

Universidade do Estado do Rio de Janeiro Centro de Tecnologia e Ciência Instituto de Matemática e Estatística

Felipe da Costa Thadeu

Modelagem computacional da teoria de Stern-Volmer aplicada ao estudo da interação de ligantes com proteínas

> Rio de Janeiro 2019

Felipe da Costa Thadeu

Modelagem computacional da teoria de Stern-Volmer aplicada ao estudo da interação de ligantes com proteínas

DAUL



Orientadores: Prof. Dr. Dilson Silva Prof.^a Dra. Celia Martins Cortez Silva

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CTC/A

T363	Thadeu, Felipe da Costa. Modelagem computacional da teoria de Stern-Volmer aplicada ao estudo da interação de ligantes com proteínas/ Felipe da Costa Thadeu. – 2019. 66 f.: il.
	Orientador: Dilson Silva Coorientadora: Célia Martins Cortez Silva Dissertação (Mestrado em Ciências Computacionais) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Matemática e Estatística.
	1. Modelagem de dados - Teses. 2. Fluorescência - Teses. 3. Proteínas - Teses. I. Silva, Dilson. II. Silva, Célia Martins Cortez. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Matemática e Estatística. IV.Título.
	CDU 004.652

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Felipe da Costa Thadeu

Modelagem computacional da teoria de Stern-Volmer aplicada ao estudo da interação de ligantes com proteínas

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Computacionais, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2019. Banca Examinadora:

> Prof. Dr. Dilson Silva (Orientador) Instituto de Matemática e Estatística – UERJ

Prof.^a Dra. Celia Martins Cortez Silva (Orientadora) Instituto de Matemática e Estatística – UERJ

Prof.^a Dra. Maria Clícia Stelling de Castro Instituto de Matemática e Estatística – UERJ

Prof.^a Dra. Viviane Muniz da Silva Fragoso Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pela dádiva da vida e por conceder-me paciência, tranquilidade e paz para não desistir e conseguir realizar este trabalho.

Aos meus orientadores, Professor Dr. Dilson Silva e Professora Dr.^a Celia Martins Cortez Silva, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Tantas vezes que nos reunimos e, embora em algumas eu chegasse desestimulado, bastavam alguns minutos de conversa e umas poucas palavras de incentivo e lá estava eu, com o mesmo ânimo do primeiro dia. Muito obrigado por acreditar em mim e pelos tantos elogios e incentivos.

Aos membros da banca examinadora, Professora Dr.^a Maria Clícia Stelling de Castro e Professora Dr.^a Viviane Muniz da Silva Fragoso, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

Aos demais professores e colaboradores do Programa de Pós-Gradruação em Ciências Computacionais por toda a dedicação e empenho na realização das suas funções para melhor contribuir ao Programa e aos seus alunos.

Ao Instituto de Pesquisas da Marinha, representado pelos seus diretores no decorrer do curso, CAlte(EN) Luiz Carlos Delgado, CAlte(EN) Ricardo Soares Ferreira e CMG(EN) José Vicente Calvano, e , especificamente, aos militares CF(EN) André Chaves Mendes, CF(EN) Adriano Guedes de Carvalho, CC(T) Rui Rodrigues de Mello Junior e demais servidores e funcionários deste instituto, pelos processos condizentes à concessão de afastamento parcial para realização das disciplinas do curso e apoio para prosseguir com o curso e o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meus pais, Sidney e Lúcia, por todo amor, carinho, apoio e ensinamentos em toda a minha vida, formando quem eu sou, e sendo de fundamental importância também para a realização desse trabalho; no aspecto emocional, motivando-me a prosseguir, e no aspecto prático contribuindo em revisões do texto.

A minha namorada Juliana, por estar todo momento ao meu lado; apoiar-me, motivar-me, encorajar-me e ajudar-me a prosseguir e desenvolver este trabalho, revisando tantas vezes o texto e o desenvolvimento deste projeto. E, mais que isso, agradeço muito a ela por tê-la na minha vida sempre ao meu lado, como namorada, companheira, amiga, confidente e a mulher que eu tanto amo. Muito obrigado por todo amor, carinho, apoio, atenção e preocupação. Você é um presente na minha vida. Obrigado por fazer-me um homem melhor.

Finalmente, ao meus amigos, em especial Marcos Vinícius, João Vitor e Daniel Trindade, pelo apoio de sempre, sendo amigos que eu sei que posso contar por toda a minha vida.

RESUMO

THADEU, F. C. Modelagem computacional da teoria de Stern-Volmer aplicada ao estudo da interação de ligantes com proteínas. 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Computacionais) – Instituto de Matemática e Estatística, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O presente trabalho descreve um modelo matemático computacional voltado para a aplicação da teoria de Stern-Volmer no tratamento de dados obtidos dos espectrofluorímetros no método de supressão de fluorescência. Uma vez que nas pesquisas atuais tais tratamentos são realizados manualmente e repetidamente por uma equipe de pesquisadores, além do alto consumo de tempo, é possível que haja a introdução de erros ou de procedimentos incorretos no processo, que podem comprometer os resultados atingidos. Assim, o desenvolvimento de uma ferramenta dedicada para realizar essa tarefa torna-se relevante, sendo esta modelagem o alvo desta pesquisa. O objetivo do trabalho é o de desenvolver um programa que permita agilizar e sistematizar o tratamento matemático e estatístico dos dados instrumentais que são aplicados às equações e parâmetros definidos pela Teoria de Stern-Volmer, visando a obtenção dos gráficos e constantes que caracterizam as interações entre diversos ligantes e proteínas, através do método de supressão de fluorescência. O software proposto foi desenvolvido no Ambiente de Desenvolvimento Integrado (IDE) Netbeans 8.2, utilizando a linguagem Java 8, com interface gráfica JavaFX, permitindo a direta entrada de dados provenientes dos fluorímetros, e proporcionando a simplificação, dinamização e refinamento na obtenção dos resultados. Tal software foi implementado e é capaz de apresentar os gráficos, as equações e as constantes relacionadas ao fenômeno de supressão de fluorescência conforme o modelo de Stern-Volmer, automatizando e agilizando a obtenção de resultados no que tange as análises de dados de supressão de fluorescência decorrente da interação de ligantes com proteínas.

Palavras-chave: Modelagem computacional. Supressão de fluorescência. Teoria de Stern-Volmer. Regressão linear.

ABSTRACT

THADEU, F. C. Computational modeling of Stern-Volmer theory applied to the study of the interaction of protein binders. 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Computacionais) – Instituto de Matemática e Estatística, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The present work describes a computational mathematical model for the application of the Stern-Volmer theory in the treatment of data obtained from spectrofluorimeters in the method of quenching of fluorescence. Since in current research such treatments are performed by a team of researchers, manually and repeatedly, in addition to the high time consumption, there may be mistakes or incorrect procedures in the process that could compromise the results achieved. Thus, the development of a dedicated tool to accomplish this task becomes relevant, being this model the target of this research. The objective of the work is to develop a program that allows to streamline and systematize the mathematical and statistical treatment of the instrumental data that are applied to the equations and parameters defined by the Stern-Volmer Theory, aiming to obtain the graphs and constants that characterize the interactions between a variety of ligands and proteins, by the fluorescence suppression method. The proposed software was developed in the Netbeans 8.2 Integrated Development Environment (IDE), using the Java 8 language, with JavaFX graphical interface, allowing the direct input of data from the fluorimeters, and providing the simplification, dynamization and refinement in obtaining results. Such software has been implemented and is able to present the graphs, equations and constants related to the phenomenon of fluorescence quenching according to the Stern-Volmer model, automating and speeding up the results in relation to the data analysis of fluorescence quenching due to the interaction of ligands with proteins.

Keywords: Computational modeling. Quenching of fluorescence. Stern-Volmer theory. Linear regression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	1 - Diagrama esquemático do arranjo de <i>spins</i> para os diferentes estados	
	de excitação	14
Figura	2 - Diagrama de Jablonski	15
Figura	3 - Gráfico de Stern-Volmer para a supressão dinâmica	18
Figura	4 - Gráfico de Stern-Volmer para a supressão estática	22
Figura	5 - Exemplo de supressão esfera de ação	23
Figura	6 - Supressão dinâmica e estática em um mesmo grupo de fluoróforos $\ . \ .$	25
Figura	7 - Exemplo do fenômeno de blindagem no processo de supressão 	26
Figura	8 - Exemplo do fenômeno de carga no processo de supressão	27
Figura	9 - Exemplo de acessibilidade fracionada	28
Figura	10 - Gráfico de Stern-Volmer: variação de inacessibilidade	30
Figura	11 - Modelagem da estrutura molecular da albumina sérica humana $\ \ .\ .$.	31
Figura	12 - Gráficos de Stern-Volmer: supressão da Endo III pelo i odeto $\ .\ .\ .$.	32
Figura	13 - Gráfico de Stern-Volmer da supressão da acrilamida	33
Figura	14 - Gráficos da duração do decaimento de fluorescência do CRP na pre-	
	sença ou ausência do cAMP	34
Figura	15 - Fluxograma geral de uso e operacionalidade do software \ldots	37
Figura	16 - Formulário de introdução de dados	38
Figura	17 - Visão geral da aplicação executando uma análise $\ \ldots\ \ldots\ \ldots\ \ldots\ \ldots$	39
Figura	18 - Diagrama em blocos do algoritmo realizado pela aplicação $\ . \ . \ . \ .$	40
Figura	19 - Extrato da aplicação apresentando a Tabela de Dados Experimentais	
	Corrigidos	41
Figura	20- Extrato da aplicação apresentando o Gráfico de Espectro de Fluorescência	42
Figura	21 - Extrato da aplicação apresentando o Gráfico de Supressão de Fluo-	
	rescência	44
Figura	22 - Extrato da aplicação apresentando os Dados Tratados	45
Figura	23 - Extrato da aplicação apresentando o Gráfico de Stern-Volmer $\ .\ .\ .$	46
Figura	24 - Detalhe dos resultados apresentados pelo programa $\ .\ .\ .\ .\ .$	47
Figura	25 - Detalhe de um exemplo dos resíduos de uma análise	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)								
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico								
CRP	Proteína C-reativa								
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Dessoribonucleico)								
Endo III	Endonuclease III								
HSA	Human Serum Albumin (Albumina Sérica Humana)								
IDE	Integrated Development Environment (Ambiente de Desenvolvimento								
	Integrado)								
Trp	Triptofano								
fdb	Fluorescence Data Base (formato de arquivo próprio)								
DHE	Di-hidroequilenina								
SBP	Steroid-binding Protein (Proteína de ligação de esteroides)								
EP	1-etilpireno								
DMAS	Sulfanato de dimetilanilina								
DTAC	Cloreto de dodeciltrimetilamónio								
SDS	Dodecilsulfato de sódio								
IHM	Interface Homem Máquina								

LISTA DE SÍMBOLOS

S_0	Estado singleto fundamental
S_1	Estado excitado singleto primeiro
S_2	Estado excitado singleto segundo
T_1	Estado excitado tripleto
F_0	Intensidade de fluorescência na ausência de supressor
F_{0a}	Intensidade de fluorescência de um fluorófor o ${\it a}$ na ausência de supressor
F_{0b}	Intensidade de fluorescência de um fluorófor o \boldsymbol{b} na ausência de supressor
F	Intensidade de fluorescência na presença de supressor
K_a	Constante de Stern-Volmer do fluoróforo a
K_b	Constante de Stern-Volmer do fluoróforo b
[Q]	Concentração de supressor
ΔF	Variação da Intensidade de fluorescência
f_a	Fração inicial de fluorescência acessível do fluorófor o \boldsymbol{a}
k_q	Constante de supressão bimolecular de fluorescência
$ au_0$	Tempo de vida do fluoróforo na ausência de supressor
τ	Tempo de vida do fluoróforo na presença de supressor
K_D	Constante de Stern-Volmer (supressão dinâmica)
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer (genérico)
$[F^*]$	Concentração de fluoróforos em estado ativado na presença de supressor
$[F^{*}]_{0}$	Concentração de fluoróforos em estado ativado na ausência de supressor
f(t)	Função de ativação
γ	Taxa de decaimento do fluoróforo na ausência de supressor
Ζ	Frequência de colisão
R	Raio de colisão
R_f	Raio molecular do fluoróforo
R_q	Raio molecular do supressor
D	Soma dos coeficientes de difusão do fluoróforo e do supressor
D_f	Soma dos coeficientes de difusão do fluoróforo
D_q	Soma dos coeficientes de difusão do supressor
N	Número de Avogadro
f_q	Eficiência da supressão
K_S	Constante de Stern-Volmer (supressão estática)
[F-Q]	Concentração do complexo
[F]	Concentração do fluoróforo
V	Volume da esfera
K_{app}	Constante aparente de supressão combinada

$ \begin{array}{ll} K_i(\lambda) & \mbox{Constante de supressão do i-ésimo fluoróforo para o comprimento }\lambda \\ F_C & \mbox{Intensidade de fluorescência corrigida} \\ F_B & \mbox{Intensidade de fluorescência gerada pelo supressor} \\ \Lambda & \mbox{Conjunto de comprimentos de onda em um experimento} \\ \lambda_Q & \mbox{Comprimento de onda com maior intensidade de fluorescência para uma concentração de supressor [Q] \\ F_Q(\lambda) & \mbox{Intensidade de fluorescência no comprimento de onda }\lambda e concentração [Q] \\ I_Q(\lambda) & \mbox{Intervalo de comprimentos de onda para uma concentração de supressor igual a [Q] \\ F_{máxQ} & \mbox{Intensidade de fluorescência máxima para uma concentração de supressor [Q] \\ \delta & \mbox{Comprimento fixo dos intervalos de comprimentos de onda \\ R^2 & \mbox{Coeficiente de determinação ou de correlação } \end{array} $	λ	Comprimento de onda
F_C Intensidade de fluorescência corrigida F_B Intensidade de fluorescência gerada pelo supressor Λ Conjunto de comprimentos de onda em um experimento λ_Q Comprimento de onda com maior intensidade de fluorescência para uma concentração de supressor [Q] $F_Q(\lambda)$ Intensidade de fluorescência no comprimento de onda λ e concentração [Q] $I_Q(\lambda)$ Intervalo de comprimentos de onda para uma concentração de supressor igual a [Q] $F_{máxQ}$ Intensidade de fluorescência máxima para uma concentração de supressor [Q] δ Comprimento fixo dos intervalos de comprimentos de onda R^2 Coeficiente de determinação ou de correlação	$K_i(\lambda)$	Constante de supressão do i-ésimo fluoróforo para o comprimento λ
F_B Intensidade de fluorescência gerada pelo supressor Λ Conjunto de comprimentos de onda em um experimento λ_Q Comprimento de onda com maior intensidade de fluorescência para uma concentração de supressor [Q] $F_Q(\lambda)$ Intensidade de fluorescência no comprimento de onda λ e concentração [Q] $I_Q(\lambda)$ Intervalo de comprimentos de onda para uma concentração de supressor igual a [Q] $F_{máxQ}$ Intensidade de fluorescência máxima para uma concentração de supressor [Q] δ Comprimento fixo dos intervalos de comprimentos de onda R^2 Coeficiente de determinação ou de correlação	F_C	Intensidade de fluorescência corrigida
$ \begin{array}{lll} \Lambda & & \mbox{Conjunto de comprimentos de onda em um experimento} \\ \lambda_Q & & \mbox{Comprimento de onda com maior intensidade de fluorescência para uma concentração de supressor [Q] \\ F_Q(\lambda) & & \mbox{Intensidade de fluorescência no comprimento de onda λ e concentração [Q] \\ I_Q(\lambda) & & \mbox{Intervalo de comprimentos de onda para uma concentração de supressor igual a [Q] \\ F_{máxQ} & & \mbox{Intensidade de fluorescência máxima para uma concentração de supressor [Q] \\ \delta & & \mbox{Comprimento fixo dos intervalos de comprimentos de onda \\ R^2 & & \mbox{Coeficiente de determinação ou de correlação } \end{array} $	F_B	Intensidade de fluorescência gerada pelo supressor
$\begin{array}{lll} \lambda_Q & & \mbox{Comprimento de onda com maior intensidade de fluorescência para uma concentração de supressor [Q] \\ F_Q(\lambda) & & \mbox{Intensidade de fluorescência no comprimento de onda λ e concentração [Q] \\ I_Q(\lambda) & & \mbox{Intervalo de comprimentos de onda para uma concentração de supressor igual a [Q] \\ F_{máxQ} & & \mbox{Intensidade de fluorescência máxima para uma concentração de supressor [Q] \\ \delta & & \mbox{Comprimento fixo dos intervalos de comprimentos de onda R^2 & \mbox{Coeficiente de determinação ou de correlação } \end{array}$	Λ	Conjunto de comprimentos de onda em um experimento
$\begin{array}{lll} & \mbox{concentração de supressor [Q]} \\ F_Q(\lambda) & \mbox{Intensidade de fluorescência no comprimento de onda λ e concentração [Q]} \\ I_Q(\lambda) & \mbox{Intervalo de comprimentos de onda para uma concentração de supressor} \\ & \mbox{igual a [Q]} \\ F_{máxQ} & \mbox{Intensidade de fluorescência máxima para uma concentração de supressor} \\ & \mbox{[Q]} \\ \delta & \mbox{Comprimento fixo dos intervalos de comprimentos de onda R^2} \end{array}$	λ_Q	Comprimento de onda com maior intensidade de fluorescência para uma
$ \begin{array}{ll} F_Q(\lambda) & \mbox{Intensidade de fluorescência no comprimento de onda λ e concentração [Q] } \\ I_Q(\lambda) & \mbox{Intervalo de comprimentos de onda para uma concentração de supressor} \\ & \mbox{igual a [Q]} \\ F_{m\acute{a}xQ} & \mbox{Intensidade de fluorescência máxima para uma concentração de supressor} \\ & \mbox{[Q]} \\ \delta & \mbox{Comprimento fixo dos intervalos de comprimentos de onda R^2 & \mbox{Coeficiente de determinação ou de correlação} \\ \end{array} $		concentração de supressor $[Q]$
$I_Q(\lambda)$ Intervalo de comprimentos de onda para uma concentração de supressor igual a [Q] $F_{m \acute{a} x Q}$ Intensidade de fluorescência máxima para uma concentração de supressor [Q] δ Comprimento fixo dos intervalos de comprimentos de onda R^2 Coeficiente de determinação ou de correlação	$F_Q(\lambda)$	Intensidade de fluorescência no comprimento de onda λ e concentração [Q]
$ \begin{array}{ll} \mbox{igual a } [Q] \\ F_{m \acute{a} x Q} & \mbox{Intensidade de fluorescência máxima para uma concentração de supressor} \\ [Q] \\ \delta & \mbox{Comprimento fixo dos intervalos de comprimentos de onda} \\ R^2 & \mbox{Coeficiente de determinação ou de correlação} \end{array} $	$I_Q(\lambda)$	Intervalo de comprimentos de onda para uma concentração de supressor
$F_{máxQ}$ Intensidade de fluorescência máxima para uma concentração de supressor $[Q]$ δ δ Comprimento fixo dos intervalos de comprimentos de onda R^2 Coeficiente de determinação ou de correlação		igual a [Q]
	$F_{m\acute{a}xQ}$	Intensidade de fluorescência máxima para uma concentração de supressor
$ \delta \qquad \text{Comprimento fixo dos intervalos de comprimentos de onda} \\ R^2 \qquad \text{Coeficiente de determinação ou de correlação} $		[Q]
R^2 Coeficiente de determinação ou de correlação	δ	Comprimento fixo dos intervalos de comprimentos de onda
	R^2	Coeficiente de determinação ou de correlação

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	A PESQUISA	13
2	FLUORESCÊNCIA E SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA	14
3	TIPOS DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA E O MODELO	
	DE STERN-VOLMER	17
3.1	Teoria da supressão dinâmica ou de colisão	17
3.2	Teoria de supressão estática	20
3.2.1	Variantes da equação de Stern-Volmer: supressão esfera de ação	22
3.3	Supressão dinâmica e estática combinadas	23
3.4	Algumas propriedades da supressão de fluorescência	25
3.4.1	Efeitos de blindagem, carga e tampão no processo de supressão	25
3.4.2	Acessibilidade fracionada	27
4	SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA EM PROTEÍNAS	31
4.1	Supressão e espectro emitido	34
5	O MODELO COMPUTACIONAL	36
5.1	Seleção de ferramentas e constituição geral	36
5.2	Utilização do <i>software</i>	38
5.3	Funcionamento do modelo computacional e suas etapas	39
5.3.1	Verificação dos dados fornecidos e construção da tabela de dados corrigidos	40
5.3.2	Determinando comprimentos de onda com maior intensidade de fluorescência	43
5.3.3	Determinação da intensidade de fluorescência máxima e sua normalização	43
5.3.4	Aplicação do modelo de supressão:gráfico e constante de Stern-Volmer	44
	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	49
	APÊNDICE – Algoritmos	53

INTRODUÇÃO

A motivação deste estudo que vem sendo realizado sobre o modelo de Stern-Volmer através de um aspecto matemático-computacional, origina-se da ausência de um aplicativo dedicado que permita tratar os dados obtidos dos equipamentos de fluorimetria, assim como auxiliar na catalogação dos mesmos, especificamente, nos obtidos em espectroscópios de fluorescência. Uma vez que os procedimentos originais de construção dos gráficos do modelo em estudo, o cálculo das constantes, a aplicação das equações para a determinação do número de sítios de ligação, entre outros processos, são consideravelmente laboriosos quando realizados manualmente, torna-se relevante o desenvolvimento de um *software* específico para realizar essas tarefas.

Dentre os trabalhos do físico alemão Otto Stern (1888 - 1969), Prêmio Nobel em física em 1943, e do químico alemão Max Volmer (1885 - 1965) destacam-se aqueles produzidos colaborativamente entre eles, explorando a cinética relacionada a processos de desativação fotofísicos intramoleculares. Tais processos podem ser identificados como qualquer fenômeno no qual uma molécula sofre uma aceleração da taxa de decaimento do estado excitado de seus elementos. Como exemplos destes processos, também denominados como quenching, pode-se citar a fosforescência e a fluorescência; este último, alvo do modelo explorado nesta dissertação (TOENNIES et al., 2011; LAKOWICZ, 2006).

Inicialmente é apresentada uma visão geral acerca do fenômeno de fluorescência, mais especificamente do processo de supressão de fluorescência, definido como qualquer processo físico-químico-biológico que provoca a diminuição da intensidade da fluorescência de uma amostra. São conhecidas diversas origens para a ocorrência desta supressão, sendo as mais relevantes, (a) as reações no estado excitado, (b) os rearranjos moleculares, (c) a transferência de energia, (d) a formação de complexos (ou supressão estática), e (e) a supressão por colisão (ou supressão dinâmica). Tal fenômeno fluorimétrico é utilizado como fonte de informações para a análise de sistemas biomoleculares (SILVA, 2003; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a; SILVA et al., 2004b; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004c; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010; FRAGOSO et al., 2012).

Essas análises realizadas são descritas em sua sequência de processos, permitindose compor o modelo em estudo para finalmente propor-se um ambiente computacional adequado para o tratamento matemático e estatístico dos dados experimentais obtidos, possibilitando realizar as tarefas condizentes ao modelo fluorimétrico proposto por Otto Stern e Max Volmer, como por exemplo, a construção dos gráficos e a determinação das constantes relacionadas a esse modelo (LAKOWICZ, 2006; SILVA, 2003; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a; SILVA et al., 2004b; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004c; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010).

Esse ambiente computacional proposto, alimentado com os dados provenientes dos

equipamentos, deve ser capaz de construir os gráficos referentes ao modelo de supressão de Stern-Volmer, bem como determinar a constante de Stern-Volmer, possibilitando então a análise da interação da proteína com elementos supressores específicos. Assim, é possível realizar uma análise *in vitro* da interação de diferentes substâncias supressoras, também chamadas de ligantes, com diversas proteínas transportadoras (como por exemplo a albumina sérica), componentes dos organismos vivos, sendo assim uma importante ferramenta para dinamizar as pesquisas em setores bio-farmacêuticos.

Tendo em vista o supracitado, este trabalho tem como objetivo e foco, viabilizar a automatização da aplicação do modelo de Stern-Volmer, explicitado pela equação que o descreve, bem como a geração dos gráficos e determinação da constante relacionados a esse modelo, através de um ambiente computacional, proprietário ou não.

No que tange a organização estrutural desta escrita, o Capítulo 1 apresenta os procedimentos utilizados para a realização da pesquisa nos aspectos teóricos e práticos. O Capítulo 2 descreve os fenômenos luminescentes de fluorescência e fosforescência, com foco no primeiro, e aborda o processo de supressão de fluorescência quando da interação de diferentes substâncias. Em seguida, o Capítulo 3 trata dos principais tipos de processos de supressão e da descrição do modelo teórico e matemático, proposto por Stern-Volmer, para cada um desses tipos de supressão. O Capítulo 4 expõem o caso de análise do processo de decaimento de fluorescência para as interações com proteínas, em especial com as albuminas séricas bovina e humana, citando alguns exemplos de interações com diversas substâncias. Finalmente, o Capítulo 5 apresenta a proposta, a implementação e os resultados do modelo matemático computacional proposto, incluindo a descrição dos motivos pela escolhas das ferramentas utilizadas para o desenvolvimento, o modo de uso da aplicação, o modo de funcionamento algorítmico da aplicação e os resultados apresentados pela mesma.

1 A PESQUISA

Neste trabalho foi realizada uma pesquisa documental, baseando-se na literatura específica no estudo do tema, no período de 1976 até os dias de hoje. Foram utilizadas também literaturas auxiliares que contextualizam tal estudo, como por exemplo, a utilização da supressão de fluorescência na análise da interação de substâncias diversas e a utilização de processos estatísticos para análise de dados e obtenção de resultados.

No que diz respeito ao procedimento laboratorial e matemático-estatístico original da pesquisa, utilizando o método fluorimétrico pautado no modelo de Stern-Volmer, construiu-se um arcabouço metodológico sequencial baseado no protocolo e no acompanhamento das rotinas utilizadas pelas equipes de farmacologia nos laboratórios da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Após a apresentação teórica inicial são apresentados aspectos específicos relacionados ao processo de supressão fluorimétrica, fenômeno descrito com maiores detalhes mais adiante e que proporcionará campo de dados para a pesquisa em ação.

Finalmente a equação e o modelo de Stern-Volmer ganham contornos através da implementação de uma ferramenta computacional original e inédita, que automatiza a obtenção dos gráficos, equações e constantes relacionados ao fenômeno de supressão descrito conforme esse modelo. Essa aplicação computacional foi desenvolvida utilizando a linguagem Java 8 trabalhada em uma IDE; baseando-se em um modelo matemático-estatístico correspondente ao da pesquisa original. Tal ferramental tem por objetivo auxiliar os pesquisadores dos setores bio-farmacêuticos, assim como os de áreas relacionadas, que lidam com os processos de supressão de fluorescência e com o modelo citado, no sentido de dinamizar e otimizar os processos inerentes as pesquisas que se utilizam desse modelo fluorimétrico.

2 FLUORESCÊNCIA E SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA

A fluorescência é um fenômeno de luminescência, ou seja, é caracterizado pela emissão de luz, por parte de uma substância, advinda de transição de estados eletrônicos excitados para outro estado de menor energia. Diferencia-se da fosforescência, outro fenômeno luminescente, pois essa ocorre a partir de um estado excitado tripleto enquanto a primeira ocorre a partir de um estado excitado singleto. Este estado caracteriza-se pela manutenção do *spin* do elétron promovido durante a excitação da substância, enquanto no nível de excitação tripleto ocorre uma inversão no sentido do *spin* do elétron promovido, conforme pode ser visualizado na Figura 1 (LAKOWICZ, 2006; SOUZA et al., 2000).

De uma forma geral, conforme Lakowicz (2006) esses fenômenos de luminescência podem ser descritos através do diagrama de Jablonski (Figura 2). Observa-se, simplificadamente, que uma substância, ao absorver um conjunto de fótons de energia apropriada, pode ter parte de suas moléculas passando do estado fundamental (S_0) para um excitado, singleto (S_1, S_2) ou tripleto (T_1) , e que no instante que tais moléculas retornarem ao estado original ocorrerá a emissão de radiações fluorescentes e fosforescentes, respectivamente.

No presente trabalho é abordado exclusivamente o fenômeno da fluorescência e

Figura 1 – Diagrama esquemático do arranjo de *spins* para os diferentes estados de excitação



Legenda: Estado fundamental a esquerda, estado excitado singleto (sem alteração de *spin*) ao centro e estado excitado tripleto a direita (com alteração de *spin*).

Fonte: Souza, 2008.



Figura 2 – Diagrama de Jablonski



Fonte: Lakowicz, 2006.

como suas características com alta sensibilidade de observação podem ser estudadas em análises de processos e pesquisas na área da biomatemática. Esse fenômeno, quando se trata de compostos orgânicos, ocorre tipicamente em estruturas aromáticas (LAKOWICZ, 2006; KATZUNG; TREVOR, 2017; KRAGH-HANSEN, 1981; SOUZA et al., 2000).

Os dados produzidos a partir dos estudos desse fenômeno resultam de testes espectroscópicos de fluorescência, utilizando equipamentos próprios para esse fim. A fluorimetria é a ciência responsável por esse estudo e uma de suas técnicas apoia-se especificamente no fenômeno da supressão de fluorescência, no qual busca-se analisar algum comportamento sistemático baseando-se na variação de fluorescência emitida de uma amostra (CORTEZ et al., 2012; SILVA, 2003; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a; SILVA et al., 2004b; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004c; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010; FRA-GOSO et al., 2016; FRAGOSO et al., 2012).

Conforme descrito, a supressão de fluorescência é uma técnica de espectroscopia muito utilizada em pesquisas que trabalhem com dados fluorimétricos (FRAGOSO et al., 2012; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010; CORTEZ et al., 2012). Essa técnica baseiase na identificação de perfis de decaimento de fluorescência de uma amostra conforme ela interage com outra substância, denominada genericamente supressor, utilizando-se de substância naturais da amostra como sonda desse fenômeno. O processo de supressão da fluorescência de uma amostra pode ocorrer por diversos motivos, podendo ser canonicamente divididos em supressão dinâmica e supressão estática. Em ambos os casos é necessário que estejam em contato algum elemento fluorescente da amostra, denominado genericamente como fluoróforo, e um elemento que promova a diminuição da intensidade dessa radiação fluorescente, denominado supressor (LAKOWICZ, 2006; KATZUNG; TREVOR, 2017; KRAGH-HANSEN, 1981).

No caso da supressão dinâmica há colisão dos fluoróforos com o supressor durante a permanência do estado de excitação, e após a dissociação dos dois elementos, os fluoróforos retornam ao seu estado fundamental, contudo sem emitir fótons, diminuindo assim a intensidade de fluorescência emitida pela amostra. Por outro lado, no caso da supressão estática forma-se um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor, promovendo da mesma forma a redução da radiação emitida (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010).

3 TIPOS DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA E O MODELO DE STERN-VOLMER

3.1 Teoria da supressão dinâmica ou de colisão

No processo de supressão dinâmica de fluorescência o elemento supressor colide com os fluoróforos em estado excitado, que ao retornar ao estado fundamental, após a excitação, apresenta uma diminuição da intensidade de radiação fluorescente total emitida (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981).

Analisando o modelo de Stern-Volmer especificamente, lidando com as análises de propriedades de absorção e emissão de radiação fluorescente por entes específicos, bem como com a determinação dos perfis de decaimento da fluorescência em função do tempo, ao tratar de sistema de supressão dinâmica tem-se um comportamento conforme a seguinte equação:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0[Q] = 1 + K_D[Q] \tag{1}$$

Onde F_0 e F são a intensidade da fluorescência na ausência ou presença do supressor, respectivamente; k_q é a constante de supressão bimolecular; τ_0 é o tempo de duração do fluoróforo na ausência do supressor e Q é a concentração do supressor. Também pode-se lidar diretamente com a constante de supressão de Stern-Volmer, genericamente denotada por $K_{SV} = k_q \tau_0$, quando não é conclusivo o tipo de supressão que ocorreu, e neste caso particular da supressão dinâmica denotado por $K_D = k_q \tau_0$. Além dessas notações é possível utilizar as notações K_S (seção 3.2) e K_{app} (seção 3.3), respectivamente, para o caso de supressão estática e o caso de supressão estática e dinâmica combinadas (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981).

Usualmente representam-se os dados da supressão através de um gráfico da variação da intensidade de fluorescência (F_0/F) pela concentração do supressor ([Q]). Observando a equação 1, esse gráfico representa uma reta, que intercepta 1 no eixo das ordenadas e tem como coeficiente angular a constate de supressão característica K_D (Figura 3).

De uma forma geral, esta representação como uma reta está ligada ao fato de existir uma única classe de fluoróforos na amostra, com a mesma acessibilidade do supressor, descrevendo então um gráfico linear (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981). Caso haja mais de uma classe de fluoróforos, sendo algumas delas não acessíveis ao supressor, nota-se um desvio em direção ao eixo das abscissas, como é melhor explorado na subseção 3.4.2.

Ainda observando a Figura 3, nota-se que em temperaturas elevadas ocorre um



Figura 3 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão dinâmica

Legenda: Gráfico da concentração de supressor [Q] pela razão de variação de fluorescência F_0/F . Observe que o aumento da temperatura provoca uma intensificação do processo de supressão dinâmica, representado pelo aumento do valor K_D .

Fonte: Lakowicz, 2006.

aumento do coeficiente angular dessa reta, ou seja, um aumento do valor da constante K_D . Logo, interpretando o modelo, essa elevação de temperatura provoca uma intensificação do processo de supressão de fluorescência dinâmica, efeito que pode ser justificada devido a mais rápida difusão do supressor (decorrente no aumento de volume da molécula, graças ao acrescento de temperatura) e consequente aumento das taxas de colisão (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981).

Apesar da supressão estática também poder ser representada por uma reta, como é apresentado na seção 3.2, uma boa forma de diferenciá-la da dinâmica, segundo Lakowicz (2006), é através da sua dependência com a temperatura e viscosidade. Quanto mais alta é a temperatura e/ou menor a viscosidade, mais rapidamente ocorre a difusão do supressor pela estrutura molecular, provocando o aumento da taxa de supressão por colisão; e mais facilmente são dissociados os complexos fracamente ligados, provocando a diminuição da taxa de supressão estática (observe comparativamente as Figuras 3 e 4).

Em outra análise, nota-se que a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração de fluoróforos em estado ativado, $[F^*]$, e como sobre uma iluminação contínua a população de fluoróforos torna-se constante, pode-se dizer que $d[F^*]/dt = 0$ (LA-KOWICZ, 2006). Logo, tem-se para a ausência e presença de elemento supressor as seguintes equações, respectivamente:

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - \gamma[F^*]_0 = 0 \tag{2}$$

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - (\gamma + k_q[Q])[F^*] = 0$$
(3)

Onde f(t) é a função de ativação e γ a taxa de decaimento do fluoróforo na ausência de supressor. Resolvendo as equações adequadamente e dividindo-as tem-se:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\gamma + k_q[Q]}{\gamma} = 1 + k_q \tau_0[Q] \tag{4}$$

Retornando assim a equação de Stern-Volmer.

E a partir do momento que a supressão dinâmica é uma taxa do processo de difusão das ativações, os tempos de duração na ausência (τ_0) e na presença (τ) do supressor são:

$$\tau_0 = \gamma^{-1} \tag{5}$$

$$\tau = (\gamma + k_q[Q])^{-1} \tag{6}$$

Daí,

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0[Q] \tag{7}$$

Com isso, pode-se notar uma importante relação inerente ao processo de supressão dinâmica: uma taxa de decrescimento equivalente entre a intensidade da fluorescência e a duração das ativações (que ocorre devido ao aumento da taxa de despovoação das ativações por consequência da supressão dinâmica). Assim tem-se:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} \tag{8}$$

Enquanto isso, este processo de diminuição da duração não ocorre na supressão

estática, pois apenas as moléculas fluorescentes são observadas. Como os fluoróforos não formam complexos, apresentam duração inalterada τ_0 (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981).

Analisando a constante de supressão bimolecular (k_q) , pode-se interpretá-la em termos da frequência de colisão Z entre as moléculas dispersadas no processo de supressão (LAKOWICZ, 2006). Tal frequência de colisão é dada por:

$$Z = k_0[Q] \tag{9}$$

Onde k_0 é a constante da taxa de difusão controlada bimolecular, que descreve o fluxo de difusão de uma molécula de coeficiente D através da superfície de uma esfera de raio R e pode ser obtida pela equação:

$$k_0 = \frac{4\pi RDN}{1000} = \frac{4\pi N}{1000} (R_f + R_q) (D_f + D_q)$$
(10)

Onde R é o raio de colisão (em geral dado pela soma dos raios moleculares do fluoróforo e do supressor, R_f e R_q , respectivamente); D é a soma dos coeficientes de difusão do fluoróforo e do supressor, D_f e D_q , respectivamente; e N é o número de Avogadro.

Dessa forma é possível relaciona-lo a constante k_q com o valor de k_0 através da eficiência da supressão (f_Q) , ou seja:

$$k_q = f_Q k_0 \tag{11}$$

Vale ressaltar que as relações biomatemáticas descritas nesta sessão são bases fundamentais para escrita, relacionando as análises dessa pesquisa e de demais na esfera de abordagem de supressão de fluorescência.

3.2 Teoria de supressão estática

Além da supressão que ocorre pela colisão entre os fluoróforos e o supressor, conforme exposto, pode ocorrer também a denominada supressão estática, resultado da formação de complexos não fluorescentes na interação dos fluoróforos com o supressor, resultando igualmente no decaimento da fluorescência do composto (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981).

Para o caso da supressão estática, a relação entre a intensidade da fluorescência e

a concentração de supressor se estabelece pela constante de associação graças à formação dos complexos e, conforme o modelo em estudo (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981), é dada por:

$$K_S = \frac{[F-Q]}{[F][Q]} \tag{12}$$

Onde [F - Q] é a concentração do complexo, [F] é a concentração do fluoróforo, e [Q] é a concentração do supressor. Naturalmente, tem-se que a concentração de fluoróforo é dada por:

$$[F]_0 = [F] + [F - Q] \tag{13}$$

Logo,

$$K_S = \frac{[F]_0 - [F]]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]}$$
(14)

Arrumando a equação 14 e substituindo as concentrações pelas intensidades de fluorescência tem-se:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q] \tag{15}$$

Pode-se perceber que em ambos os casos, o da supressão dinâmica e o da supressão estática, a relação entre F_0/F e a concentração de supressor ([Q]) é linear, podendo ser interpretadas utilizando a mesma equação de Stern-Volmer (equação 15). Com isso, a simples análise da intensidade não é suficiente para determinar qual foi a supressão ocorrida. Além da diferenciação citada no item anterior, relacionada às variações do gráfico de Stern-Volmer de acordo com a variação de temperatura e viscosidade, usam-se em definitivo as medidas de duração de fluorescência para conseguir distinguir qual é o tipo de supressão ocorrida (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981). Isso é possível devido ao fato da supressão estática remover fluoróforos da observação, graças à formação de complexos não fluorescentes, e assim a duração é $\tau = \tau_0$. Ou seja, na supressão estática temos que $\tau_0/\tau = 1$, enquanto na supressão dinâmica tem-se $F_0/F = \tau_0/\tau$.

Outro possível método de distinção do tipo de supressão é um exame detalhado do espectro de absorção dos fluoróforos, pois a formação de complexos provocada pela supressão estática modifica o espectro de absorção dos fluoróforos (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981).



Figura 4 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão estática

Legenda: Gráfico da concentração de supressor [Q] pela razão de variação de fluorescência F_0/F . Observe que o aumento da temperatura provoca uma diminuição do processo de supressão estática, representado pela diminuição do valor K_D . Fonte: Lakowicz, 2006.

3.2.1 Variantes da equação de Stern-Volmer: supressão esfera de ação

A supressão identificada como esfera de ação é um tipo de aparente supressão estática cuja probabilidade de efetivação da supressão é alta. Nesse caso específico, ocorre uma fraca associação entre os fluoróforos e a substância supressora, devido a sua proximidade, mas não sendo suficiente para a formação de complexos. Apesar disso, eles aparecem como um conjunto escuro, ou seja, que suprime a fluorescência, mesmo não compondo uma supressão estática propriamente dita. Existe uma eminência de efetivar a supressão estática (LAKOWICZ, 2006).

A partir do momento em que os fluoróforos apresentarem-se em estado excitado, existindo a substância supressora em uma vizinhança (esfera de volume V), a supressão da fluorescência ocorrerá pela formação do complexo, ou seja, supressão estática (LA-KOWICZ, 2006). Graficamente este caso particular, de aparente supressão, pode ser percebido por um desvio positivo (formação de região ascendente – côncava), como por exemplo, a supressão da NATA pela acrilamida (Figura 5).



Figura 5 – Exemplo de supressão esfera de ação



Para descrever essa situação a equação de Stern-Volmer apresenta-se então como:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[Q]) + e^{\frac{[Q]VN}{1000}}$$
(16)

Onde V é o volume da esfera e N é o número de Avogrado.

3.3 Supressão dinâmica e estática combinadas

De uma forma geral, ambos os tipos de supressão ocorrem simultaneamente durante a interação entre supressores (como por exemplo os pesticidas: metilparation e glifosato; e os fármacos: haloperidol e risperidona) e as amostras (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981). Graficamente isso resulta em uma curvatura crescente, côncava em relação ao eixo das ordenadas, conforme pode ser observado na Figura 6.

Nesse caso, de ocorrência de ambas as supressões, tem-se que a fração de fluorescência (F/F_0) é o produto da parcela que não formou complexo (f) e a parte que não sofreu supressão dinâmica, ou seja:

$$\frac{F}{F_0} = f\left(\frac{\gamma}{\gamma + k_q[Q]}\right) \tag{17}$$

Assim,

$$\frac{F}{F_0} = f^{-1}(1 + K_D[Q]) \tag{18}$$

Pela definição de f e pelo visto no item sobre supressão dinâmica, sabe-se que f^{-1} representará a parcela da amostra que formaram complexos, ou seja, $f^{-1} = 1 + K_S[Q]$. Logo:

$$\frac{F}{F_0} = (1 + K_D[Q])(1 + K_S[Q]) \tag{19}$$

Essa equação pode ser modificada, caso seja necessário, para permitir uma separação de $K_S \in K_D$. Opera-se a distributiva acima, daí:

$$\frac{F}{F_0} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S[Q]^2$$
(20)

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_{app}[Q] \tag{21}$$

Onde K_{app} é denominada constante aparente de supressão, calculada por:

$$K_{app} = \left(\frac{F}{F_0} - 1\right) \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S[Q]$$
(22)

Assim, pode-se observar na Figura 6 que o gráfico de K_{app} pela concentração de supressor ([Q]) é uma reta que intercepta o eixo das ordenadas em $(K_D + K_S)$ e tem coeficiente angular igual a $K_D K_S$, sendo os valores individuais obtidos pela solução da equação quadrática (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981).

Figura 6 – Supressão dinâmica e estática em um mesmo grupo de fluoróforos



Legenda: Gráfico da concentração de supressor [Q] pela razão de variação de fluorescência F_0/F a esquerda (conforme a Equação 20). Gráfico da concentração de supressor [Q] pela expressão $\left(\frac{F}{F_0} - 1\right) \frac{1}{[Q]}$ a direita (conforme as Equação 22).

Fonte: Lakowicz, 2006.

3.4 Algumas propriedades da supressão de fluorescência

3.4.1 Efeitos de blindagem, carga e tampão no processo de supressão

Considerando o fenômeno da supressão da fluorescência, é comum que o ambiente ao redor dos fluoróforos interfira no processo, aumentando ou diminuindo a velocidade ou a intensidade desse processo (LAKOWICZ, 2006).

A proteção contra a supressão, denominada blindagem, está frequentemente ligada as macromoléculas e ciclo-dextrinas¹, pois elas protegem o solvente, removendo o oxigênio e assim diminuindo a fluorescência observada (LAKOWICZ, 2006). Como exemplo, podese citar o caso de supressão de fluorescência do Di-hidroequilenina (DHE) pela acrilamida. Nesse caso, a presença da proteína de ligação de esteroides (SBP) provoca a diminuição do fenômento de supressão, devido a dissociação do DHE pela proteína (Figura 7) (LA-

 $^{^{1}}$ Substâncias provenientes da hidrólise do amido.



Figura 7 – Exemplo do fenômeno de blindagem

Legenda: Supressão de fluorescência do DHE pela acrilamida quando livre em solução (tracejado) e quando ligada a proteína de ligação de esteroides (SBP, com quadrados).

Fonte: Lakowicz, 2006.

KOWICZ, 2006).

Por outro lado, cargas elétricas aplicadas ao supressor provocam uma extensão considerável no processo de supressão, intensificando os seus efeitos, sendo conhecido então como efeito de carga. Pode-se citar o exemplo da supressão do 1-etilpireno (EP) pelo sulfonato dedimetilanilina (DMAS), ilustrado na Figura 8, onde nota-se a maior intensidade de supressão conforme a maior carga elétrica no ambiente de supressão (LAKOWICZ, 2006).

Os maiores efeitos da blindagem e da carga na supressão ocorrem nos fluoróforos da fronteira do ácido desoxirribonucleico (DNA), devido a sua estrutura em dupla-hélice e sua constituição por nucleotídeos (LAKOWICZ, 2006).

Da mesma forma, a alteração das cargas e forças iônicas atuantes nas soluções de tamponamento, provocam modificações nos tempos de fluorescência, nas velocidades e também influenciando nos comprimentos de onda máximos de emissão. Este ultimo, chamado de *shift* (LAKOWICZ, 2006).

 $15 \qquad DTAC$ $10 \qquad CH_3 \qquad DTAC$ $10 \qquad CH_3 \qquad DTAC$ $10 \qquad CH_3 \qquad DTAC$ $10 \qquad Brij 35$ SDS $0 \qquad 1 \qquad 2 \qquad 3 \qquad 4$ [DMAS], mM

Legenda: Supressão de fluorescência do 1-etilpireno (EP) pelo sulfonato de dimetilanilina (DMAS) positivamente carregado de cloreto de dodeciltrimetilamónio (DTAC); neutro de Brij 35; e negativamente carregado de dodecilsulfato de sódio (SDS).

Fonte: Lakowicz, 2006.

3.4.2 Acessibilidade fracionada

Geralmente as proteínas contêm muitos resíduos de triptofano², que emite fluorescência em comprimento de onda específico e pode, portanto, ser usado como uma sonda natural, proporcionando informações sobre alterações no micro ambiente e na acessibilidade do supressor, em diferentes regiões da amostra. Com isso, modifica-se o gráfico de Stern-Volmer, assim como ocorre deslocamento dos valores de comprimento de onda correspondentes à intensidade de emissão máxima no espectro de fluorescência (LAKOWICZ, 2006).

Nesse caso de acessibilidade fracionada, o gráfico de Stern-Volmer sofre um decaimento em direção ao eixo das abscissas, o que é característico da existência de duas populações de fluoróforos, conforme mencionado, sendo que um deles não é acessível à

Figura 8 – Exemplo do fenômeno de carga no processo de supressão

27

 $^{^2}$ Um tipo de aminoácido aromático.





Legenda: (a) – gráfico Stern-Volmer e (b) – espectro de fluorescência. Fonte: Lakowicz, 2006.

substância supressora (LAKOWICZ, 2006).

Quanto ao deslocamento da distribuição de energia de fluorescência, o espectro emitido pelos resíduos pode ser obtido pela diferença entre os valores registrados nas regiões não suprimidas e nas suprimidas.

Essa diferenciada acessibilidade aos resíduos de triptofano nas proteínas é comumente usada no processo de supressão para resolver questões de diferentes resíduos serem ou não acessível por determinada substância supressora (LAKOWICZ, 2006).

Imagine que existam duas populações de fluoróforos em uma amostra, um com acessibilidade a ao supressor e o outra é inacessível (acessibilidade b). Conforme Lakowicz (2006), sendo um caso de acessibilidade fracionada o gráfico de Stern-Volmer apresenta um decaimento em direção ao eixo das abscissas (Figura 9).

A intensidade de fluorescência total na ausência do supressor é dada por:

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b} \tag{23}$$

Na presença do supressor, devido ao processo de supressão dos fluoróforos acessíveis, decrescendo sua intensidade de fluorescência de acordo com a equação de Stern-Volmer,

tem-se que:

$$F = \frac{F_{0a}}{1 + K_a[Q]} + F_{0b} \tag{24}$$

Assim,

$$\Delta F = F_0 - F = F_{0a} \left(\frac{K_a[Q]}{1 + K_a[Q]} \right) \tag{25}$$

Invertendo essa última equação e dividindo pela equação da intensidade de fluorescência na ausência de supressor tem-se:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a[Q]} + \frac{1}{f_a} \tag{26}$$

Onde f_a é a fração inicial de fluorescência acessível ao supressor, ou seja:

$$f_a = \frac{F_{0a}}{F_{0a} + F_{0b}} \tag{27}$$

Com essa apresentação, pode-se determinar o valor de f_a e de K_a a partir de um gráfico de $F_0/\Delta F$ por 1/[Q], pois tem-se f_a^{-1} como a ordenada do ponto de intersecção com o respectivo eixo e o coeficiente angular é igual a $(f_a K_a)^{-1}$. Essa intersecção pode ser facilmente interpretada como sendo o ponto de concentração de supressor ([Q]) que ocorre a extrapolação da concentração de supressor, e sendo assim de fato notaria-se toda a parte acessível suprimida e a única parcela que ainda apresentaria fluorescência seria a dos resíduos de triptofano (LAKOWICZ, 2006).

Apesar de pequenas possibilidades, é possível que uma parcela dos resíduos inacessíveis se torne acessível ao supressor, modificando ligeiramente os gráficos de Stern-Volmer (LAKOWICZ, 2006). Observe os gráficos da Figura 10, onde a linha densa exibe os resultados para permanência de inacessibilidade dos resíduos de triptofano ($K_b = 0$) e as linhas pontilhadas exibem modificações dessa acessibilidade ($K_b = 0, 1K_a \in f_a = 1$).





Legenda: (a) – Gráfico simples de Stern-Volmer e (b) –
Gráfico modificado de Stern-Volmer.
Em ambos os casos apresenta-se a diferença de supressão exclusivamente na população acessível de fluoróforos (linha densa) e da supressão também de parcelas inicialmente "inacessíveis" (linhas tracejadas).
Fonte: Lakowicz, 2006.

30

4 SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA EM PROTEÍNAS

A albumina é a proteína mais abundante no soro plasmático. Com isso, se torna grande responsável pelo transporte de substâncias dentro do organismo. Ao lidar com o fenômeno de fluorescência em proteínas, destacam-se os estudos da albumina sérica humana (*Human Serium Albumin* - HSA) e da albumina sérica bovina (*Bovine Serium Albumin* - BSA) (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981; KATZUNG; TREVOR, 2017; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010; FRAGOSO et al., 2012; FRAGOSO et al., 2016).

Dentre os aminoácidos que formam essa cadeia proteica, apenas três possuem característica fluorescente: fenilalanina, tirosina e triptofano. Os dois primeiros não são utilizados nas análises pertinentes ao presente trabalho devido a serem encontrados em maiores quantidades na HSA e na BSA, além da grande interseção dos espectros de emissão de fluorescência desses aminoácidos, não contribuindo para os testes de supressão. Contudo, a BSA apresenta apenas dois resíduos de triptofano e a HSA, um resíduo desse aminoácido, e isso torna o uso do triptofano como sonda natural mais eficaz no estudo





Legenda: Localização do triptofano na posição 214, e para efeito demonstrativo, assinalamos a localização do triptofano 134 da BSA, já que ambas apresentam estruturas semelhantes.

Fonte: MOTTA, 2016.



Figura 12 – Gráficos de Stern-Volmer: supressão da Endo III pelo i
odeto

Legenda: (a) – Gráfico simples de Stern-Volmer e (b) – Gráfico modificado de Stern-Volmer.

Evidencia-se, devido a curvatura vista em (a), a presença dos diferentes tipos de triptofano (Trp-132 acessível e Trp-178 inacessível). E em (b) ilustra-se que a fração inacessível é $f_a = 0,47$.

Fonte: Lakowicz, 2006.

de supressão de fluorescência em albuminas (LAKOWICZ, 2006; KATZUNG; TREVOR, 2017; KRAGH-HANSEN, 1981).

Segundo Lakowicz (2006), a comparação entre as duas albuminas constitui a base para a interpretação das propriedades espectrais de emissão e absorção do triptofano, bem como a sua localização na estrutura proteica (Figura 11).

A partir dessas interpretações primárias são estabelecidos os estudos acerca de outros tipos de proteínas, como é visto a seguir.

Tomando como exemplo o processo de supressão da enzima de restrição Endonuclease III (Endo III), que apresenta dois tipos de resíduos de triptofano (Trp-132 acessível e Trp-178 inacessível), utilizando como supressor o iodeto. Pode-se notar através da Figura 12, que na extrapolação da concentração do supressor (1/[Q] = 0) o gráfico intercepta próximo a 2, indicando que apenas metade da emissão pode ser suprimida utilizandose esse supressor. Da mesma forma, isso indica que os resíduos de triptofano presentes da Endo III são igualmente fluorescentes e que apenas um deles, o Trp-132, pode ser suprimido neste caso (LAKOWICZ, 2006).

Outro exemplo de efeito da supressão de proteínas está ligado ao estado "conformacional" da proteína³, pois modifica a exposição dos resíduos de triptofano. O gráfico

 $^{^{3}}$ Incluindo associação de subunidades, ligação de substratos e desnaturação.



Figura 13 – Gráfico de Stern-Volmer da supressão da acrilamida

Legenda: Supressão da acrilamida pelo iodeto na ausência e presença do receptor de proteínas cAMP. Fonte: Lakowicz, 2006.

de Stern-Volmer da Figura 13 mostra a supressão da acrilamida pelo iodeto e seu comportamento na ausência e presença do receptor de proteínas adenosina-monofosfato cíclico (cAMP, uma proteína c-reativa – CRP). O CRP apresenta dois resíduos de Trp (LA-KOWICZ, 2006).

Na ausência do cAMP o gráfico exibe uma curvatura em direção ao eixo das abscissas, indicando que um dos resíduos de triptofano é inacessível. Por outro lado, na presença de cAMP, o quadro modifica-se, apresentando-se mais linear e até mesmo com uma ligeira curvatura em direção ao eixo das ordenadas. Ou seja, com o substrato cAMP ocorre uma exposição dos resíduos anteriormente inacessíveis ao supressor, intensificando assim o processo de supressão de fluorescência. Da mesma forma que o gráfico de Stern-Volmer se modifica, devido à presença ou ausência do substrato cAMP, o tempo de duração se modifica, conforme exibido no gráfico da Figura 14 (LAKOWICZ, 2006).

Vale destacar, que a situação de diminuição de exposição dos resíduos de triptofano e consecutivo enfraquecimento de supressão (ou seja, situação inversa da apresentada originalmente no caso do CRP), também são possíveis de ocorrer quando analisada outra combinação de proteínas e substratos, como é o caso entre lisozima e aglutinina de trigo,

Figura 14 – Gráficos da duração do decaimento de fluorescência do CRP na presença ou ausência do cAMP



Fonte: Lakowicz, 2006.

por exemplo (LAKOWICZ, 2006).

4.1 Supressão e espectro emitido

Quando é realizada a supressão de uma proteína, a emissão de espectro da amostra se modifica, pois existem variados tipos de resíduos de triptofano proporcionando assim diferentes acessibilidades à substância supressora. Por exemplo, se uma amostra contém dois fluoróforos com diferentes constantes de supressão, será visualizada uma diferente quantidade de supressão em cada comprimento de onda, dependendo da amplitude de onda do espectro produzida após a supressão (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981; KATZUNG; TREVOR, 2017).

Baseando-se na equação de Stern-Volmer e determinando também a relação dessa para cada comprimento de onda (λ) , pode-se descrever para mais de um fluoróforo a dependência com o comprimento de onda como:

$$\frac{F(\lambda)}{F_0(\lambda)} = \sum_i \frac{f_i(\lambda)}{1 + K_i(\lambda)[Q]}$$
(28)

Onde $f_i(\lambda)$ é a contribuição fracionária do i-ésimo fluoróforo a intensidade de emissão em relação a ausência do supressor no comprimento de onda λ , e $K_i(\lambda)$ é a constante de supressão do i-ésimo fluoróforo para o comprimento λ (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010).

Para uma análise de dados, é comum fixar-se um K_i global (independente do

comprimento de onda) e tendo como variáveis os $f_i(\lambda)$. Com essa proposta determina-se os K_i para cada fluoróforo e as frações de intensidade $f_i(\lambda)$ para cada comprimento de onda (conforme $\sum f_i(\lambda) = 1$). Nesse sentido, esses valores são utilizados para determinar o espectro emitido por cada componente (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981; KATZUNG; TREVOR, 2017; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a; SILVA et al., 2004b; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004c)

$$F_i(\lambda) = f_i(\lambda)F(\lambda) \tag{29}$$

Tal que $F(\lambda)$ é a emissão de espectro original da amostra.

Dessa forma, utilizando-se a análise do espectro emitido em um processo de supressão em conjunto com a equação de Stern-Volmer, pode-se realizar um estudo muito mais preciso acerca da acessibilidade fracionada dos fluoróforos de determinada amostra para cada tipo de supressor (LAKOWICZ, 2006; KATZUNG; TREVOR, 2017; KRAGH-HANSEN, 1981; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010).

5 O MODELO COMPUTACIONAL

5.1 Seleção de ferramentas e constituição geral

A construção do modelo computacional foi formulado a partir da observação de dados de mais de 150 planilhas resultantes de cerca de 50 experimentos realizados ao longo de 2 anos (formando uma massa de dados suficiente para comprovar a eficácia desse modelo computacional), baseando-se no método de tratamento dos dados experimentais próprio da pesquisa fluorimétrica (SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a; SILVA et al., 2004b; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a; CORTEZ et al., 2012), e pautando-se assim no modelo de Stern-Volmer para supressão dinâmica. Ou seja, a aplicação desenvolvida tem como objetivo ser capaz de construir os gráficos e determinar as constantes condizentes ao modelo em estudo.

Como ambiente matemático-computacional para desenvolvimento e depuração da aplicação foi selecionada a ferramenta Netbeans 8.2 juntamente com a linguagem Java 8, utilizando-se da interface gráfica JavaFX. Optou-se também por um sistema de controle de versão tipo Git com repositório remoto no GitLab. As opções de repositório local e remoto deve-se a facilidade de utilização dos mesmos para processos de controle de alterações no que se refere a otimização para o desenvolvimento do código integrado ao Netbeans. A proposta de utilização dessa linguagem foi realizada visando a explorar as características inerentes a orientação a objeto, no que diz respeito a modularização do código, a facilidade de codificação e a legibilidade do modelo proposto, bem como das rotinas executadas para análise matemático-estatística dos dados fluorimétricos de entrada.

Os procedimentos realizado em laboratório para o tratamento dos dados fluorimétricos é integralmente automatizado pelas rotinas presentes na aplicação, aplicando-se um modelo de gestão de dados, experimentos e análises, com classes próprias, e que permitem organizar os dados e resultados apresentados no programa. Ao usuário, é necessário apenas selecionar o arquivo próprio, proveniente dos próprios instrumentos de laboratório (fluorímetro), contendo as tabelas de resultados da experimentação para cada uma das cubetas ⁴ do equipamento, apresentando as intensidades de fluorescência F relacionadas a cada par de concentração de supressor [Q] e comprimento de onda de espectro (λ) .

Em um aspecto global, ilustrado pela Figura 15, a aplicação apoia-se fundamentalmente em três classes próprias para modelagem proposta, as classes experimento (Algoritmo A.2, Apêndice), cubeta (Algoritmo A.1, Apêndice) e análise (Algoritmos A.4,

⁴ Cada um dos receptáculos presentes no fluorímetro, onde são depositadas diferentes substâncias para realização das medições da intensidade de fluorescência durante o decorrer do experimento.



Figura 15 – Fluxograma geral de uso e operacionalidade do software

Legenda: Operações descritas pelos identificadores: A - Entrada das tabelas de dados; B - Construção das cubetas; C - Sincronização das cubetas carregadas ao gestor de cubetas; D - Sincronização das cubetas ao gestor de análises; E - Inter-relação com o gestor de análises para a realização de análises; F - Apresentação dos resultados; e G - Saída de resultados. Fonte: O autor, 2019.

A.6, A.8, A.9, A.10, A.12, A.13, A.14, A.16 – Apêndice – fazem parte dessa classe), e em duas classes *singleton* gestoras: gestor de cubetas e gestor de análises. As classes de experimento e cubeta representam essencialmente uma transcrição computacional do modelo de dados obtido dos fluorímetros. A primeira traduz o experimento realizado, apresentando as tabelas originais de dados fluorimétricos, a identificação da substância supressora, a temperatura e o conjunto de cubetas utilizadas no experimento (Algoritmo A.5, Apêndice). Enquanto isso, a segunda foca-se nos dados de intensidade de fluorescência de uma cubeta do instrumento, ou seja, relacionando a substância substrato, o supressor, a temperatura, os conjunto de comprimentos de onda, o conjunto de concentração de supressor utilizados e, principalmente, o mapa de valores de fluorescência conforme cada par concentração do supressor e comprimento de onda. A classe de análise contém os métodos matemáticos e estatísticos de tratamento do modelo, de acordo com a teoria de Stern-Volmer, que são executados sobre os dados de cada cubeta, consoante a certeza desejada.

No caso das classes gestoras, a responsável pelo controle das cubetas visa permitir o armazenamento volátil e a inter-relação entre dados de diferentes experimentos realizados entre os mesmos elementos (proteína e supressor) e a mesma temperatura, com objetivo de integrar tais dados, aumentando o conjunto de dados e permitindo maior substancialidade aos cálculos e a obtenção dos resultados. Enquanto isso, a classe gestora de análises é

Carregar arquivo de dados		
Carregar arquivo grupo de controle		
Supressor	Nome do supressor	
Certeza mínima desejada	0.995	
Temperatura	37.0 °C	
Executar análise	Cancelar	

Figura 16 – Formulário de introdução de dados



responsável por manter o *pool* de análises e resultados apresentados no instante atual e permitir que tais análises interajam com os dados presentes no gestor de cubetas.

5.2 Utilização do software

O software desenvolvido neste trabalho, provisoriamente chamado de "Análise de Supressão Fluorescência", com proposta de ser lançado como uma aplicação de domínio público, é inédito e capaz de, a partir da sua execução, apresentar tabelas e gráficos relacionados aos dados de fluorescência de entrada, de acordo com o modelo de Stern-Volmer. Além disso, é possível armazenar tais resultados em um arquivo próprio (formato .fdb – Fluorescence Database).

Analisando a utilização da interface por parte do usuário, ao iniciar o arquivo executável do programa, apresenta-se sua interface gráfica. Para realizar uma nova análise, deve-se carregar o arquivo dos dados experimentais relacionado e o arquivo de grupo de controle (caso exista) através da janela incorporada pelo menu arquivo (Figura 16). Além dos arquivos citados deve-se informar o supressor utilizado, a temperatura do experimento assim como a certeza desejada realização da análise. Outra opção ao usuário, é a abertura de um análise já realizada, salva anteriormente através da interface do programa em um formato próprio(.fdb). Em ambos os casos de análise, seja através de uma nova análise ou da abertura de uma anterior, os dados e resultados são inseridos adequadamente às classes gestoras de análises e de cubetas.

Ainda tratando-se da interface gráfica, após a execução de uma análise ou a abertura de uma previamente salva, o programa apresenta, na sua execução geral, na barra

Figura 17 – Visão geral da aplicação executando uma análise

o Ajuda																															
ration x Metil (37.0°C)																															
																						Es	pectro	de F	luorescé	ència					
λί	nm) [Q](µM)	0.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0	24.0	28.0	32.0	36.0	40.0		42,5														
	310,000	7,940	7,250	7,330	7,920	11,000	8,340	6,590	5,860	5,320	7,470	4,630	4,280	4,220	3,790										/		~				
	312,000	15,830	15,020	13,970	14,040	14,180	12,890	12,190	11,230	10,340	10,340	9,020	7,760	7,550	7,270									/	/		-				
	314,000	19,920	18,990	17,400	17,300	10,400	15,730	15,110	13,980	12,950	12,210	12,050	9,740	9,390	9,050		37,5						1	/		-	_				
	310,000	22,430	21,050	20,020	19,090	10,390	10,020	17,420	10,010	14,900	15,070	12,900	12,000	10,000	10,40							1	\sim	1					\sim		
	310,000	24,900	24,140	22,500	21,900	20,030	19,900	19,500	17,040	10,040	15,700	14,390	12,000	12,200	11,02		30,0					11	1		/		_				
	320,000	27,630	20,570	24,570	24,130	22,830	22,200	21,500	19,950	10,000	10,210	10,410	14,200	15,570	15,22		32.5					//								1	
	322,000	30,420	29,340	20,720	20,000	23,230	24,230	25,020	24,420	20,130	21,450	20,100	17,610	17,000	14,71						1	//	1		/		_				
	226,000	25,400	24 240	29,720	29,340	20,520	20,770	20,580	26,200	24,020	22,020	21,700	10,000	19,420	19.00		30,0				11	11		/	/	-	-				~
	228,000	27 200	25 720	22 110	22,060	20,770	20,050	20,640	27,400	25,910	24 240	22,710	20,020	10,240	10.00		27,5				11		/	/			-				>
	220,000	28,080	26,910	24 110	24.020	21,010	20,910	20,470	20,500	26,500	25 240	22,690	20,020	20,220	10,04								/	/		_					
	222,000	20,220	27.050	25 100	25 100	22,000	21,930	21.260	20,000	27,500	26,120	24,500	21,760	20,020	20.24		25,0					11		/					~		>
	334,000	40.240	38,850	36 300	35,020	33,840	32,830	32,400	30.250	28,520	26,880	25,410	22,520	21,650	21.13		u= 22.5					11	/	_			_	_			>
	336,000	41,050	39,490	36,890	36,490	34,490	33,520	32,950	30,890	29.150	27,420	25,990	23.050	22,200	21.69						//										~
	338,000	41,290	39,880	37 130	37,000	35 110	33,860	33,320	31 350	29.610	27 760	26 390	23 540	22 670	21.97		20,0			(////	11	/ /			/			-			
	340.000	41 110	40.010	37.420	37.060	35 110	33,960	33,520	31 370	29.600	27.660	26.420	23 570	22,810	22.24		17,5				///			/							-
	342,000	40.940	39,590	36,980	36.750	34 680	33.670	33,130	31,210	29,440	27,710	26.540	23 540	22,750	22.14									~	/				_		<u> </u>
	344,000	40,110	38,800	36 360	35.970	34 280	33 100	32,750	30,730	29,000	27,410	26,220	23 270	22 500	21.86		15.0			////		/	/								/
	346.000	38,960	37,780	35,180	35.020	33,440	32,300	31,980	29,950	28,400	26,720	25,590	22,890	22.080	21.42		12,5			///	//	/									
	348.000	37.510	36,340	34,130	33.840	32.240	31,250	30.850	29,140	27.410	25.950	24.850	22.000	21.590	20.81						//										
	350,000	36,210	35,200	33,020	32,490	31,120	30,320	29,790	28,210	26,530	25,290	24,050	21,640	20,920	20,30		10,0				/										
	352,000	34,720	33,880	31,690	31,380	29,850	29,330	28,820	27,250	25,770	24,380	23,340	20,960	20,180	19,55		7.5			//											
	354,000	33,430	32,470	30,580	30,400	28,960	28,310	27,820	26,490	24,950	23,640	22,570	20,220	19,710	19,06																
	356,000	32,500	31,480	29,740	29,430	27,980	27,450	26,780	25,430	24,130	23,010	22,150	19,720	19,250	18,47																
	358,000	31,350	30,400	28,760	28,420	27,100	26,520	26,120	24,730	23,410	22,420	21,270	19,240	18,730	18,10		2,5		/												
	360,000	30,180	29,080	27,690	27,350	26,210	25,450	25,270	23,750	22,520	21,520	20,670	18,590	18,270	17,69		305			315	320	325	330	,	335 λ (nm)	340	1	45	350	355	
																			6	0.0 uM	0.20 uM	040	M 0.60	uM d	Mu 08 C	0 10.0	MOI	20 JM O	16.0 uM		
< .															>				2	20.0 µM	ο 24.0 μN	0 28.0	aM O 32	0 μM (36.0 µM	0 40.0	uM O 4	8.0 µM () 8	56.0 µM		
		Tabela Ta	impão (Gri	upo de Co	ontrole)		Tabela	de Dador	Tratado	s	🔘 Tabi	ela de Res	ultados					~				-									
																		Esp	pectro de	Fluorescên	cia	() G	iráfico de	Supres	são de Flu	orescênc	ia	() G	Bráfico d	a Stern-Vol	mer
		Resultados	s																	Tabela o	de Resídu	os									
Equação da linha de tendência	1.0223448874	184524 + 1	0.0161250	04358418	3332 [Q]/	1 + 1.480	84096342	74426E-4	P	[Q] (µM)4	0.0	2.0	4.0	6.0	8.0	1	10.0 12.0	16.0	20.0	24.0	28.0	32.0	36.0	40.	0 48.0	56.	0				
Certeza Atingida	0,995									Residuo	0,0090	0,000	0,028	9 0,0058	8 0,0172	0,	,0073 0,0045	0,0257	0,0303	0,0274	0,0437	0,0578	0,0300	0,00	46 0,048	8 0,21	18				
Enumerica de Chana Malana	0.0010062456	125450	0.0210001		2425 101/																										
equação de Stern-Volme	0.5570002450	100409 41	0.0210003		un 101.	·																									

Legenda: Observa-se a barra lateral, a extrema esquerda, mostrando a(s) análise(s) executadas; a área de tabelas de dados, a esquerda; a área de e gráficos, a direita; e área de resultados (equação e constante de Stern-Volmer, principalmente) e resíduos na parte inferior.

lateral mais a esquerda todas as análises carregadas no gestor de análises, na parcela a esquerda da tela as tabelas de grupo de controle, de supressão de fluorescência (Dados Experimentais Corrigidos) e a Tabela de Dados Tratados e na parte a direita os gráficos de espectro de fluorescência, de supressão de fluorescência e de Stern-Volmer (Figura 17). Finalmente, na parte inferior são apresentadas a área de resultados (principalmente constando os resultados da equação e da constante de Stern-Volmer) e a tabela de resíduos(Algoritmos A.10 e A.16; Apêndice). O preenchimento dessas interfaces esta descrito nos itens da seção 5.3.

5.3 Funcionamento do modelo computacional e suas etapas

As rotinas executadas pela aplicação após o usuário iniciar uma análise atendem, para cada umas das cubetas utilizadas no experimento carregado, ou seja, para cada par de substrato e supressor, ao diagrama em blocos da Figura 18.

Fonte: O autor, 2019.



Figura 18 – Diagrama em blocos do algoritmo realizado pela aplicação

Fonte: O autor, 2019.

5.3.1 Verificação dos dados fornecidos e construção da tabela de dados corrigidos

Como primeiro processo, tem-se a verificação dos dados fornecidos, momento em que realiza-se a pesquisa quanto à presença de alguma desconformidade estrutural nos arquivos de dados carregados (Algoritmo A.3, Apêndice). Realiza-se então a construção automática da tabela de Dados Experimentais Corrigidos para cada uma das cubetas, preenchendo-a com as intensidades de fluorescência, corrigidas de acordo com o grupo de controle (caso exista), eliminando a fluorescência gerada pelo próprio supressor (efeito tampão ou *buffer effect*; algoritmo A.6, Apêndice); e conforme as referências de concentração de supressor [Q] e comprimento de onda λ (Figura 19). Ou seja, para cada par de concentração de supressor e comprimento de onda, tem-se:

$$F_C = F - F_B \tag{30}$$

Onde, F_C é a intensidade de fluorescência corrigida, F é a intensidade de fluorescência medida no fluorímetro e F_B a intensidade de fluorescência gerada pelo supressor (*buffer*).

Baseado na tabela de Dados Experimentais Corrigidos é construído o gráfico da Espectro de Fluorescência (Figura 20), que apresenta as curvas de nível para cada concentração de supressor ([Q]), relacionando comprimento de onda λ e intensidade de fluorescência F (Algoritmo A.7, Apêndice).

Figura	19 -	Extrato	da	aplicação	aprese	ntando	a	Tabela	de	Dados
		Experim	ient	ais Corrig	gidos					

v(mm) [C()(mm)	0.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0	24.0	28.0	32.0	36.0	40.
310,000	7,940	7,250	7,330	7,920	11,000	8,340	6,590	5,860	5,320	7,470	4,630	4,280	4,220	3,79
312,000	15,830	15,020	13,970	14,040	14,180	12,890	12,190	11,230	10,340	10,340	9,020	7,760	7,550	7,27
314,000	19,920	18,990	17,460	17,300	16,460	15,730	15,110	13,980	12,950	12,210	11,130	9,740	9,390	9,05
316,000	22,450	21,630	20,020	19,690	18,390	17,820	17,420	16,010	14,980	13,870	12,960	11,300	10,800	10,4
318,000	24,980	24,140	22,360	21,960	20,650	19,980	19,500	17,840	16,840	15,700	14,590	12,860	12,260	11,8
320,000	27,630	26,570	24,570	24,130	22,830	22,280	21,500	19,930	18,660	17,440	16,410	14,260	13,570	13,2
322,000	30,420	29,340	27,020	26,860	25,250	24,230	23,820	22,200	20,730	19,210	18,250	15,970	15,310	14,7
324,000	33,190	32,220	29,720	29,340	27,600	26,770	26,380	24,430	22,820	21,450	20,190	17,610	17,090	16,59
326,000	35,400	34,340	31,730	31,490	29,520	28,650	28,430	26,380	24,700	23,030	21,700	19,080	18,430	18,0
328,000	37,200	35,730	33,110	32,960	30,770	29,960	29,640	27,490	25,810	24,340	22,710	20,020	19,340	18,8
330,000	38,080	36,810	34,110	34,020	31,910	30,810	30,470	28,580	26,590	25,340	23,680	20,890	20,320	19,4
332,000	39,220	37,850	35,190	35,100	33,000	31,820	31,260	29,420	27,590	26,130	24,590	21,760	20,890	20,2
334,000	40,240	38,850	36,390	35,920	33,840	32,830	32,400	30,250	28,520	26,880	25,410	22,520	21,650	21,1
336,000	41,050	39,490	36,890	36,490	34,490	33,520	32,950	30,890	29,150	27,420	25,990	23,060	22,390	21,6
338,000	41,290	39,880	37,130	37,000	35,110	33,860	33,320	31,350	29,610	27,760	26,390	23,540	22,670	21,9
340,000	41,110	40,010	37,420	37,060	35,110	33,960	33,520	31,370	29,600	27,660	26,420	23,570	22,810	22,2
342,000	40,940	39,590	36,980	36,750	34,680	33,670	33,130	31,210	29,440	27,710	26,540	23,540	22,750	22,14
344,000	40,110	38,800	36,360	35,970	34,280	33,100	32,750	30,730	29,000	27,410	26,220	23,270	22,500	21,8
346,000	38,960	37,780	35,180	35,020	33,440	32,300	31,980	29,950	28,400	26,720	25,590	22,890	22,080	21,4
348,000	37,510	36,340	34,130	33,840	32,240	31,250	30,850	29,140	27,410	25,950	24,850	22,000	21,590	20,8
350,000	36,210	35,200	33,020	32,490	31,120	30,320	29,790	28,210	26,530	25,290	24,050	21,640	20,920	20,3
352,000	34,720	33,880	31,690	31,380	29,850	29,330	28,820	27,250	25,770	24,380	23,340	20,960	20,180	19,5
354,000	33,430	32,470	30,580	30,400	28,960	28,310	27,820	26,490	24,950	23,640	22,570	20,220	19,710	19,0
356,000	32,500	31,480	29,740	29,430	27,980	27,450	26,780	25,430	24,130	23,010	22,150	19,720	19,250	18,4
358,000	31,350	30,400	28,760	28,420	27,100	26,520	26,120	24,730	23,410	22,420	21,270	19,240	18,730	18,1
	30 180	29 080	27.690	27,350	26,210	25,450	25,270	23,750	22,520	21,520	20,670	18,590	18,270	17,6

Legenda: Tabela da aplicação que apresenta os valores de intensidade de fluorescência corrigidos (devido a fenômenos, como por exemplo, o efeito tampão) para cada par de concentração de supressor [Q] (colunas da tabela) e comprimento de onda λ (linhas da tabela).

Fonte: O autor, 2019.

Figura 20 – Extrato da aplicação apresentando o Gráfico de Espectro de Fluorescência



Legenda: Gráfico das curvas de nível para cada valor de concentração de supressor ([Q]), relacionando comprimento de onda e intensidade de fluorescência.

Fonte: O autor, 2019.

5.3.2 Determinando comprimentos de onda com maior intensidade de fluorescência

Em seguida, inicia-se o processo de determinação do comprimento de onda (λ_Q) que possui a maior intensidade de fluorescência para cada curva de nível de concentração de supressor ([Q]), realizado utilizando-se uma busca simples (Algoritmo A.9, Apêndice).

$$\lambda_Q = \left\{ \lambda \in \Lambda | F_Q(\lambda) \ge F_Q(\lambda_i); \forall \lambda_i \in \Lambda \right\}$$
(31)

Onde, Λ representa o conjunto de comprimentos de onda do experimento e $F_Q(\lambda)$ representa a intensidade de fluorescência no comprimento de onda λ sobre a curva [Q] de concentração de supressor.

5.3.3 Determinação da intensidade de fluorescência máxima e sua normalização

A partir daí, constroem-se intervalos de comprimento fixo (δ) e com interseção com o conjunto de comprimentos de onda do experimento, com centro em cada um dos valores de comprimentos de onda determinados anteriormente (Algoritmo A.8, Apêndice). Realiza-se então a média aritmética dos valores de intensidade de fluorescência em cada intervalo, correspondendo então a cada valor de concentração de supressor ([Q]), determinando assim a intensidade de fluorescência máxima média em cada valor de concentração de supressor ([Q]) ⁵. Esse processo pode ser descrito da seguinte forma:

$$Seja \ \lambda_Q = \lambda_i \implies I_Q = [\lambda_{i-\delta}, \lambda_{i+\delta}] \cap \Lambda \implies F_{maxQ} = \frac{\sum_{j=i-\delta}^{i+\delta} F_j}{\delta} \quad ; \quad \forall Q$$
(32)

Munido dos valores de intensidade de fluorescência máxima média é realizado um processo de normalização desses valores em função da intensidade de fluorescência na ausência de supressor (F_0) , ou seja, todos eles são recalculados da seguinte forma:

$$||F_{m\acute{a}xQ}|| = \frac{F_{m\acute{a}xQ}}{F_0}, \forall Q$$
(33)

Com esses dados obtidos, a aplicação preenche a planilha Dados Tratados (Figura 22) com os valores de concentração de supressor e intensidade de fluorescência máxima

 $^{^{5}}$ O procedimento é realizado desta maneira devido ao fenômeno de *shift* característico dessa análise



Figura 21 – Extrato da aplicação apresentando o Gráfico de Supressão de Fluorescência



normalizada ($[Q] \ge |F|$), construindo o Gráfico de Fluorescência (Figura 21) utilizando um modelo de dispersão e de linha de tendência por regressão linear desses dados (Algoritmo A.11, Apêndice).

5.3.4 Aplicação do modelo de supressão: gráfico e constante de Stern-Volmer

Finalmente é preenchida, também na planilha Dados Tratados (Figura 22), os valores de concentração de supressor ([Q]) e da razão da variação de fluorescência (F_0/F) e construído no Gráfico de Stern-Volmer com um modelo de dispersão de dados e a linha de tendência por regressão linear múltipla da relação desses valores conforme a planiha Dados Tratados (Algoritmo A.12, Apêndice). Se a reta originária dessa regressão linear

[Q](µM)	F	[Q](µM)	F _o / F
0,0000	1,0000	0,0000	1,0000
2,0000	0,9665	2,0000	1,0347
4,0000	0,9030	4,0000	1,1074
6,0000	0,8956	6,0000	1,1165
8,0000	0,8451	8,0000	1,1833
10,0000	0,8215	10,0000	1,2172
12,0000	0,8005	12,0000	1,2492
16,0000	0,7602	16,0000	1,3155
20,0000	0,7150	20,0000	1,3985
24,0000	0,6716	24,0000	1,4890
28,0000	0,6410	28,0000	1,5602
32,0000	0,5717	32,0000	1,7493
36,0000	0,5528	36,0000	1,8090
40,0000	0,5371	40,0000	1,8620
48,0000	0,4784	48,0000	2,0904
56,0000	0.4118	56,0000	2 4 2 8 6

Figura 22 – Extrato da aplicação apresentando os Dados Tratados

Fonte: O autor, 2019.

inicial satisfazer ao modelo de Stern-Volmer $(F_0/F = 1 + K_D[Q])$ e a certeza desejada⁶, conforme o coeficiente de determinação R^2 (Algoritmo A.13, Apêndice), tem-se que esta é a reta que representa o fenômeno segundo tal modelo e sabe-se o valor de K_D , conforme buscado.

Caso o modelo linear obtido com a regressão inicial não atenda a certeza desejada (por padrão da pesquisa laboratorial original igual a 0,995), a aplicação modifica a regressão que produz a linha de tendência para um modelo polinomial, progredindo do grau 2 até, no máximo, o grau 6 até que seja alcançada a certeza objetivo (o valor máximo do grau para o modelo polinomial foi delimitado conforme a biblioteca utilizada para realização das regressões, contudo dentre os experimentos foram consideradas as regressões realizadas até no máximo o grau 3). Se essa certeza não for atingida, a análise é avaliada como inválida, ou seja, não há uma correta interpretação de tais dados conforme o modelo proposto, sendo apresentado no Gráfico de Stern-Volmer apenas as dispersões dos dados da Tabela de Dados Tratados(Algoritmo A.12, Apêndice). Caso contrário, é mantida a linha polinomial plotada como linha de tendência e inicia-se a fase denominada

⁶ Representa a proporção da variabilidade na reta obtida que condiz com os valores originários. $R^2 = 1 - \frac{SQ_{Res}}{SQ_{Tot}}$; SQ_{Tot} : soma dos quadrados total ; SQ_{Res} : soma dos quadrados dos resíduos.



Figura 23 – Extrato da aplicação apresentando o Gráfico de Stern-Volmer

Legenda: Gráfico de Stern-Volmer (em verde) e o polinômio plotado com a certeza desejada (em vermelho). Fonte: O autor, 2019.

de seleção do primeiro sítio de ligação (Algoritmo A.14, Apêndice), onde realizam-se novas regressões lineares, agora sobre o polinômio em questão, reduzindo progressivamente seu domínio, no caso, retirando o valor correspondente a maior concentração de supressor, até que a certeza desejada seja alcançada, determinando finalmente uma reta que representa o comportamento linear deste polinômio, e, conforme o modelo em estudo, representa o fenômeno segundo Stern-Volmer, e determinando assim o valor de K_D buscado.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D[Q]$$
(34)

As equações da linha de tendência e da reta gerada a partir dela, que representa a equação de Stern-Volmer, além da certeza alcançada e da constante de Stern-Volmer (K_D) são apresentadas adequadamente na parte inferior da interface do programa, na área de resultados (Algoritmo A.10, Apêndice; Figura 24). Além disso, é apresentado também um tabela de resíduos (Figura 25), representando a diferença entre a razão de intensidade de fluorescência calculada $(\frac{F_0}{F})$ e aquela correspondente a equação de Stern-Volmer para cada valor de concentração de supressor(Algoritmo A.16, Apêndice).

Essa reta presente no gráfico apresentado na Figura 23 (Algoritmo A.15, Apêndice), seja representada pela regressão linear original ou pelo tratamento linear do polinômio

Resultados	
Equação da linha de tendência	1.0223448874184524 + 0.016125043584183332 [Q]^1 + 1.4808409634274426E-4 [t
Certeza Atingida	0,995
Equação de Stern-Volmer	0.9910062456135459 + 0.021888366240603425 [Q]^1
Constante de Stern-Volmer	0,022

Figura 24 – Detalhe dos resultados apresentados pelo programa

Legenda: São exibidos como resultados a equação da linha de tendência, a certeza atingida e a equação e constante de Stern-Volmer.

Fonte: O autor, 2019.

Figura 25 – Detalhe de um exemplo dos resíduos de uma análise

Tabela de Resíduos																	
[Q] (µM)	0.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0	24.0	28.0	32.0	36.0	40.0	48.0	56.0	
Resíduo	0,0090	0,0001	0,0289	0,0058	0,0172	0,0073	0,0045	0,0257	0,0303	0,0274	0,0437	0,0578	0,0300	0,0046	0,0488	0,2118	

Legenda: São representadas as diferenças entre a razão de intensidade de fluorescência calculada $\left(\frac{F_0}{F}\right)$ e aquela correspondente a equação de Stern-Volmer para cada valor de concentração de supressor [Q].

Fonte: O autor, 2019.

(proveniente das regressões polinomiais sucessivas), é o gráfico de Stern-Volmer buscado pelo algoritmo para modelar o sistema em estudo, conforme o modelo fluorimétrico utilizado, sendo o coeficiente angular desta reta, o valor da constante de Stern-Volmer, K_D .

CONCLUSÕES

A partir do que foi apresentado, pode-se notar tanto o potencial quanto a importância do método de supressão da fluorescência como ferramenta para realização de estudos sobre a interação de ligantes com proteínas de grande interesse toxicológico e bio-farmacológico de diferentes substâncias. Os testes que geraram os gráficos apresentados durante a explicação da implementação fruto desse projeto mostram a relevância na modelagem desse processo.

Fica evidente que devido às especificidades inerentes a esse procedimento, conforme foi descrito na introdução, traduzido pela grande massa de dados gerados, aliado às várias rotinas de cálculos requeridos pelo modelo de Stern-Volmer, a automatização da geração e análise desses gráficos, realizados por um *software*, proprietário ou não, é capaz de conferir maior agilidade e confiabilidade na etapa de preparação do material para a interpretação dos resultados finais dos experimentos.

Sendo assim, a aplicação desenvolvida por este trabalho conseguiu atender ao objetivo proposto, de automatização e agilização na obtenção de resultados.

Destaca-se para projetos futuros a possibilidade e interesse na expansão da aplicação desenvolvida, no que diz respeito ao tratamento mais amplo do modelo de Stern-Volmer, conforme as necessidades da pesquisa, além da implementação de um banco de dados para o gerenciamento e persistência desses dados, análises e resultados. De forma a permitir lidar dinamicamente com diversos aspectos relacionados a esse modelo de análise, entre eles, por exemplo, a supressão dinâmica e estática simultaneamente e as propriedades de acessibilidade fracionada e carga.

REFERÊNCIAS

ARNOLD, R. et al. Fluorescence detection of adenosine triphosphate in an aqueous solution using a combination of copper(ii) complexes. *Inorganic chemistry*, v. 51, n. 15, p. 7948–5000, Aug 2012.

BASSANEZI, R. C. Ensino-aprendizagem com modelagem matemática. [S.1.]: Contexto, 2004.

BERTUCCI, C.; DOMENICI, E. Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance. *Current medicinal chemistry*, v. 9, n. 15, p. 1463–81, Aug 2002.

BHATTACHARYYA, M.; CHAUDHURI, U.; PODDAR, R. Evidence for cooperative binding of chlorpromazine with hemoglobin: Equilibrium dialysis, fluorescence quenching and oxygen release study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 167, n. 3, p. 1146 – 1153, 1990. Disponível em: (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X90906432).

CARREJO, D. J.; MARSHALL, J. What is mathematical modelling? exploring prospective teachers' use of experiments to connect mathematics to the study of motion. *Mathematics Education Research Journal*, Springer, v. 19, n. 1, p. 45–76, 2007.

CARTER, D. C. et al. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science* (*New York, N.Y.*), v. 244, n. 4909, p. 1195–1198, Jun 1989.

CORTEZ, C. M. et al. Interactions of aptamers with sera albumins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 95, p. 270 – 275, 2012. ISSN 1386-1425. Disponível em: (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142512004052).

CORTEZ-MAGHELLY, C.; BISCH, P. M. Effect of ionic strength and outer surface charge on the mechanical stability of the erythrocyte membrane: a linear hydrodynamic analysis. *Journal of theoretical biology*, v. 176, n. 3, p. 325–339, Oct 1995.

DINIZ, G. L.; SANTOS, C. I. Crescimento populacional da tartaruga-da-amazônia (podocnemis expansa). *Biomatemática*, v. 7, p. 128–133, 1997.

EISBERG, R. M.; RESNICK, R. Quantum Physics of Atoms, Molecules, Solids, Nuclei and Particules. John Wiley & Sons, 1985. ISBN 9788570013095. Disponível em: (https://books.google.com.br/books?id=5tBlPgAACAAJ).

FANALI, G. et al. Allosteric and binding properties of asp1–glu382 truncated recombinant human serum albumin – an optical and nmr spectroscopic investigation. *The FEBS Journal*, v. 276, n. 8, p. 2241–2250, 2009. Disponível em: (https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1742-4658.2009.06952.x).

FASANO, M. et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*, v. 57, n. 12, p. 787–796, 2008. Disponível em: (https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1080/15216540500404093).

FRAGOSO, V. M. et al. Risperidone interacts with serum albumin forming complex. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 33, n. 2, p. 26–266, Mar 2012.

FRAGOSO, V. M. da S. et al. Binding of sulpiride to seric albumins. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 1, p. 69, 2016. ISSN 1422-0067. Disponível em: (http://www.mdpi.com/1422-0067/17/1/59).

GONCHAROV, N. V. et al. Serum albumin binding and esterase activity: Mechanistic interactions with organophosphates. *Molecules*, v. 22, n. 7, 2017. ISSN 1420-3049. Disponível em: $\langle http://www.mdpi.com/1420-3049/22/7/1201 \rangle$.

GóES FILHO, L. S.; LOURO, S. R. W. Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio: espectroscopia de absorção e fluorescência. Tese (Doutorado) — Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, v. 358, n. 6383, p. 209–15, Jul 1992.

HILLEL, J. The Teaching and Learning of Mathematics at University Level: An icmi study. 1. ed. [S.l.]: Springer Netherlands, 2001. v. 7.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. *Farmacologia Básica e Clínica*. 13. ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2017. (LANGE). ISBN 9788580555974. Disponível em: (https://books.google.com.br/books?id=rsw-DgAAQBAJ).

KRAGH-HANSEN, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacological Reviews*, American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 33, n. 1, p. 17–53, 1981. ISSN 0031-6997. Disponível em: $\langle http://pharmrev.aspetjournals.org/content/33/1/17 \rangle$.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. 698 p.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* 3. ed. [S.1.]: Springer US, 2006. ISBN 9780387463124.

MAKI, D.; THOMPSON, M. The mathematical modeling cycle. *Stones to Mathematical Modeling*, 2014.

MARQUEZIN, C. A. *Técnicas de fluorescência no monitoramento de membranas modelo*. Tese (Doutorado) — Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2008.

MELNIK, R. Mathematical and Computational Modeling: With Applications in Natural and Social Sciences, Engineering, and the Arts. Wiley, 2015. (In Wiley Online Library: Books). ISBN 9781118853986. Disponível em: (https: //books.google.com.br/books?id=wgqeCAAAQBAJ).

MOTTA, A. A. E. A. Avaliação da posição de sítios para ligantes em albuminas séricas. Modelo matemático baseado na teoria de supressão de fluorescência. 74 p. Dissertação (Mestrado) — Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016. PETERS JR., T. All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. 1. ed. [S.l.]: Academic Press, Inc., 1995. 432 p.

PETITPAS, I. et al. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids11edited by r. huber. *Journal of Molecular Biology*, v. 314, n. 5, p. 955 – 960, 2001. ISSN 0022-2836. Disponível em: (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600952082).

SAKURAI, Y. et al. Esterase-like activity of serum albumin: characterization of its structural chemistry using p-nitrophenyl esters as substrates. *Pharmaceutical research*, v. 21, n. 2, p. 285–92, Feb 2004.

SANCHES, C. F. M.; JAFELICE, R. S. M. Modelagem matemática para o crescimento de peixes. *FAMAT*, Uberlândia, Minas Gerais, v. 3, p. 13–25, 2004.

SILVA, D. Interação do Metil-paration com Albuminas Séricas. Tese (Doutorado) — Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2003.

SILVA, D. et al. Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin. *Toxicology Letters*, v. 147, n. 1, p. 53 – 61, 2004b. ISSN 0378-4274. Disponível em: $\langle http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427403004004 \rangle$.

SILVA, D.; CORTEZ, C. M.; LOURO, S. R. Chlorpromazine interactions to sera albumins: A study by the quenching of fluorescence. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 60, n. 5, p. 1215 – 1223, 2004a. ISSN 1386-1425. Disponível em: (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142503003792).

SILVA, D.; CORTEZ, C. M.; LOURO, S. R. W. Quenching of the intrinsic fluorescence of bovine serum albumin by chlorpromazine and hemin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Scielo, v. 37, p. 963 – 968, 07 2004c. ISSN 0100-879X. Disponível em: (http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2004000700004& nrm=iso).

SILVA, D. et al. Spectrofluorimetric study of the interaction of methyl-parathion with fish serum albumin. *Fish physiology and biochemistry*, v. 36, n. 3, p. 427–33, Sep 2010.

SILVA, D. et al. The interaction of methyl-parathion with serum and albumin of the neo-tropical fish piaractus mesopotamicus. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 73, n. 1, p. 32–7, Jan 2010a.

SIMMONS, S. O. et al. Nrf2 oxidative stress induced by heavy metals is cell type dependent. *Current chemical genomics*, v. 5, p. 1–12, 2011.

SOUZA, C. F. d. Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina por cromatografia eletrocinética capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente. Dissertação (Mestrado) — Pontifícia Universidade Católica Do Rio De Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

SOUZA, E. S. de et al. End-to-end distance distribution in bradykinin observed by förster resonance energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -*General Subjects*, v. 1474, n. 2, p. 251 – 261, 2000. ISSN 0304-4165. Disponível em: (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416500000040). SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular pharmacology*, v. 12, n. 6, p. 1052–61, Nov 1976.

SUGIO, S. et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 åresolution. *Protein Engineering*, Oxford Univ Press, v. 12, n. 6, p. 439–446, 1999.

TAVIRANI, M. R. et al. Conformational study of human serum albumin in predenaturation temperatures by differential scanning calorimetry, circular dichroism and uv spectroscopy. *Journal of biochemistry and molecular biology*, v. 39, n. 5, p. 530–6, Sep 2006.

TETZNER, T. A. D. Efeitos da substituição do soro fetal bovino (sfb) e da albumina sérica bovina (bsa) pela ovalbumina (ova) na produção in vitro de embriões bovinos. Dissertação (Mestrado) — Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Paulo, 2007.

THADEU, F. C.; SILVA, J. A.; SILVA, D. Mathematic-computational modeling for the calculations involved in the stern-volmer theory. *AIP Conference Proceedings*, v. 1790, n. 1, p. 100008, 2016. Disponível em: (https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.4968700).

TOENNIES, J. et al. Otto stern (1888–1969): The founding father of experimental atomic physics. *Annalen der Physik*, v. 523, n. 12, p. 1045–1070, 2011. Disponível em: (https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/andp.201100228).

VECCHIA, R. D.; MALTEMPI, M. V. Modelagem matemática e tecnologias de informação e comunicação: a realidade do mundo cibernético como um vetor de virtualização. *Bolema: Boletim de Educação Matemática*, scielo, v. 26, p. 963 – 990, 08 2012. ISSN 0103-636X. Disponível em: (http://www.scielo.br/scielo.php?script= sci_arttext&pid=S0103-636X2012000300010&nrm=iso).

VERBEECK, R. K. et al. Binding of phenothiazine neuroleptics to plasma proteins. *Biochemical pharmacology*, v. 32, n. 17, p. 2565–70, Sep 1983.

WU, X. et al. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain iia. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 79, n. 5, p. 1202 – 1209, 2011. ISSN 1386-1425. Disponível em: (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142511002903).

APÊNDICE – Algoritmos

Classes próprias

Algoritmo A.1 – Classe cubeta

```
1 public class Cubeta implements Serializable {
2
3
      private transient StringProperty substrato = new SimpleStringProperty()
      private transient StringProperty supressor = new SimpleStringProperty()
4
      private transient StringProperty reagentes = new SimpleStringProperty()
5
      private transient DoubleProperty temperatura = new SimpleDoubleProperty
6
      ();
7
      private final SortedSet<Double> comprimentosDeOnda;
8
      private final SortedSet<Double> concentracoesDeSupressor;
9
      private SortedMap<Double, SortedMap<Double, Double>> mapaFluorescencia
      = new TreeMap<>();
10
11
      public Cubeta (String substrato, String supressor, double temperatura,
      SortedMap<Double, SortedMap<Double, Double>>> dados) {
           this.supressor.set(supressor.replace(" ", ""));
12
13
           if (substrato.contains("Tampão") || substrato.contains("Bff") ||
      substrato.contains("Buffer")) {
14
               this.substrato.set("Buffer");
15
           } else {
16
               this.substrato.set(substrato.replaceAll("\\s[^\\s]*", ""));
17
           }
           reagentes.bind(Bindings.format("%s=%s", this.substrato, this.
18
      supressor));
19
20
           this.temperatura.set(temperatura);
21
22
           mapaFluorescencia = dados;
23
24
           comprimentosDeOnda = new TreeSet <>(mapaFluorescencia.keySet());
25
26
           Set < Sorted Map < Double, Double >> values = mapaFluorescencia.values().
      stream().collect(Collectors.toSet());
           concentracoesDeSupressor = new TreeSet <>();
27
           values.stream().forEach(v \rightarrow {
28
29
               concentracoesDeSupressor.addAll(v.keySet());
30
           });
```

31

Algoritmo A.2 – Classe experimento

1	${f public}$ Experimento (Workbook tabela Original Dados, Workbook
	$tabelaGrupoControle$, String supressor, double temperatura) {
2	this.supressor = supressor;
3	this .tabelaOriginalDados = tabelaOriginalDados;
4	this .tabelaGrupoControle = tabelaGrupoControle;
5	this .temperatura = temperatura;
6	
7	construirCubetas(tabelaOriginalDados.getSheetAt(0));
8	if (tabelaGrupoControle != null) {
9	construirCubetas(tabelaGrupoControle.getSheetAt(0));
10	}
11	}

Preâmbulo do algoritmo

Algoritmo A.3 – Validação do arquivo de entrada

```
private boolean validarArquivo(Workbook tabela) {
 1
2
           if (tabela.getNumberOfSheets() != 1) {
3
               return false;
4
           }
5
6
           Sheet s = tabela.getSheetAt(0);
7
           for (int linha = 0; linha < s.getPhysicalNumberOfRows(); linha++) {</pre>
8
9
               Row r = s.getRow(linha);
               if (linha < 3 && r == null) {
10
                    return false;
11
12
               } else if (r = null) {
                   break;
13
14
               }
15
16
               for (int column = 0; column < r.getPhysicalNumberOfCells();
      coluna++) {
17
                    Cell c = r.getCell(columa);
                    switch (linha) {
18
19
                        case 0:
20
                            if ((c == null && columa % 2 == 0)
                                    || (c != null && coluna % 2 != 0 && c.
21
      getCellType() != Cell.CELL_TYPE_STRING)) {
22
                                return false;
23
                            }
24
                            break;
25
                        case 1:
```

```
26
                            if (c == null || c.getCellType() != Cell.
      CELL_TYPE_STRING
27
                                     || (columa % 2 == 0 & !c.
      getStringCellValue().contentEquals("Wavelength (nm)"))
28
                                     || (columa % 2 != 0 && !c.
      getStringCellValue().contentEquals("Intensity (a.u.)"))) {
29
                                return false;
30
                            }
                            break;
31
32
                        default:
                            if (c == null || c.getCellType() != Cell.
33
      CELL_TYPE_NUMERIC) {
34
                                 return false;
35
                             }
36
                            break;
                    }
37
38
               }
           }
39
40
41
           return true;
42
```

Algoritmo A.4 – Execução Geral

```
1 public void executar() {
2 mapaResultados.clear();
3 mapaResiduos.clear();
4 
5 tratarEfeitoTampao();
6 analisarFluorescencia();
7 tratarResiduos();
8 }
```

Inicialização dos dados da pesquisa

Algoritmo A.5 – Construção das cubetas

```
private void construirCubetas(Sheet tabela) {
1
2
          SortedMap<String, List<Double>>> mapaConcentracoes = new TreeMap<>()
3
          List <Double> comprimentosDeOnda = new ArrayList <>();
4
          Map<String, SortedMap<Double, SortedMap<Double, Double>>>>
     fluorescencia = new HashMap <> ();
5
          int numeroCubetas = 0;
          boolean endData = false;
6
7
8
          Iterator rIterator = tabela.rowIterator();
9
          while (rIterator.hasNext() && !endData) {
```

56

```
10
11
               Row r = (Row) rIterator.next();
12
               Iterator cIterator = r.cellIterator();
13
14
               while (cIterator.hasNext() && !endData) {
15
                    Cell c = (Cell) cIterator.next();
                    if (c != null) {
16
                        switch (c.getAddress().getRow()) {
17
18
                            case 0:
                                 String[] split = c.getStringCellValue().split("
19
      [-]");
                                 double concentracao = 0;
20
21
                                 if (split.length = 2) {
                                     concentracao = Double.valueOf(split[1]).
22
      replace(',',', '.'));
23
                                 }
24
                                 if (!mapaConcentracoes.containsKey(split [0])) {
25
                                     mapaConcentracoes.put(split[0], new
      \operatorname{ArrayList} \langle \rangle () ;
26
                                     mapaConcentracoes.get(split[0]).add(
      concentracao);
27
                                 } else {
                                     mapaConcentracoes.get(split[0]).add(
28
      concentracao);
29
                                 }
30
                                 break;
31
                            case 1:
32
                                 numeroCubetas = mapaConcentracoes.size();
33
                                 break;
34
                            default:
35
                                 if (c.getCellType() != Cell.CELL_TYPE_NUMERIC)
      { //Terminada a leitura de dados de fluorescência
                                     endData = true;
36
37
                                 } else {
                                     int linha = c.getAddress().getRow();
38
                                     int columa = c.getAddress().getColumn();
39
                                     if (column = 0) {
40
                                         comprimentosDeOnda.add(c.
41
      getNumericCellValue());
42
                                     } else if (coluna % 2 != 0) {
                                          List < String > substratos =
43
      mapaConcentracoes.keySet().stream().collect(Collectors.toList());
44
                                          String substratoAdequado = substratos.
      get((coluna / 2) % numeroCubetas);
45
                                         double comprimentoDeOndaAdequado =
      comprimentos DeOnda.get(linha - 2);
46
                                          concentracao = mapaConcentracoes.get(
```

```
substratoAdequado).get((coluna / 2) / numeroCubetas);
47
48
                                         if (!fluorescencia.containsKey(
      substratoAdequado)) {
49
                                              fluorescencia.put (substratoAdequado
      , new TreeMap<>());
50
                                         }
                                         if (!fluorescencia.get(
51
      substratoAdequado).containsKey(comprimentoDeOndaAdequado)) {
                                              fluorescencia.get(substratoAdequado
52
      ).put(comprimentoDeOndaAdequado, new TreeMap<>());
53
                                         }
                                         fluorescencia.get(substratoAdequado)
54
55
                                                  .get (comprimentoDeOndaAdequado)
56
                                                  .put(concentracao, c.
      getNumericCellValue());
57
                                     }
58
                                 }
                                break;
59
60
                        }
61
                    }
               }
62
63
           }
64
65
           fluorescencia.forEach((String substrato, SortedMap<Double,
      SortedMap<Double, Double>> mapa) \rightarrow {
66
               cubetas.add(new Cubeta(substrato, supressor, temperatura, mapa)
      );
67
           });
68
       }
```

Algoritmo A.6 – Tratamento do efeito tampão

1	<pre>public void tratarEfeitoTampao() {</pre>
2	ObservableSet < Cubeta > cubetasBuffer = GestorDeCubetas
3	.getInstancia()
4	.getMapaCubetasBuffer()
5	.get(new Pair<>("Buffer=" + cubeta.getSupressor(), cubeta.
	getTemperatura()));
6	
7	cubeta.getMapaFluorescencia().forEach((Double comp, SortedMap <
	Double, Double> mapa) \rightarrow {
8	mapa.forEach((Double conc, Double fluor) \rightarrow {
9	final DoubleProperty mediaBuffers = new
	SimpleDoubleProperty();
10	if (cubetasBuffer != null) {
11	final IntegerProperty count = new SimpleIntegerProperty
	();

12 $cubetasBuffer.forEach((Cubeta t) \rightarrow \{$ SortedMap<Double, Double> mapaBuffer = t. 13getMapaFluorescencia().get(comp); 14 if (mapaBuffer != null) { 15**final** Double valorBuffer = mapaBuffer.get(conc) ; 16if (valorBuffer != null) { mediaBuffers.set(mediaBuffers.get() + 17valorBuffer); 18count.set(count.get() + 1);19} } 2021if (count.get() != 0) { mediaBuffers.set(mediaBuffers.get() / count.get 22()); 23} }); 2425} mapaFluorescenciaBuffered.get(comp).put(conc, fluor -26mediaBuffers.get()); mapaTampao.get(comp).put(conc, mediaBuffers.get()); 2728}); 29}); 30

Algoritmo A.7 – Construção do gráfico de espectro de fluorescência

```
1
       private void construirGraficoEspectroFluorescencia (Analise
      analiseSelecionada) {
2
           linechartGraficoFluorescencia.getData().clear();
3
 4
           linechartGraficoFluorescencia.setTitle(((RadioButton)
      selecaoGraficoExibido.getSelectedToggle()).getText());
           analiseSelecionada.getCubeta().getConcentracoesDeSupressor().stream
5
      ().forEach(concentracao \rightarrow {
6
               Series serie = new Series();
7
               serie.setName(concentracao.toString() + " " + microAsString + "
     M");
8
9
               analiseSelecionada.getMapaFluorescenciaBuffered().forEach(new
      BiConsumer<Double, SortedMap<Double, Double>>() {
10
                   @Override
11
12
                   public void accept(Double comprimento, SortedMap<Double,</pre>
      Double> mapa) {
13
                       serie.getData().add(new LineChart.Data<>(comprimento,
      mapa.get(concentracao)));
14
```

15		});
16		
17		line chart Grafico Fluorescencia.get Data().add(serie);
18	});	
19	}	

Análise de fluorescência e obtenção de resultados

Algoritmo A.8 – Análise de fluorescência

1	<pre>private void analisarFluorescencia() {</pre>
2	$HashMap < Double \ , \ Set < Double >> \ comprimentos Selecionados \ =$
	identificarComprimentosComFluoresMax();
3	HashMap <double, set<double="">>> comprimentosAuxiliares = new HashMap</double,>
	<>();
4	
5	$comprimentosSelecionados.forEach((conc, setComp) \rightarrow \{$
6	comprimentosAuxiliares.put(conc, new HashSet <> ());
7	$setComp.stream().forEach((comp) \rightarrow {$
8	int i = 0;
9	${\bf for} \ ({\rm Double} \ \ {\rm compMaiores} \ : \ \ {\rm cubeta} . {\rm getComprimentosDeOnda} () \ .$
	tailSet(comp)) {
10	if (i $!= 0$ && i <= (TAMANHO_INTERVALO_FLUORES_MAX - 1)
	$/ 2) \{$
11	$\operatorname{comprimentosAuxiliares.get(conc).add(compMaiores)};$
12	}
13	i++;
14	}
15	i = 0;
16	SortedSet < Double > headSet = cubeta.getComprimentosDeOnda().
	headSet(comp);
17	for (Double compMenores : headSet) {
18	if $(i \ge headSet.size() - ($
	TAMANHO_INTERVALO_FLUORES_MAX -1) / 2) {
19	comprimentosAuxiliares.get(conc).add(compMenores);
20	}
21	i++;
22	}
23	<pre>});</pre>
24	<pre>});</pre>
25	
26	comprimentosAuxiliares.forEach((conc, setComp) ->
	comprimentosSelecionados.get(conc).addAll(setComp));
27	
28	final SortedMap <double, double=""> mapaFluoresMax = new TreeMap<>();</double,>
29	
30	${ m mapaFluorescenciaBuffered.forEach((Double comp, SortedMap$

	$Double> mapa) \rightarrow \{$
31	mapa.forEach((Double conc, Double fluor) \rightarrow {
32	<pre>if (!mapaFluoresMax.containsKey(conc)) {</pre>
33	${ m mapaFluoresMax.put(conc, 0.0);}$
34	}
35	if $(comprimentosSelecionados.get(conc).contains(comp)) $ {
36	mapaFluoresMax.put(conc, mapaFluoresMax.get(conc) +
	fluor);
37	}
38	});
39	$\});$
40	
41	$mapaFluoresMax.forEach((Double conc, Double somaFluor) \rightarrow \{$
42	mapaFluoresMax.put(conc, somaFluor / comprimentosSelecionados.
	get(conc).size());
43	$\});$
44	normalizarMapaMaxFluores(mapaFluoresMax);
45	gerarTabelaResultados(mapaFluoresMax);
46	determinar Equacao SV();
47	}

```
Algoritmo
 A.9 – Identificar comprimento(s) com fluorescência máxima<br/> (\lambda_Q)
```

1	<pre>private HashMap<double, set<double="">>></double,></pre>
	$identificarComprimentosComFluoresMax()$ {
2	HashMap <double, set<double="">>> concenComprimentos = new HashMap<>();</double,>
3	
4	cubeta.getConcentracoesDeSupressor().forEach(concS \rightarrow {
5	List <double> list a = new ArrayList <>();</double>
6	mapaFluorescenciaBuffered.forEach((Double comp, SortedMap <
	Double, Double> mapa) \rightarrow {
7	mapa.forEach((Double conc, Double fluor) \rightarrow {
8	if $(conc.equals(concS))$ {
9	lista.add(fluor);
10	}
11	});
12	});
13	double fluorescenciaMax = Collections.max(lista);
14	
15	mapaFluorescenciaBuffered.forEach((Double comp, SortedMap <
	Double, Double> mapa) \rightarrow {
16	mapa.forEach((Double conc, Double fluor) \rightarrow {
17	if (fluor == fluorescenciaMax) {
18	if (!concenComprimentos.containsKey(concS)) {
19	concenComprimentos.put(concS, new HashSet <>());
20	}
21	concenComprimentos.get(concS).add(comp);
22	}

Algoritmo A.10 – Tratamento da tabela de resultados

```
1
       private void gerarTabelaResultados (SortedMap<Double, Double>
      mapaFluoresMax) {
2
           mapaFluoresMax.forEach((Double conc, Double fluor) -> {
3
               mapaResultados.put(conc, new Pair <> (fluor, mapaFluoresMax.get
      (0.0) / fluor));
 4
           });
5
       }
6
 7
       private void normalizarMapaMaxFluores(SortedMap<Double, Double>
      mapaFluoresMax) {
           mapaFluoresMax.forEach((Double conc, Double fluor) -> {
8
9
               if (conc != 0.0) {
10
                   mapaFluoresMax.put(conc, fluor / mapaFluoresMax.get(0.0));
11
               }
12
           });
13
           mapaFluoresMax.put(0.0, 1.0);
14
```

Algoritmo A.11 – Construção do gráfico de supressão de fluorescência

```
1
       private void construirGraficoSupressaoFluorescencia (Analise
      analiseSelecionada) {
2
           linechartSV.getData().clear();
3
           yAxisSV.setLabel("F");
 4
           linechartSV.setTitle(((RadioButton) selecaoGraficoExibido.
5
      getSelectedToggle()).getText());
           Series serieResultados = new Series();
6
 7
           Series serieTendencia = new Series();
           serieResultados.setName("Fluorescencia");
8
9
           serieTendencia.setName("Linha de Tendência");
10
           List < Double > list Xs = new ArrayList <>();
11
12
           List <Double> list Ys = new ArrayList <>();
13
           analiseSelecionada.getMapaResultados().forEach((Double conc, Pair<
      Double, Double> resultados) \rightarrow {
14
               serieResultados.getData().add(new XYChart.Data<>(conc,
      resultados.getKey()));
               listXs.add(conc);
15
```

```
16
               listYs.add(resultados.getKey());
17
           });
18
19
           double[] xs = new double[listXs.size()];
20
           double[] ys = new double[listYs.size()];
21
           for (int i = 0; i < xs.length; i++) {
22
               xs[i] = list Xs.get(i);
23
               ys[i] = listYs.get(i);
24
           }
25
           double[] coeficientes = polyfit(xs, ys, 1);
26
27
28
           for (double x = 0; x \le analiseSelectionada.getMapaResultados().
      lastKey() + 1.0; x \models 0.05) {
               double y = polynomial(x, coeficientes);
29
30
               serieTendencia.getData().add(new XYChart.Data<>(x, y));
31
32
           linechartSV.getData().addAll(serieResultados, serieTendencia);
33
```

Determinação da equação de Stern-Volmer

Algoritmo A.12 – Determinação da equação de Stern-Volmer

```
1
       private void determinarEquacaoSV() {
 2
           double[] xs = new double[getMapaResultados().size()];
3
           double[] ys = new double[getMapaResultados().size()];
           double [] ysTende = new double [getMapaResultados().size()];
 4
5
           int k = 0;
6
 7
           for (Map.Entry<Double, Pair<Double, Double>> entry : mapaResultados
      .entrySet()) {
8
               xs[k] = entry.getKey();
9
               ys[k++] = entry.getValue().getValue();
10
           }
11
           certezaAtingidaProperty().set(0.0);
12
13
           int i = 0;
14
           while (i < 7 && certezaAtingidaProperty().get() <
      certezaDesejadaProperty().get()) {
               coeficientesTendencia = polyfit (xs, ys, ++i);
15
16
               k = 0;
17
               for (double x : xs) {
18
                   ysTende[k++] = polynomial(x, coeficientesTendencia);
19
               }
20
               certezaAtingidaProperty().set(determinarR2(xs, ys, ysTende));
21
               linhaTendenciaProperty().set(equationToString(
```

```
coeficientes Tendencia, "[Q]"));
22
           ł
23
           if (certezaAtingidaProperty().get() >= certezaDesejadaProperty().
      get()) {
24
               if (i = 1) {
25
                   coeficientesEquacaoSV = new double[coeficientesTendencia.
      length];
26
                   System.arraycopy (coeficientes Tendencia, 0,
      coeficientesEquacaoSV, 0, coeficientesTendencia.length);
27
                   equacaoSternVolmerProperty().set(equationToString(
      coeficientesEquacaoSV, "[Q]"));
28
                   constanteSternVolmerProperty().set(coeficientesEquacaoSV[
      coeficientesEquacaoSV.length - 1];
29
               } else {
                   Pair<double[], double[]> localizacaoPrimeiroSitio =
30
      localizarPrimeiroSitio(xs, ysTende);
31
                   if (localizacaoPrimeiroSitio != null) {
32
                       double[] ysSitio = new double[localizacaoPrimeiroSitio.
      getKey().length];
33
34
                       coeficientesEquacaoSV = polyfit(
      localizacaoPrimeiroSitio.getKey(), localizacaoPrimeiroSitio.getValue(),
      1);
                       k = 0;
35
                       for (double x : localizacaoPrimeiroSitio.getKey()) {
36
37
                           ysSitio[k++] = polynomial(x, coeficientesEquacaoSV)
      ;
38
                       }
39
40
                       certezaAtingidaProperty().set(determinarR2(
      localizacaoPrimeiroSitio.getKey(), localizacaoPrimeiroSitio.getValue(),
      ysSitio));
41
                       equacaoSternVolmerProperty().set(equationToString(
      coeficientesEquacaoSV, "[Q]"));
42
                       constanteSternVolmerProperty().set(
      coeficientesEquacaoSV[coeficientesEquacaoSV.length - 1]);
                   } else {
43
44
                       coeficientesEquacaoSV = null;
                       constanteSternVolmer.set(0.0);
45
                       equacaoSternVolmerProperty().set("Inválida");
46
47
                   }
               }
48
           } else {
49
               coeficientesEquacaoSV = null;
50
               constanteSternVolmer.set(0.0);
51
52
               equacaoSternVolmerProperty().set("Inválida");
53
```

54

```
Algoritmo A.13 – Determinação de R^2
```

```
1
      private double determinarR2(final double[] xsResul, final double[]
      ysResul, final double[] ysTende) {
2
           double[] ys = new double[xsResul.length];
3
           double[] ysEstimados = new double[xsResul.length];
 4
           final double mediaY;
5
6
           System.arraycopy(ysResul, 0, ys, 0, xsResul.length);
 7
           mediaY = mean(ys);
8
           System.arraycopy(ysTende, 0, ysEstimados, 0, xsResul.length);
9
10
           double SQTot = 0.0;
11
           double SQRes = 0.0;
12
13
           for (int i = 0; i < xsResul.length; i++) {
14
               SQTot += Math.pow(ys[i] - mediaY, 2);
15
           }
           for (int i = 0; i < xsResul.length; i++) {
16
17
               SQRes += Math.pow(ys[i] - ysEstimados[i], 2);
18
           }
19
20
           return 1 - (SQRes / SQTot);
21
```

Algoritmo A.14 – Localização do primeiro sítio

```
1
      private Pair<double[], double[]> localizarPrimeiroSitio(double[] xs,
      double[] ysTende) {
 2
           int posicao = xs.length;
3
           boolean certezaOK = false;
 4
           double[] new_xs = null;
           double[] new_ysTende = null;
5
6
 7
           while (!certezaOK && posicao > 1) {
               new_xs = new double [posicao];
8
9
               new_ysTende = new double[posicao];
               double[] ysSitio = new double[posicao];
10
               System.arraycopy(xs, 0, new_xs, 0, posicao);
11
12
               System.arraycopy(ysTende, 0, new_ysTende, 0, posicao);
13
14
               double[] coeficientes = polyfit(new_xs, new_ysTende, 1);
               int k = 0;
15
16
               for (double x : new_xs) {
17
                   ysSitio[k++] = polynomial(x, coeficientes);
18
```

19	$certezaOK = determinarR2(new_xs, new_ysTende, ysSitio) >=$
	certezaDesejada.get();
20	posicao —-;
21	}
22	if (certezaOK) {
23	return new Pair <> (new_xs, new_ysTende);
24	}
25	return null;
26	}

Algoritmo A.15 – Construção do gráfico de Stern-Volmer

```
private void construirGraficoSV(Analise analiseSelecionada) {
 1
2
           linechartSV.getData().clear();
3
           yAxisSV.setLabel("F" + subscriptZero + " / F");
 4
5
           linechartSV.setTitle ("Gráfico de Stern-Volmer");
 6
           Series serieResultados = new Series();
 7
           Series serieTendencia = new Series();
           Series serieSV = new Series();
8
           serieResultados.setName("Fluorescencia");
9
10
           serieTendencia.setName("Linha de Tendência");
           serieSV.setName("Gráfico de Stern-Volmer");
11
12
13
           analiseSelecionada.getMapaResultados().forEach((Double conc, Pair<
      Double, Double> resultados) \rightarrow {
               serieResultados.getData().add(new XYChart.Data<>(conc,
14
      resultados.getValue()));
15
           });
16
17
           for (double x = 0; x <= analiseSelecionada.getMapaResultados().
      lastKey() + 1.0; x \models 0.05) {
18
               double y = polynomial(x, analiseSelectionada.
      getCoeficientesTendencia());
19
               serieTendencia.getData().add(new XYChart.Data<>(x, y));
           }
20
21
           if (analiseSelecionada.certezaAtingidaProperty().get() >=
22
      analiseSelecionada.certezaDesejadaProperty().get()) {
23
               if (analiseSelecionada.getCoeficientesTendencia().length == 2)
      {
24
                   serieSV.getData().addAll(serieTendencia.getData());
25
                   serieTendencia.getData().clear();
26
                   linechartSV.getData().addAll(serieResultados, serieSV);
27
               } else {
                   if (analiseSelecionada.getCoeficientesEquacaoSV() != null)
28
29
                       for (double x = 0; x \ll analiseSelectionada.
```

```
getMapaResultados().lastKey() + 1.0; x \neq 0.05 {
30
                            double y = polynomial(x, analiseSelectionada.
      getCoeficientesEquacaoSV());
                            serieSV.getData().add(new XYChart.Data<>(x, y));
31
32
                        ł
33
                   }
34
                   linechartSV.getData().addAll(serieResultados,
      serieTendencia, serieSV);
35
               }
           } else {
36
               serieTendencia.getData().clear();
37
               linechartSV.getData().addAll(serieResultados);
38
39
           }
40
```

Tratamento de desvio dos resultados

Algoritmo A.16 – Determinação dos resíduos existentes

```
1
      private void tratarResiduos() {
2
          if (!equacaoSternVolmer.isEmpty().get() && coeficientesEquacaoSV !=
      null) {
3
              mapaResultados.entrySet().forEach(res -> {
4
                  double d = Math.abs(res.getValue().getValue() - polynomial(
     res.getKey(), coeficientesEquacaoSV));
5
                  mapaResiduos.put(res.getKey(), d);
6
              });
7
          }
8
```