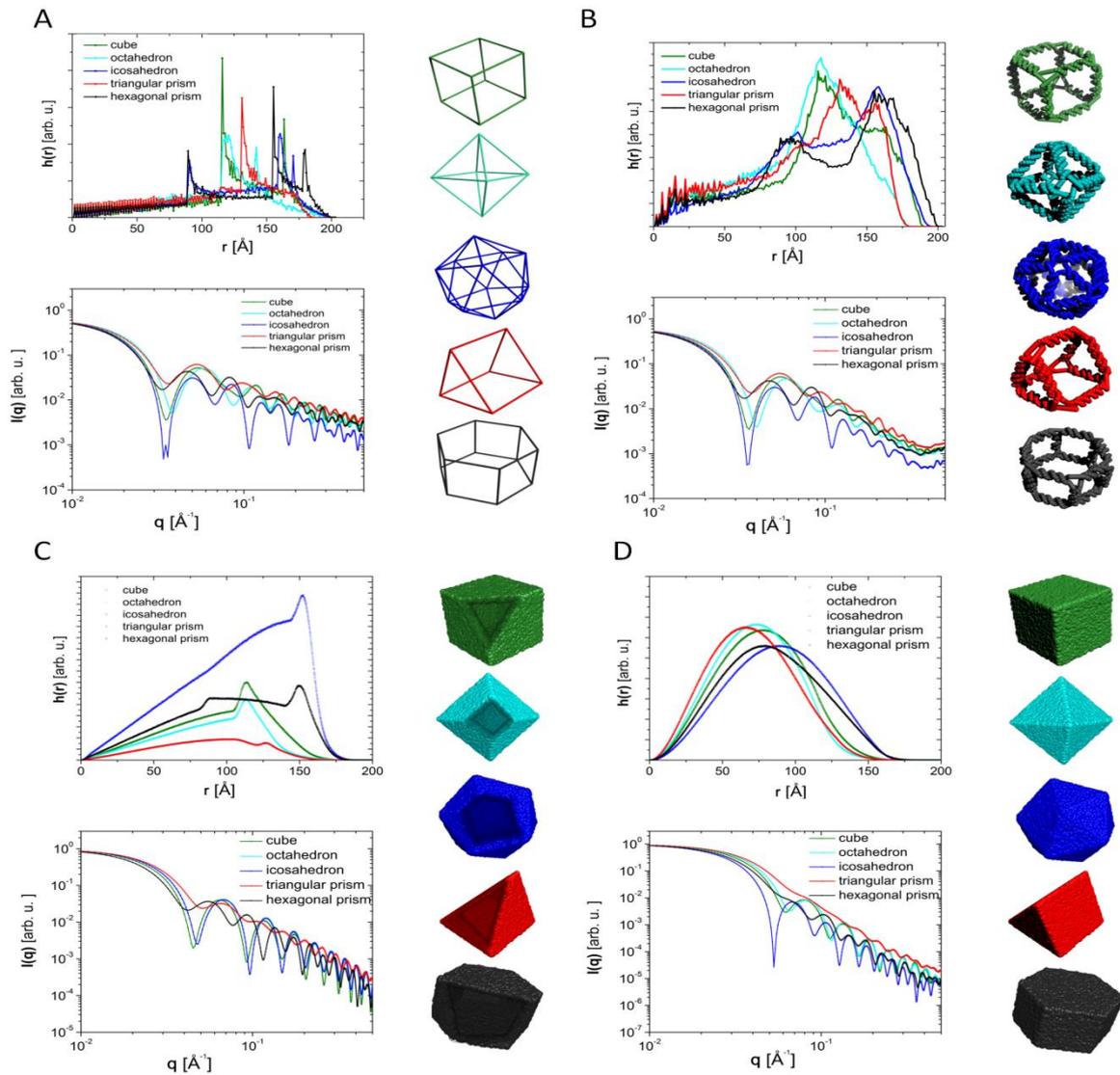
Em muitos casos a construção do modelo utilizando subunidades esféricas também pode não ser trivial. Nestes casos deve-se desenvolver procedimentos específicos para a construção dos modelos antes do cálculo da intensidade. Este procedimento foi desenvolvido em um artigo recente (Alves et al., 2014) onde demonstramos em detalhe a construção de modelos de alta simetria utilizando a técnica de elementos finitos. Para estes desenvolvimentos, toma-se como ponto de partida um conjunto de pontos na superfície de uma esfera, que pode definir uma dada geometria. Um exemplo é a biblioteca *netlib* (Hume) que fornece uma grande quantidade de coordenadas dos vértices e conectividades para mais de 150 corpos geométricos. Tendo-se estes vértices, diversos procedimentos de construção do modelo podem ser executados, como indicado na Figura 6. Corpos sólidos e estruturas tipo casca também podem ser construídos através da definição da região externa/interna do modelo. Este procedimento é explicado em detalhe em (Alves et al., 2014, Alves, 2015).



**Figura 6 – Construção do modelo. A) Posição dos vértices de um cubo. B) União dos vértices com segmentos de retas. C) Modelo do tipo sólido. D) União dos vértices com subunidades esféricas. E) União dos vértices com DNA. F) Modelo do tipo casca. Figura adaptada de (Alves et al., 2014).**

Utilizando estes procedimentos de modelagem é possível fazer o cálculo teórico de variados modelos com geometrias variadas. Estes modelos são descritos por um número pequeno de parâmetros que podem ser otimizados no ajuste de dados experimentais (Alves et al., 2014, Oliveira et al., 2010). Exemplos de cálculo são mostrados na Figura 7.

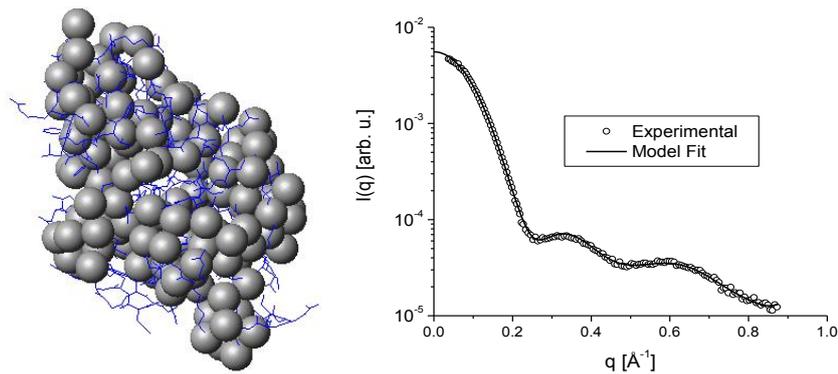
Um dos objetivos deste projeto é otimizar a construção de modelos utilizando o método de elementos finitos bem como aprimorar as rotinas de minimização de dados para a modelagem de dados experimentais utilizando estes modelos.



**Figura 7 –** Cálculo de intensidades teóricas para diversos corpos geométricos. Corpos construídos unindo-se os vértices com segmentos de reta (a) corpos construídos com segmentos tipo DNA nas arestas (b), corpos tipo casca (c) e corpos sólidos (d). Figura tirada de (Alves et al., 2014).

### c) Modelagem *ab initio*

Existem na literatura diversos métodos de modelagem que fornecem um modelo tridimensional a partir de curvas de espalhamento unidimensionais. Estes métodos, também chamados *ab initio*, podem ser implementados de várias formas, dependendo de peculiaridades do sistema e também da quantidade de informação disponível (programa ASSA / SASHA (Svergun et al., 1997); programa DALAI (Chacon et al., 1998); programa DAMMIN (Svergun, 1999); programa SAXS3D (Walther et al., 2000); programa GASBOR (Svergun et al., 2001)). Um exemplo de aplicação é mostrado na Figura 8 onde um modelo de baixa resolução para a lisozima é obtido diretamente dos dados experimentais (Oliveira, 2011).

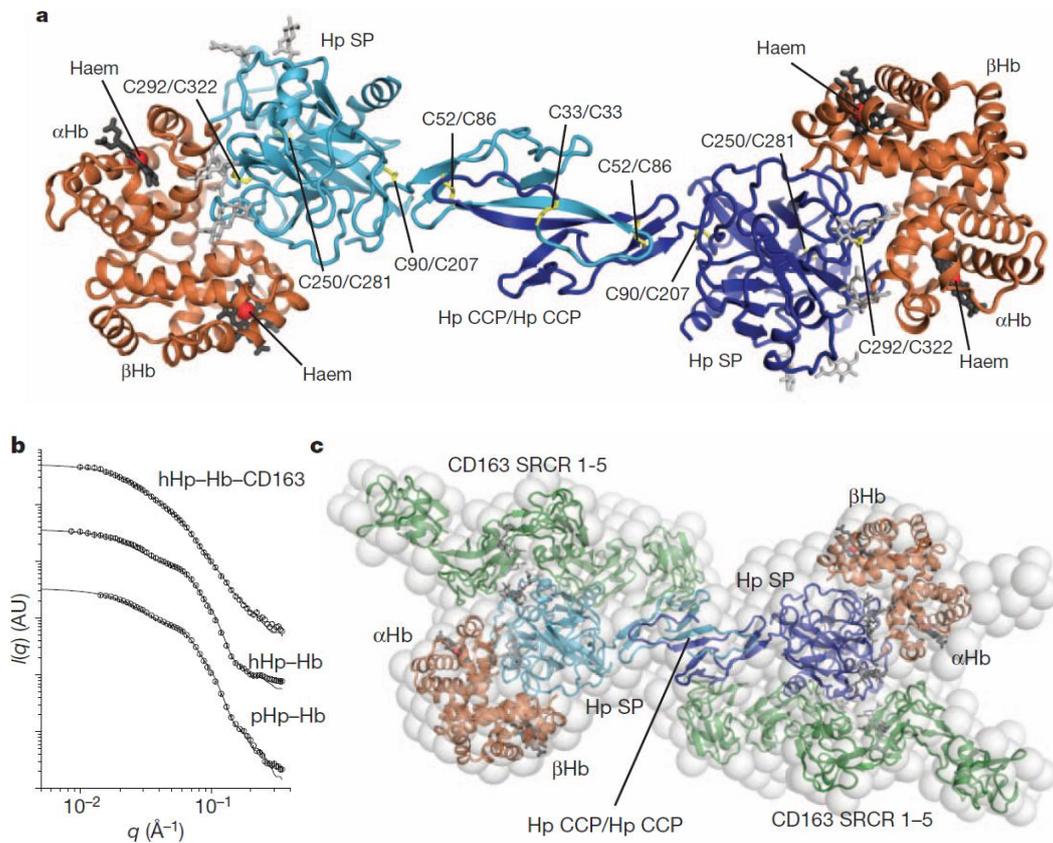


**Figura 8 – Exemplo de modelagem ab initio para dados de SAXS utilizando o programa GASBOR. Esquerda: Estrutura otimizada (esferas sólidas) superposta pela estrutura real conhecida por cristalografia de proteínas (arquivo pdb 6lyz.pdb). Direita: Ajuste dos dados experimentais. Círculos abertos – dados experimentais. Linha sólida – ajuste do modelo. Figura tirada de (Oliveira, 2011).**

Especificamente para sistemas compostos por proteínas, complexos protéicos, RNA e DNA, métodos *ab initio* podem ser combinados com estruturas a nível atômico, obtidas por cristalografia de proteínas, ressonância nuclear magnética, modelos teóricos ou obtidos por outras técnicas (programa CRY SOL, (Svergun et al., 1995) programas BUNCH, SASREF e CORAL, (Petoukhov & Svergun, 2005). Nestes casos os dados de SAXS podem fornecer informações importantes sobre a forma dos complexos formados bem como o arranjo de domínios. A principal limitação desta metodologia reside no fato de que curvas de SAXS possuem uma quantidade de informação muito pequena o que faz com que não se possa obter um resultado único para as modelagens, isto é, diversos ajustes independentes fornecerão resultados parecidos, mas não idênticos. Devido a essa limitação, resultados de SAXS sempre devem ser correlacionados com dados obtidos por outras técnicas (Oliveira, 2011).

Venho trabalhado há vários anos com a utilização destes métodos para o estudo de diversos tipos de sistemas biológicos (da Silva *et al.*, 2014, Demasi, Hand, Oliveira, *et al.*, 2014, Demasi, Netto, *et al.*, 2014, Oliveira & Pedersen, 2013, Andersen *et al.*, 2012, Behrens *et al.*, 2012, Calcutta *et al.*, 2012, Silva *et al.*, 2012, Oliveira, 2011, Rasmussen, Pinto Oliveira, *et al.*, 2011, Rasmussen, Oliveira, *et al.*, 2011), entre diversos outros artigos. Em muitos casos é necessário desenvolver metodologias complementares para o ajuste dos dados experimentais de modo a incluir elementos adicionais na modelagem. Em um estudo recente, foi possível obter a estrutura do complexo hemoglobina-haptoglobina. A Hemoglobina é o transportador fundamental da molécula de oxigênio no sangue, mas também um componente potencialmente nocivo a tecidos devido a seus grupos heme serem altamente reativos. Durante a hemólise intravascular, comum quando o indivíduo possui malária ou outras hemoglobinopatias, hemoglobina é liberada no sangue sendo então capturada pela proteína haptoglobulina, a qual possui ação de proteção para esta fase aguda. Este artigo foi publicado na revista NATURE (Andersen et al., 2012) e apresentou, pela primeira vez, a estrutura cristalográfica do complexo hemoglobina-haptoglobulina em nível atômico (resolução de 2.9Å). A estrutura revelou que o complexo é formado um homodímero de haptoglobulinas nas quais dois dímeros de hemoglobina se

ligam covalentemente. Também foi possível obter como este complexo se liga ao receptor necrófago CD163, o qual possui a função de limpeza e defesa do organismo. Com os resultados deste trabalho, processos fundamentais relacionados à forma de interação entre a hemoglobina e haptoglobulina, bem como sua forma de ligação ao receptor CD163 puderam finalmente ser compreendidos.



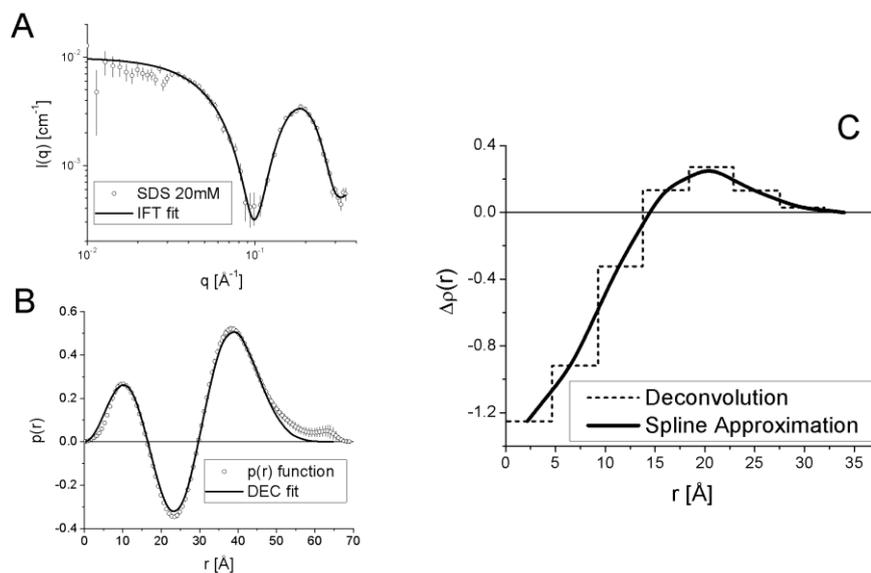
**Figura 9 – Complexo hemoglobina-haptoglobina-CD163. (a) estrutura cristalográfica do complexo hemoglobina-haptoglobina (Hp-Hb). (b) cálculo da intensidade teórica de espalhamento para as cristalográficas do complexo em humanos (hHp-Hb) e em suínos (pHp-Hb). O ajuste dos dados do complexo Hp-Hb com o receptor CD163 (hHp-Hb-CD163) e o correspondente modelo foi obtido utilizando o programa CORAL. Figura tirada de (Andersen et al., 2012).**

Um dos objetivos deste projeto é aprimorar o uso destas ferramentas disponíveis na literatura nos projetos de desenvolvimento e participação, bem como desenvolver ferramentas adicionais de modelagem e combinação com dados experimentais obtidos por outras técnicas.

#### **d) Deconvolução Quadrática**

Em diversas aplicações a forma da partícula é conhecida, mas o perfil de densidade de comprimento de espalhamento e as dimensões do sistema devem ser determinados. Moléculas anfifílicas como surfactantes e diversos tipos de polímeros dibloco se auto-organizam em estruturas que podem ser modeladas desta forma (Jones, 2002). Diversas proposições para a deconvolução de perfis de densidade eletrônica a partir de dados experimentais podem ser encontradas na literatura (Pape & Kreutz, 1978, Zhang et al., 1994). Nestas proposições o passo inicial era tirar a raiz quadrada da

intensidade de espalhamento de modo a se obter o valor absoluto da amplitude  $f(q)$ . Ao final, por uma transformada de Fourier pode-se obter o perfil de densidade de comprimento de espalhamento  $\rho(r)$ . No entanto, este procedimento possui sérios problemas uma vez que os sinais corretos da amplitude  $f(q)$  não são conhecidos e devem ser propostos. Além disso, a região muito limitada do espaço recíproco impede um cálculo preciso da transformada de Fourier inversa. Um método mais estável foi proposto por Glatter (Glatter, 1981, Glatter & Hainisch, 1984, Bergmann et al., 2000, Pedersen, 1992) onde a convolução é feita a partir pelo uso da função  $p(r)$ . Este método permite a correta determinação do perfil de densidade eletrônica como demonstrado em diversos exemplos na literatura (Rathgeber et al., 2002). Um exemplo de aplicação é mostrado na Figura 10.



**Figura 10 – Exemplo de aplicação do método de deconvolução quadrática. A) Dados experimentais de SDS (círculos abertos) e o ajuste obtido pelo método de IFT (linha sólida). B) Função  $p(r)$  calculada pelo método de IFT (círculos abertos) e a  $p(r)$  teórica obtida pelo método de deconvolução usando o método de Glatter (linha sólida). C) Perfil de densidade eletrônica obtido representado por funções degrau (linhas tracejadas) e por uma representação suave (linha sólida). Figura retirada de (Oliveira, 2011).**

Neste método de deconvolução é necessário o cálculo da função  $p(r)$  do sistema uma vez que o ajuste é feito nesta função. Este requerimento limita a aplicabilidade do método, particularmente para a deconvolução de sistemas com fatores de estrutura (Oliveira et al., 2012). Uma abordagem inovadora pode ser utilizada, como apresento na descrição do projeto.

## 2. Projetos a serem desenvolvidos

As metodologias apresentadas anteriormente são bastante úteis, mas existem situações onde não são capazes de descrever os dados experimentais, particularmente em casos onde o fator de estrutura do sistema está presente. Nestes casos desenvolvimentos adicionais são necessários. Quando se tem a

formação de agregados ou interações interpartículas, O fator de estrutura,  $S(q)$  causa alterações principalmente a baixos valores de  $q$  sendo que para ângulos maiores ter-se-á apenas o fator de forma das partículas espalhadoras (Glatter & Kratky, 1982). Por outro lado, existem outros casos onde pode ocorrer ordenação a longo alcance, o que acaba por gerar picos de correlação em curvas de espalhamento. Nestas situações a inclusão de fatores de estrutura é muito mais complicada, pois eles afetarão a curva toda. Ao final, a curva de intensidade será o resultado da combinação dos fatores de forma das subunidades e do fator de estrutura do sistema. Os picos de difração que aparecem nas curvas de espalhamento são semelhantes aos obtidos por sistemas cristalinos, mas com a diferença de dizerem respeito a distâncias de correlação cerca de duas ordens de grandeza maiores.

### **a) Método de Transformada Inversa de Fourier Generalizado**

Neste caso pretende-se ajustar simultaneamente o fator de forma, dado por uma função  $p(r)$  apenas para a partícula espalhadora e o fator de estrutura  $S(q)$  do sistema. A intensidade pode ser expressa em função da aproximação de desacoplamento (Kotlarchyk & Chen, 1983),

$$I(q) = k P(q) [1 + \beta(q) S(q) - 1] \quad (9)$$

onde  $k$  é uma constante de proporcionalidade (para medidas em escala absoluta,  $k = N\Delta\rho^2V^2$ , sendo  $\Delta\rho$  o contraste de densidade de comprimento de espalhamento da partícula e  $V$  o volume da partícula);  $P(q) = I_1(q) = \langle f^2(\vec{q}) \rangle$  é o fator de forma da partícula;  $\beta(q) = \langle f(\vec{q}) \rangle^2 / \langle f^2(\vec{q}) \rangle$  sendo  $\langle f(\vec{q}) \rangle$  a amplitude de espalhamento promediada em todas as orientações e  $S(q)$  o fator de estrutura médio do sistema. Aproximações para o termo  $\beta(q)$  podem ser obtidas através do ajuste de parte da curva por um modelo de um elipsóide de revolução ou cilindro (Oliveira et al., 2009). O fator de forma é calculado usando a expressão,

$$P(q) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} p(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (10)$$

que é similar ao indicado na equação (4) mas o fato de que a partícula possui uma máxima dimensão finita ( $D_{\max}$ ) é explicitado na integral.

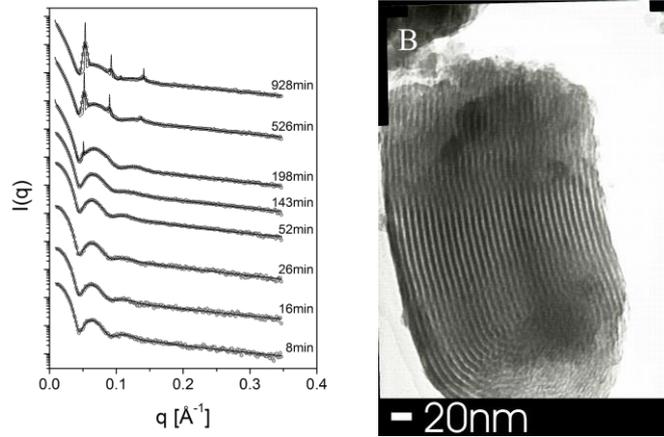
Pode-se utilizar expressões analíticas ou semi-analíticas para descrever o fator de estrutura do sistema. Na literatura pode-se obter expressões para sistemas de esferas rígidas (Kinning & Thomas, 1984), esferas rígidas “colantes” (Baxter, 1968), esferas com interação de Coulomb (Hansen & Hayter, 1982), sistemas fractais (Teixeira, 1988), agregados flexíveis (Giehm et al., 2010), composição linear de agregados (Oliveira et al., 2010), agregados globulares (Landa et al., 2013, Oliveira, Monteiro, et al., 2014), entre diversos outros.

Grande parte destas metodologias de modelagem estão implementadas no programa WGIFT desenvolvido por mim, (Oliveira et al., 2009, Oliveira, Santos, et al., 2014a, Oliveira, Monteiro, et al., 2014), permitindo sua aplicação para o estudo de diversos sistemas. O ponto principal desta

metodologia é a possibilidade de poder-se desacoplar informações de fator de forma e fator de estrutura. Tal desacoplamento permite o estudo de peculiaridades dos sistemas, mesmo quando as subunidades de interesse encontram-se agregadas. Neste projeto proponho a expansão deste programa para lidar também com sistemas polidispersos bem como introduzir outras formas de interação.

### **b) Modelagem de sistemas com ordenamento bem definido**

Vários tipos de sistemas possuem estas características. Por exemplo, na Figura 11 é mostrado um exemplo de aplicação na qual estudamos a formação *in situ* de uma rede hexagonal de micelas cilíndricas de P123, induzida pela incorporação de sílica no meio (Sundblom *et al.*, 2009).



**Figura 11 – Estudo de sílica mesoporosa ordenada em sistemas hexagonais. Esquerda: curvas de SAXS obtidas para diferentes instantes do estudo *in situ*. Direita: Figura de TEM para o sistema final calcinado. Figura tirada de (Sundblom *et al.*, 2009).**

Esta metodologia foi proposta por Förster (Forster *et al.*, 2005), Freiberger (Freiberger & Glatter, 2006) e (Sundblom *et al.*, 2009) e permite a modelagem simultânea tanto do fator de forma quanto de estrutura. Para o caso da rede hexagonal de micelas cilíndricas utilizou-se a seguinte expressão para a intensidade:

$$I(q) = S_{c_1} P_{rod}(q) \langle F_{CS}(q)^2 \rangle (1 + \beta(q)) [\langle Z(q) \rangle - 1] G(q) \quad (11)$$

sendo  $F_{CS}(q)$  o fator de forma da sessão transversal de um cilindro *core shell*,

$$F_{CS}(q) = \frac{\Delta\rho_{out}}{\Delta\rho_{in}} R_{out}^2 \frac{2J_1(qR_{out})}{qR_{out}} \exp\left[-\frac{1}{2} q^2 \sigma_{int}\right] - \left(\frac{\Delta\rho_{out}}{\Delta\rho_{in}} - 1\right) R_{in}^2 \frac{2J_1(qR_{in})}{qR_{in}} \quad (12)$$

Sendo  $R_{out}$  o raio externo e  $R_{in}$  o raio interno do cilindro. Os termos  $\Delta\rho_{out}$  e  $\Delta\rho_{in}$  são os contrastes de densidade eletrônica externa e interna respectivamente. Desenvolvi e utilizei este método em diversas publicações (Sundblom *et al.*, 2011, Sundblom *et al.*, 2010, SUNDBLOM *et al.*, 2009, Manet, Lecchi, *et al.*, 2011, Manet, Schmitt, *et al.*, 2011, Mariano-Neto *et al.*, 2014). Neste projeto expandiremos esta metodologia para casos mais complexos, como por exemplo, fatores de forma compostos de múltiplas camadas bem como outras geometrias espaciais, além de outros tipos de fatores de estrutura como cubica simples, cubica de face centrada, etc.

### **c) Sistemas Planares – Deconvolução Gaussiana**

Moléculas anfifílicas são compostas por duas regiões, com diferentes afinidades para com moléculas de água. Uma região, dita cauda hidrofóbica, não faz pontes de hidrogênio e desta forma quando inserida em sistemas aquosos obriga uma estruturação das moléculas de água ao redor da mesma. Um exemplo de moléculas puramente hidrofóbicas são óleos em geral: quando dispersados em água, dependendo da concentração do óleo na água pode-se ter até a separação das fases água-óleo (Jones, 2002). No entanto, as moléculas anfifílicas possuem outra região, dita cabeça hidrofílica, que faz pontes de hidrogênio e sendo assim possui afinidade com a água. Esta molécula anfifílica, com caráter heterogêneo, quando colocada em água apresenta uma auto-organização, de modo a expor a região hidrofílica ao solvente e esconder a região hidrofóbica diminuindo assim a energia livre total do sistema. Dependendo de suas características geométricas as estruturas formadas podem ser micelas (esféricas ou cilíndricas) ou estruturas planares, bicamadas, podendo estas serem unilamelares ou multilamelares (Jones, 2002, Hamley, 2000). Dados de espalhamento a baixos ângulos são bastante pertinentes para o estudo destes sistemas devido aos diferentes contrastes de comprimento de espalhamento. Quando o estudo é feito utilizando raios X em sistemas aquosos, a “cabeça” pode ter contraste positivo com relação ao solvente enquanto que a cauda pode ter contraste negativo. Este contraste positivo/negativo fornece uma característica bastante peculiar à intensidade de espalhamento para este tipo de sistema. Dados de espalhamento para estruturas planares multilamelares contém informações sobre o fator de forma (da bicamada lipídica) e também fator de estrutura (do sistema lamelar).

Desenvolvi recentemente uma metodologia capaz de obter simultaneamente o fator de forma e de estrutura para este caso (Oliveira et al., 2012), mas que permite uma descrição otimizada do fator de forma do sistema. Uma das principais vantagens deste método é o fato de modelar diretamente a curva de espalhamento, o que confere uma grande flexibilidade ao método. O perfil de densidade de comprimento de espalhamento para este caso é descrito por uma combinação de funções Gaussianas. Um exemplo de aplicação é mostrado na Figura 12. Uma metodologia inovadora de modelagem foi desenvolvida para a descrição deste tipo de sistema, como apresentado em detalhe no artigo original (Oliveira *et al.*, 2012).

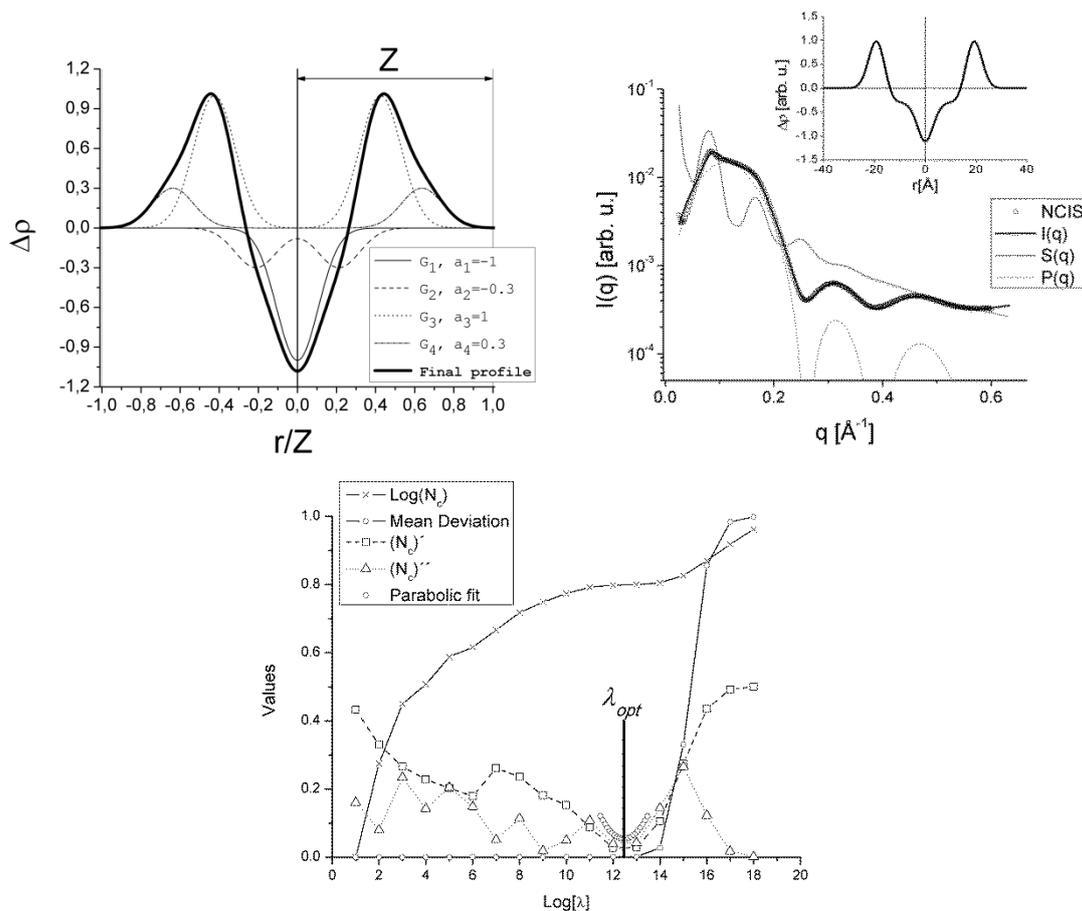


Figura 12 – Esquerda: Construção do perfil de densidade eletrônica utilizando quatro Gaussianas (G1, G2, G3 and G4) com quatro diferentes amplitudes (-1, -0.3, 1, 0.3). São mostrados com quatro linhas diferentes. O perfil resultante é mostrado em linha contínua e grossa. Direita: Ajuste de dados experimentais utilizando o modelo de 4 gaussianas. Circulos Abertos: dados experimentais para sistema de lipossomas de fosfatidilcolina de ovo. Linha contínua: Intensidade teórica. Linha pontilhada: fator de estrutura. Linha Tracejada: fator de forma  $|F(q)|^2$ . O perfil de densidade eletrônica obtido é mostrado como um inset. Abaixo: Método de ponto de inflexão, executado automaticamente pelo programa de ajuste para determinar o valor de  $\lambda_{opt}$ . Figura tirada de (Oliveira *et al.*, 2012)

Este método vem sendo utilizado em diversas aplicações (Oliveira *et al.*, 2012, Balbino *et al.*, 2013, Balbino *et al.*, 2012, Gerbelli *et al.*, 2013, Carvalho *et al.*, 2015). Neste projeto este método será ampliado de modo a permitir a modelagem de sistemas bifásicos bem como permitir a introdução de outras características no modelo.

#### d) Método de Deconvolução Generalizado

Como mencionado anteriormente, modelagem de dados através do ajuste direto da curva de espalhamento apresentam diversas vantagens. A modelagem no espaço recíproco permite a fácil inclusão de termos adicionais como *backgrounds*, anisotropias, polidispersidades e contribuições diversas.

Diversos sistemas podem ser satisfatoriamente descritos como possuindo fatores de forma compostos por lamelas (planos), cilindros ou esferas (esferóides), com uma densidade de espalhamento variável ao longo da partícula. Nestes sistemas pode-se ainda ter a presença de fatores de estrutura, seja ordenamento ou simplesmente algum tipo de interação. Sendo assim, o método de modelagem deve permitir a descrição tanto do fator de forma, com forma definida para a partícula, mas permitindo a modelagem da variação da densidade de espalhamento ao longo da partícula, e também a descrição do fator de estrutura, descrito por uma função analítica, semi-analítica ou simulada.

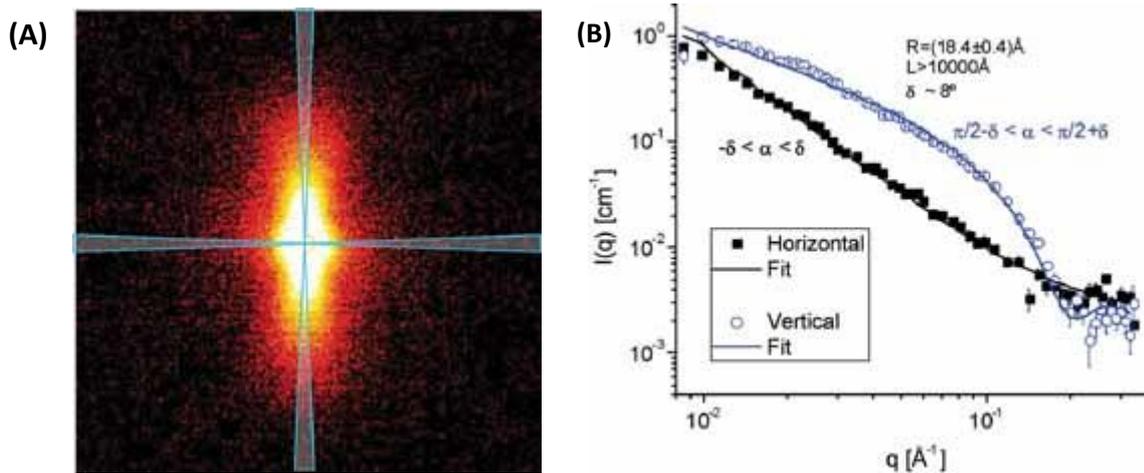
Este procedimento generalizado foi proposto por Glatter (Freiberger & Glatter, 2006, Fritz & Glatter, 2006, Bergmann et al., 2000, Fritz et al., 2000), requerendo, no entanto, o cálculo da função  $p(r)$  para a descrição do fator de forma. A necessidade do cálculo da função  $p(r)$  gera dificuldades intrínsecas devido à inclusão de vínculos na modelagem, além de impossibilitar a inclusão características como anisotropias, polidispersidades e componentes adicionais para a intensidade. Como demonstrado para o *Método de Deconvolução Gaussiana*, ajustes no espaço recíproco inferem uma maior flexibilidade à modelagem.

Proponho neste projeto uma generalização do Método de Deconvolução Gaussiana, o *Método de Deconvolução Generalizado*, permitindo a inclusão de outras possíveis geometrias no sistema, como por exemplo, formas elipsoidais e cilíndricas, a modelagem do perfil de densidade eletrônica bem como a otimização dos parâmetros relacionados ao fator de estrutura. Um procedimento inicial já foi aplicado ao estudo de lipoproteínas em duas publicações recentes (Oliveira, Santos, et al., 2014b, Oliveira, Monteiro, et al., 2014), mas o método será otimizado neste projeto de modo a permitir a modelagem em diversas geometrias.

#### **e) Desenvolvimentos adicionais**

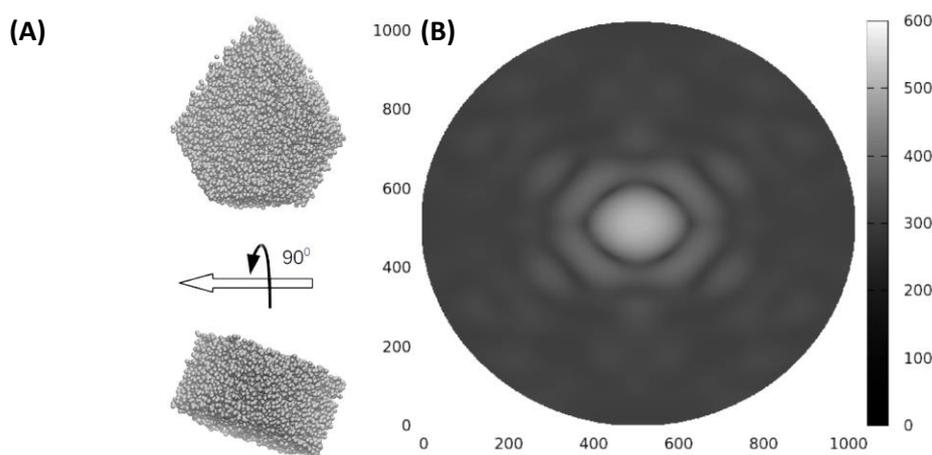
Alguns métodos e procedimentos ainda estão em fase seminal, mas pretendo desenvolvê-los ao longo do projeto. Por exemplo, nos dados apresentados até o momento, o enfoque foi para sistemas randomicamente orientados, de modo que a intensidade de espalhamento independe do ângulo azimutal, podendo então ser integrada, e fornece uma curva 1D.

No entanto, em diversos sistemas tem-se uma orientação das partículas e, neste caso, a intensidade espalhada será anisotrópica. Um exemplo é mostrado na Figura 13, onde dados bidimensionais de SAXS foram analisados. Neste caso uma análise tentativa foi realizada, através do ajuste de cortes na imagem. No entanto, pode-se tentar uma abordagem mais elaborada através do cálculo da intensidade de espalhamento para sistemas orientados.



**Figura 13** – Dados de SAXS bidimensionais para amostras de agregados peptídeo YYKLVFFC alinhado. Este peptídeo forma agregados cilíndricos que se orientam naturalmente. A imagem mostra que estas fibras se orientam na direção horizontal. Os dois cortes, vertical e horizontal, estão indicados e os ajustes mostrados em (B). No ajuste utilizamos o modelo de cilindros orientados. Figura tirada de (HAMLEY *et al.*, 2010).

Para casos onde se tem uma expressão analítica, ou semi-analítica para o sistema, pode-se calcular o espectro bidimensional para o espalhamento da partícula orientada. No entanto, em um caso geral para formas não simples, este cálculo não era possível até o momento devido a demandar um custo computacional impraticável (McAlister & Grady, 1998). Venho desenvolvendo um procedimento baseado no método de elementos finitos que permite a simulação de dados de espalhamento para sistemas orientados com formas diversas, em simulações rápidas. Este desenvolvimento ainda está em fase inicial, mas já foi possível obter dados promissores. Na Figura 14 apresento um exemplo de cálculo para um poliedro. Como pode ser visto, o método é capaz de realizar o cálculo da intensidade bidimensional. Este trabalho vem sendo desenvolvido por meu estudante de Doutorado, Cassio Alves.



**Figura 14** – Simulação de padrões de espalhamento em duas dimensões dos poliedros de Johnson J54. A) (cinza claro) Orientação do modelo do sólido de Johnson J54 na orientação de incidência do feixe e abaixo o mesmo modelo rotacionado. B) Padrão de difração da intensidade de espalhamento do sólido J54, de acordo com a orientação do modelo em A. Figura tirada de (Alves, 2015).

### 3. Resultados Esperados

Com os desenvolvimentos propostos neste projeto pretendo expandir a aplicabilidade do método de espalhamento a baixos ângulos ao estudo de sistemas bastante complexos, onde tem-se conjuntamente tanto fatores de forma quanto fatores de estrutura, dos mais variados tipos. Como demonstrei ao longo do texto bem em como nos artigos citados, tal metodologia vem sendo aplicada com sucesso em varias aplicações, e a otimização dos procedimentos e inclusão de novos modelos aumentara ainda mais sua aplicabilidade. Os programas que desenvolvo são escritos na linguagem FORTRAN, bastante robustos, sendo facilmente compiláveis em diversos sistemas operacionais. Pretendo aperfeiçoar a interface destes programas para permitir uma utilização mais simplificada por parte dos usuários do programa. Além disso, na medida do possível os executáveis já compilados e testados em diversos sistemas operacionais serão disponibilizados na *web* para *download* ou utilização via site.

Pretendo utilizar estes desenvolvimentos em diversos projetos que desenvolvo e coordeno. Por exemplo, no estudo de sistemas micelares e sistemas surfactantes-proteínas (Sun *et al.*, *submitted*), tema no qual já tive um projeto FAPESP (#2010/09277-7), bem como tenho um posdoc atualmente financiado pela FAPESP (Dr. Yang Sun # 2013/09604-6) o desenvolvimento de modelos teóricos para a modelagem dos complexos formados foi implementada bem como está sendo adaptada para diversos outras aplicações. Além disso, possui um aluno de Doutorado, Pedro L. O. Filho, que desenvolve seu tema de pesquisa neste tema, tendo defendido recentemente uma tese de mestrado no estudo de sistemas micelares (Oseliero Filho, 2013). Em outro projeto, desenvolvo diversos estudos de proteínas em solução, combinando métodos desenvolvidos por mim em conjunto com a metodologia *ab initio* descrita anteriormente, que permitem o estudo e caracterização de proteínas em solução (Demasi, Hand, Ohara, *et al.*, 2014, da Silva *et al.*, 2014). Por fim, tenho colaborações estabelecidas com diversos grupos de pesquisa que utilizam meus métodos de modelagem para descrição de dados provenientes tanto dos equipamentos do IFUSP como de laboratórios e fontes sincrotron de todo o mundo. Estas colaborações e projetos naturalmente requerem a otimização dos métodos.

## 4. Cronograma

Atividades Propostas	Semestres			
	1	2	3	4
Desenvolvimento do método WIFT e WGIFT para inclusão de modelagem de sistemas polidispersos e diversos fatores de estrutura				
Desenvolvimento do método de Deconvolução Gaussiana, incluindo modelagem de fases bifásicas bem como outras funcionalidades				
Desenvolvimento do método de Deconvolução Generalizado, incluindo modelagem por diversas geometrias, fatores de estrutura bem como outras funcionalidades				
Otimização do método de modelagem por elementos finitos de modo a permitir a fácil construção de modelos e ajuste de dados				
Otimização da interface gráfica dos programas				
Montagem de uma <i>webpage</i> interativa para disponibilização dos programas				
Participação em workshops, escolas e eventos				
Publicação dos resultados obtidos pela utilização dos métodos desenvolvidos				

## 5. Contribuições para a Instituição

Sou coordenador de dois equipamentos de SAXS de laboratório no instituto de Física da USP, NANOSTAR-Bruker e XEUSS-Xenocs. Nestes equipamentos um numero muito grande de projetos são desenvolvidos e grande parte dos mesmos se utiliza de meus programas para o tratamento dos dados bem como modelagem e análise. Além disso, em diversos de meus projetos é necessário o desenvolvimento de porta-amostras adicionais bem como a manufatura de peças, suportes, etc. Tais aparatos incrementam a infra-estrutura do próprio sistema, aumentando suas potencialidades. O desenvolvimento dos métodos propostos bem como outras aplicações é extremamente importante para a análise dos dados obtidos e obtenção de informações estruturais. Na literatura diversos procedimentos de análise estão disponíveis (Kohlbrecher & Bressler, 2006, Petoukhov *et al.*, 2012, Ilavsky & Jemian, 2009), mas não oferecem as ferramentas de modelagem que proponho neste projeto. Deste modo, tais programas serão uteis tanto para os projetos que desenvolvo na instituição bem como para a comunidade científica.

Criei recentemente um curso de pós-graduação aqui no IFUSP, “*PGF5310: Espalhamento A Baixos Ângulos: Teoria e Experimentos*”, tendo lecionado o mesmo no primeiro semestre de 2014. Trata-se de um curso teórico-prático que fornece as bases essenciais para os estudantes utilizarem a técnica. Além disso, organizei recentemente uma escola de Verão, com recursos FAPESP (#2013/17943-5), “*EMBO Global Exchange Lecture Course on Structural and Biophysical Methods for Biological Macromolecules in Solution 2014 / São Paulo - Brazil*”, onde métodos avançados para estudo e caracterização de macromoléculas biológicas foram apresentados, e dentre estes métodos, a análise e modelagem de dados de espalhamento a baixos ângulos foi um dos principais destaques. Os desenvolvimentos propostos neste projeto também serão bastante uteis tanto no curso de pós que leciono, bem em como escolas de verão, *workshops*, etc, que promovo, de modo a facilitar o acesso e utilização das ferramentas na análise de dados.

## 6. Bibliografia

- Alves, C. (2015). thesis, Universidade de São Paulo.
- Alves, C., Pedersen, J. S. & Pinto Oliveira, C. L. (2014). *Journal of Applied Crystallography* **47**, 84-94.
- Andersen, C. B. F., Torvund-Jensen, M., Nielsen, M. J., Pinto de Oliveira, C. L., Hersleth, H.-P., Andersen, N. H., Pedersen, J. S., Andersen, G. R. & Moestrup, S. K. (2012). *Nature* **489**, 456-U150.
- Balbino, T. A., Aoki, N. T., Gasperini, A. A. M., Oliveira, C. L. P., Azzoni, A. R., Cavalcanti, L. P. & de la Torre, L. G. (2013). *Chemical Engineering Journal* **226**, 423-433.
- Balbino, T. A., Gasperini, A. A. M., Oliveira, C. L. P., Azzoni, A. R., Cavalcanti, L. P. & de La Torre, L. G. (2012). *Langmuir* **28**, 11535-11545.
- Baxter, R. J. (1968). *Journal of Chemical Physics* **49**, 2770-&.
- Behrens, M. A., He, Y., Oliveira, C. L. P., Andersen, G. R., Pedersen, J. S., Nielsen, K. H. & Jankowsky, E. (2012). *Rna Helicases* **511**, 191-212.
- Bergmann, A., Fritz, G. & Glatter, O. (2000). *Journal of Applied Crystallography* **33**, 1212-1216.
- Calcutta, A., Jessen, C. M., Behrens, M. A., Oliveira, C. L. P., Renart, M. L., Gonzalez-Ros, J. M., Otzen, D. E., Pedersen, J. S., Malmendal, A. & Nielsen, N. C. (2012). *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1818**, 2290-2301.
- Carvalho, J., Toniazzo, T., Cavalcanti, L., Moraes, I., Oliveira, C. & Pinho, S. (2015). *submitted*.
- Chacon, P., Moran, F., Diaz, J. F., Pantos, E. & Andreu, J. M. (1998). *Biophysical Journal* **74**, 2760-2775.
- da Silva, V. M., Colussi, F., Neto, M. D., Braz, A. S. K., Squina, F. M., Oliveira, C. L. P. & Garcia, W. (2014). *Plos One* **9**.
- Debye, P. (1915). *Annalen Der Physik* **46**, 809-823.
- Demasi, M., Hand, A., Ohara, E., Oliveira, C. L. P., Bicev, R. N., Bertoncini, C. A. & Netto, L. E. S. (2014). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **557**, 65-71.
- Demasi, M., Hand, A., Oliveira, C. L. P., Bicev, R. N., Bertoncini, C. A. & Netto, L. E. S. N. (2014). *Archives of Biochemistry and Biophysics in press*, -.
- Demasi, M., Netto, L. E. S., Silva, G. M., Hand, A., Oliveira, C. L. P., Bicev, R. N., Gozzo, F., Barros, M. H., Leme, J. M. M. & Ohara, E. (2014). *Redox Biology* **2**, 44 - 51.
- Feigin, L. & Svergun, D. (1987). *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*. Plenum Publishing Corporation – Plenum Press, New York.
- Forster, S., Timmann, A., Konrad, M., Schellbach, C., Meyer, A., Funari, S. S., Mulvaney, P. & Knott, R. (2005). *Journal of Physical Chemistry B* **109**, 1347-1360.
- Freiberger, N. & Glatter, O. (2006). *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 14719-14727.
- Fritz, G., Bergmann, A. & Glatter, O. (2000). *Journal of Chemical Physics* **113**, 9733-9740.
- Fritz, G. & Glatter, O. (2006). *Journal of Physics-Condensed Matter* **18**, S2403-S2419.
- Gerbelli, B. B., Rubim, R. L., Silva, E. R., Nallet, F., Navailles, L., Oliveira, C. L. P. & de Oliveira, E. A. (2013). *Langmuir* **29**, 13717-13722.
- Giehm, L., Oliveira, C., Christiansen, G., Pedersen, J. & Otzen, D. (2010). *Journal of Molecular Biology* **401**, 115-133.
- Glatter, O. (1977). *Journal of Applied Crystallography* **10**, 415-421.
- Glatter, O. (1980). *Acta Physica Austriaca* **52**, 243-256.
- Glatter, O. & Kratky, O. (1982). *Small Angle X-ray Scattering*. Academic Press, London.
- HAMLEY, I., CASTELLETTO, V., MOULTON, C., MYATT, D., SILIGARDI, G., OLIVEIRA, C., PEDERSEN, J., ABUTBUL, I. & DANINO, D. (2010). *MACROMOLECULAR BIOSCIENCE* **10**, 40-48.
- Hamley, I. W. (2000). *Introduction to soft matter polymers, colloids, amphiphiles and liquid crystals*. Chichester: Wiley.
- Hansen, J. P. & Hayter, J. B. (1982). *Molecular Physics* **46**, 651-656.
- Hume, A. *Polyhedron Database*, <http://www.netlib.org/polyhedra/>.
- Ilavsky, J. & Jemian, P. R. (2009). *Journal of Applied Crystallography* **42**, 347-353.
- Jones, R. A. L. (2002). *Soft condensed matter*. Oxford: Oxford University Press.
- Kinning, D. J. & Thomas, E. L. (1984). *Macromolecules* **17**, 1712-1718.
- Knoll, G. F. (2010). *Radiation detection and measurement*, 4th ed. ed. Hoboken, N.J.: Wiley.
- Kohlbrecher, J. & Bressler, I. (2006). *Software package SASfit for fitting small-angle scattering curves*, <https://kur.web.psi.ch/sans1/SANSSoft/sasfit.html>.
- Kotlarchyk, M. & Chen, S. H. (1983). *Journal of Chemical Physics* **79**, 2461-2469.
- Landa, R. A., Soledad Antonel, P., Ruiz, M. M., Perez, O. E., Butera, A., Jorge, G., Oliveira, C. L. P. & Martin Negri, R. (2013). *Journal of Applied Physics* **114**.

- Manet, S., Lecchi, A., Imperor-Clerc, M., Zholobenko, V., Durand, D., Oliveira, C. L. P., Pedersen, J. S., Grillo, I., Meneau, F. & Rochas, C. (2011). *Journal of Physical Chemistry B* **115**, 11318-11329.
- Manet, S., Schmitt, J., Imperor-Clerc, M., Zholobenko, V., Durand, D., Oliveira, C. L. P., Pedersen, J. S., Gervais, C., Baccile, N., Babonneau, F., Grillo, I., Meneau, F. & Rochas, C. (2011). *Journal of Physical Chemistry B* **115**, 11330-11344.
- Mariano-Neto, F., Matos, J. R., Cides da Silva, L. C., Carvalho, L. V., Scaramuzzi, K., Sant'Anna, O. A., Oliveira, C. P. & Fantini, M. C. A. (2014). *Journal of Physics D-Applied Physics* **47**.
- McAlister, B. C. & Grady, B. P. (1998). *Journal of Applied Crystallography* **31**, 594-599.
- Oliveira, C. (2001). thesis, Universidade Estadual de Campinas, Brazil.
- Oliveira, C. (2005). thesis, Universidade Estadual de Campinas, Brazil.
- Oliveira, C. L. P. (2011). *Current Trends in X-Ray Crystallography*, edited by D. A. Chandrasekaran, pp. 367-392: InTech.
- Oliveira, C. L. P., Behrens, M. A., Pedersen, J. S. & al., e. (2009). *Journal of Molecular Biology* **387**, 147-161.
- Oliveira, C. L. P., Gerbelli, B. B., Silva, E. R. T., Nallet, F., Navailles, L., Oliveira, E. A. & Pedersen, J. S. (2012). *Journal of Applied Crystallography* **45**, 1278-1286.
- Oliveira, C. L. P., Juul, S., Jorgensen, H. L., Knudsen, B., Tordrup, D., Oteri, F., Falconi, M., Koch, J., Desideri, A., Pedersen, J. S., Andersen, F. F. & Knudsen, B. R. (2010). *Acs Nano* **4**, 1367-1376.
- Oliveira, C. L. P., Monteiro, A. M. & Figueiredo Neto, A. M. (2014). *Brazilian Journal of Physics* **44**, 753-764.
- Oliveira, C. L. P. & Pedersen, J. S. (2013). *Amyloid Fibrils and Prefibrillar Aggregates*, edited by D. E. Otzen. Weinheim: Wiley-VCH.
- Oliveira, C. L. P., Santos, P., Monteiro, A. & Figueiredo Neto, A. M. (2014a). *Biophysical Journal* **106**, 2595–2605.
- Oliveira, C. L. P., Santos, P. R., Monteiro, A. M. & Figueiredo Neto, A. M. (2014b). *Biophysical Journal* **106**, 2595-2605.
- Oseliero Filho, P. L. (2013). thesis, Universidade de São Paulo, Brazil.
- Pedersen, J. S. (1997). *Advances in Colloid and Interface Science* **70**, 171-210.
- Pedersen, J. S., Oliveira, C. L. P., Hubschmann, H. B., Arleth, L., Manniche, S., Kirkby, N. & Nielsen, H. M. (2012). *Biophysical Journal* **102**, 2372-2380.
- Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H. D. T., Konarev, P. V. & Svergun, D. I. (2012). *Journal of Applied Crystallography* **45**, 342-350.
- Petoukhov, M. V. & Svergun, D. I. (2005). *Biophysical Journal* **89**, 1237-1250.
- Press, W. H. (1992). *Numerical recipes in FORTRAN : the art of scientific computing*, 2nd ed. ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rasmussen, L. C. V., Oliveira, C. L. P., Byron, O., Jensen, J. M., Pedersen, J. S., Sperling-Petersen, H. U. & Mortensen, K. K. (2011). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **416**, 140-145.
- Rasmussen, L. C. V., Pinto Oliveira, C. L., Pedersen, J. S., Sperling-Petersen, H. U. & Mortensen, K. K. (2011). *Biochemistry* **50**, 9779-9787.
- Semenyuk, A. V. & Svergun, D. I. (1991). *Journal of Applied Crystallography* **24**, 537-540.
- Silva, G. M., Netto, L. E. S., Simoes, V., Santos, L. F. A., Gozzo, F. C., Demasi, M. A. A., Oliveira, C. L. P., Bicev, R. N., Klitzke, C. F., Sogayar, M. C. & Demasi, M. (2012). *Antioxidants & Redox Signaling* **16**, 1183-1194.
- Sun, Y., Oseliero Filho, P. L., Junior, J., Carvalho, J., Schreier, S. & Oliveira, C. L. P. (submitted).
- SUNDBLOM, A., OLIVEIRA, C., PALMQVIST, A. & al., e. (2009). *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY C* **113**, 7706-7713.
- Sundblom, A., Oliveira, C., Palmqvist, A. & Pedersen, J. (2009). *Journal of Physical Chemistry C* **113**, 7706-7713.
- Sundblom, A., Oliveira, C., Pedersen, J. & Palmqvist, A. (2010). *Journal of Physical Chemistry C* **114**, 3483-3492.
- Sundblom, A., Oliveira, C. L. P., Pedersen, J. S. & Palmqvist, A. E. C. (2011). *Microporous and Mesoporous Materials* **145**, 59-64.
- Svergun, D., Barberato, C. & Koch, M. H. J. (1995). *Journal of Applied Crystallography* **28**, 768-773.
- Svergun, D. I. (1999). *Biophysical Journal* **77**, 2896-2896.
- Svergun, D. I., Petoukhov, M. V. & Koch, M. H. J. (2001). *Biophysical Journal* **80**, 2946-2953.
- Svergun, D. I., Volkov, V. V., Kozin, M. B., Stuhrmann, H. B., Barberato, C. & Koch, M. H. J. (1997). *Journal of Applied Crystallography* **30**, 798-802.
- Szekely, P., Ginsburg, A., Ben-Nun, T. & Raviv, U. (2010). *Langmuir* **26**, 13110-13129.
- Teixeira, J. (1988). *Journal of Applied Crystallography* **21**.
- Walther, D., Cohen, F. E. & Doniach, S. (2000). *Journal of Applied Crystallography* **33**, 350-363.
- Yan, Y., de Keizer, A., Martens, A., Oliveira, C., Pedersen, J., de Wolf, F., Drechsler, M., Stuart, M. & Besseling, N. (2009). *LANGMUIR* **25**, 12899-12908.