



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Matemática e Estatística

Art Adriel Emidio de Araujo Motta

**Avaliação da posição de sítios para ligantes em albuminas séricas:  
modelo matemático baseado na teoria de supressão de  
fluorescência**

Rio de Janeiro

2016

Art Adriel Emidio de Araujo Motta

**Avaliação da posição de sítios para ligantes em albuminas séricas. Modelo matemático baseado na teoria de supressão de fluorescência**



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.

Orientadores: Prof. Dr. Dilson Silva

Prof.<sup>a</sup> Dra Célia Martins Cortez

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

M921 Motta, Art Adriel Emidio de Araujo.  
Avaliação da posição do sítio para ligantes em albuminas séricas:  
modelo matemático baseado na teoria de supressão de  
fluorescência/ Art Adriel Emidio de Araujo Motta. – 2016.  
70f. : il.

Orientador: Dilson Silva.  
Coorientador: Célia Martins Cortez.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Computacionais) -  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Matemática e  
Estatística.

1. Albumina - Modelos matemáticos - Teses. 2. Fluorescência -  
Teses. . I. Silva, Dilson. II. Cortez, Célia Martins. III. Universidade do  
Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Matemática e Estatística. IV  
Título.

CDU 547.962.3

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

---

Assinatura

---

Data

Art Adriel Emidio de Araujo Motta

**Avaliação da posição do sítio para ligantes em albuminas séricas: modelo matemático baseado na teoria de supressão de fluorescência**

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 14 de setembro de 2016.

Banca Examinadora:

---

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

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Célia Martins Cortez (Orientadora)  
Instituto de Matemática e Estatística - UERJ

---

Prof. Dr. Frederico Alan de Oliveira Cruz  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Viviane Nunes Fragoso  
FIOCRUZ

---

Prof. Dr. Alan Freitas Machado  
Instituto de Física - UERJ

Rio de Janeiro

2016

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que, ao longo de toda a minha vida, sempre estiveram ao meu lado me apoiando, principalmente durante estes dois anos de curso. E sempre me ajudaram a aprimorar minhas qualidades e corrigir os meus defeitos, nunca me deixando desanimar.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, por me guiar durante toda minha trajetória acadêmica; por estar presente em minha vida, seja nos momentos bons ou ruins. Sou grato a Ele pela oportunidade de estudar em uma universidade de excelência e pelas minhas conquistas ao longo de toda minha trajetória. Sem Ele, eu nada seria.

Aos Prof. Dr. Dilson Silva e Prof<sup>a</sup> Dra. Célia Martins Cortez pela orientação na realização deste trabalho, além do incentivo e compreensão ao longo desses anos.

À Prof<sup>a</sup> Dra Maria Clícia Stelling de Castro pela ajuda em momentos de dúvidas na área computacional.

Aos meus pais e minha irmã, cujo apoio foi essencial durante minha formação acadêmica, pois sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e vibrando a cada vitória.

A todos meus professores de graduação e pós-graduação, pois foram essenciais para minha formação acadêmica.

Finalmente, agradeço a todos os meus colegas de turma que contribuíram de alguma maneira para minha formação e me apoiaram durante este período.

Os números governam o mundo.

*Platão*

## RESUMO

MOTTA, Art Adriel Emidio de Araujo. *Avaliação da posição de sítios para ligantes em albuminas séricas*: modelo matemático baseado na teoria de supressão de fluorescência. 2016. xx f. Dissertação (Mestrado em Ciências Computacionais) - Instituto de Matemática e Estatística, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Neste trabalho apresentamos um modelo matemático elaborado para estimar a posição relativa de sítios de ligação para ligantes nas albuminas humana (HSA) e bovina (BSA), considerando as semelhanças/diferenças estruturais e espectroscópicas entre essas duas proteínas. A albumina é a maior proteína aniônica dos vertebrados e, por representar 50 a 60% do total das proteínas plasmáticas, a sua capacidade de ligar fármacos torna-se um fator determinante para a eficácia biológica destes. A disponibilidade dos medicamentos no sangue depende diretamente da sua afinidade com a albumina. A modelagem computacional foi aplicada para testar e validar o modelo matemático, utilizando conjuntos de dados experimentais oriundos de estudos espectrofluorimétricos da interação de três fármacos: clorpromazina, risperidona e haloperidol, e dois pesticidas: metilparation e glifosato, com as duas albuminas. O modelo mostrou-se adequado na avaliação da posição de sítios na BSA e HSA para os ligantes aqui testados, permitindo inclusive observar a dinâmica de localização dos ligantes dentro da molécula proteica com o aumento da sua concentração.

Palavras-chave: Modelagem matemática. Sítios de ligação. Espectrofluorescência. Albuminas.

## ABSTRACT

MOTTA, Art Adriel Emidio de Araujo. Evaluation of the position of sites for ligands in serum albumin: a mathematical model based on the theory of fluorescence suppression. 2016. xx f. Dissertação (Mestrado em Ciências Computacionais) - Instituto de Matemática e Estatística, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

In this work we present a mathematical model designed to assess the relative position of binding sites for ligands in human albumin (HSA) and bovine (BSA), considering structural and spectroscopic differences between these two proteins. Albumin is the major anionic protein in vertebrates and, because represents 50 to 60% of total plasma proteins, its ability to bind drugs becomes a determinant factor for their biological effectiveness. The availability of drugs in the blood depends directly on its affinity for albumin. Computer modeling was used to test and validate the model using sets of experimental data from espectrofluorimetric studies on the interaction of three drugs: chlorpromazine, risperidone and haloperidol, and two pesticides: methylparathion and glyphosate, with both albumin. The model was adequate in assessing the position of sites on BSA and HSA for here tested ligands, allowing even observe the dynamic localization of ligands within the protein molecule with the increase of its concentration.

Keywords: Modeling. Binding sites. Espectrofluorescence. Albumins.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Processo de modelagem matemática.....	18
Figura 2 -	Diagrama completo das atividades na modelagem matemática.....	24
Figura 3 -	Diagrama de Jablonski.....	28
Figura 4 -	Estrutura química dos três aminoácidos fluorescentes.....	34
Figura 5 -	Representação dos arcabouços protéicos das albuminas do soro bovino (BSA) e humano (HSA), destacando a localização dos resíduos de triptofanos.....	39
Figura 6 -	Representação esquemática do registro da fluorescência da BSA. Os dois triptofanos, $T_1$ e $T_2$ , emitem radiação fluorescente, e a parte que atravessa a fenda é registrada pelo espectrofluorímetro.....	44
Figura 7 -	Representação esquemática do registro da supressão da fluorescência da BSA devida à presença do supressor (Q).....	46
Figura 8 -	Representação dos arcabouços protéicos das albuminas do soro bovino (BSA) e humano (HSA), destacando a localização dos resíduos de triptofanos.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estrutura primária das albuminas séricas bovina (BSA) e humana (HSA) - Número de aminoácidos .....	37
Tabela 2 –	Constantes de ligação de substâncias endógenas à albumina sérica humana.....	39
Tabela 3 -	Média da razão das distâncias, valores máximos e mínimos e variância, para os fármacos e pesticidas estudados.....	59

## LISTA DE SÍMBOLOS

Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Phe	Fenilalanina
Alb	Albumina
BSA	Bovineserumalbumin (albumina de soro bovino)
HSA	Humanserumalbumin (albumina de soro humano)
F	Intensidade de fluorescência na presença do supressor
$F_0$	Intensidade de fluorescência na ausência do supressor
r	Distância do sítio de ligação do supressor na albumina ao triptofano
PA	Progressão Aritmética
Q	Quenching (supressão) da fluorescência
$R_0$	Distância Förster em transferência de energia de ressonância
$\tau_D$	Tempo de difusão em espectroscopia de correlação de fluorescência
$k_S$	Constante de Stern Volmer
$k_q$	Constante de velocidade biomolecular de supressão
$\tau_0$	Tempo de vida médio das biomoléculas na ausência de supressor ( $10^{-8}$ s)
[Q]	Concentração do supressor
c	Concentração em mols por litro
$\sigma$	Coefficiente de absorção/ extinção molar
n	Números de moléculas por $\text{cm}^3$
I	Intensidade da luz transmitida
$I_0$	Intensidade da luz incidente
$\varepsilon$	Coefficiente de decaimento molar ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
$f(t)$	Função de excitação constante
$\gamma$	Taxa de decaimento do fluoróforo na ausência do supressor
$\tau_0$	Meia vida
$\Gamma$	Taxa radioativa
$k_{nr}$	Taxa de decaimento não-radioativo
$k_q[Q]$	Taxa de decaimento adicional
nm	Nanômetros
$\alpha$	Fração da fluorescência da BSA emitida pelo $T_1$

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>MODELAGEM MATEMÁTICA E COMPUTACIONAL</b> .....	17
1.1	<b>Aspectos da modelagem matemática</b> .....	18
1.2	<b>Formas de representação de um modelo matemático</b> .....	19
1.3	<b>Classificação dos modelos matemáticos</b> .....	20
1.3.1	<u>Tipos de modelos matemáticos segundo a realidade ou laboratório</u> .....	20
1.3.2	<u>Tipos de modelos matemáticos segundo a evolução temporal do sistema</u> .....	20
1.3.3	<u>Tipos de modelos matemáticos segundo a abordagem matemática</u> .....	21
1.3.4	<u>Tipos de modelos matemáticos segundo a sua estrutura da predição</u> .....	22
1.3.5	<u>Tipos de modelos matemáticos segundo a sua representação</u> .....	22
1.3.6	<u>Tipos de modelos matemáticos segundo a função afim</u> .....	23
1.4	<b>Processo de modelagem passo-a-passo</b> .....	24
2	<b>FLUORESCÊNCIA MOLECULAR</b> .....	27
2.1	<b>O fenômeno da fluorescência</b> .....	27
2.2	<b>A espectroscopia de fluorescência</b> .....	29
2.2.1	<u>A supressão da fluorescência</u> .....	30
2.2.2	<u>A equação e a constante de Stern Volmer – constante biomolecular</u> .....	31
2.3	<b>Fluorescência das proteínas</b> .....	33
3	<b>ESPECTROSCOPIA DE ALBUMINAS SÉRICAS</b> .....	36
3.1	<b>Albumina sérica humana - HSA</b> .....	36
3.2	<b>Albumina sérica bovina – BSA</b> .....	40
3.3	<b>Sítios de ligação nas albuminas</b> .....	40
3.4	<b>Fluorescência e sua supressão nas albuminas</b> .....	42
4	<b>DESCRIÇÃO DO MODELO</b> .....	44
4.1	<b>Triptofanos e a emissão de fluorescência da proteína</b> .....	44
4.2	<b>Triptofanos e a supressão da fluorescência das albuminas</b> .....	46
4.3	<b>Distância entre os Trps e os sítios de ligação</b> .....	49
5	<b>RESULTADOS</b> .....	54
5.1	<b>Interpretando o comportamento do modelo</b> .....	54

5.2	<b>Aplicações do modelo</b> .....	56
5.2.1	<u>A razão <math>r_1/r_2</math> para drogas antipsicóticas avaliadas</u> .....	58
5.2.2	<u>A razão <math>r_1 / r_2</math> para os pesticidas avaliados</u> .....	60
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	61
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	65
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66

## INTRODUÇÃO

A interpretação de dados e informações oriundas da experimentação e suas correlações torna-se uma tarefa difícil e pode gerar um grande número de hipóteses plausíveis para explicar um fenômeno sob observação, dificultando qualquer extrapolação para se obter conclusões que possam levar ao entendimento do comportamento do sistema em estudo [CARREJO e MARSHALL, 2007].

A Modelagem Matemática e Computacional surge como ferramenta capaz de auxiliar a interpretação de problemas de forma interdisciplinar, pois permite expressá-los de maneiras diversas, como por exemplo, por meio de expressões matemáticas, gráficos, ilustrações e algoritmos [MELNIK, 2015]. De posse de um modelo matemático capaz de representar o fenômeno ou o sistema, simulações variadas podem ser conduzidas para a observação do seu comportamento, testando hipóteses e verificando suas respostas diante de variações individuais dos seus parâmetros [PINTO et al., 2014; CARDOSO et al., 2008; VELARDE, 2002]. O objetivo final da maioria dos esforços de modelagem é obter uma descrição totalmente previsível para o sistema modelado [MELNIK 2015, INGALLS 2012].

Os sistemas biológicos, em particular, têm encontrado na modelagem matemática computacional um caminho para elucidação de muitos dos seus fenômenos impossíveis de entendimento e previsão através de outros meios [FRAGOSO 2015; CORTEZ e BISCH et al. 2005; SABCHEs e JAFELICE 2004; DINIZ e SANTOS 1997, MEYER et al. 1997].

No campo da Farmacologia e toxicologia, a modelagem e a simulação computacional são ferramentas úteis para melhorar a eficiência no desenvolvimento de fármacos eficazes, bem como determinar os efeitos tóxicos e o limite de toxicidade de substâncias exógenas de uma forma geral. No caso do desenvolvimento de novos medicamentos, que é um processo demorado e dispendioso financeiramente, a modelagem e simulação computacional têm contribuído muito para diminuir a trajetória da investigação experimental, visando à redução de custos e maior precisão nos resultados.

Todo o entendimento dos efeitos terapêuticos e tóxicos de substâncias exógenas, também chamadas de xenobióticos, é baseado nos conhecimentos que compõem as duas áreas da farmacologia: a farmacodinâmica e a farmacocinética. A

primeira estuda os efeitos farmacológicos e tóxicos da droga ou do xenobiótico, enquanto a segunda diz respeito à cinética do exógeno no organismo, e descreve a sua evolução no tempo dentro do corpo. A farmacocinética estuda o destino dos fármacos e xenobióticos no organismo após sua administração, abrangendo os processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção, incluindo, portanto, o estudo da interação das substâncias com as proteínas plasmáticas. Estes parâmetros são identificados como intimamente associados à duração e à intensidade dos efeitos farmacológicos e toxicológicos das drogas [KATZUNG et al., 2011].

Sabe-se que a maioria dos fármacos e xenobióticos pode se ligar mais ou menos especificamente às proteínas do plasma, e essa fração ligada depende especialmente da (1) concentração total da substância no sangue, (2) da sua afinidade com o sítio de ligação da proteína e (3) do número de sítios disponíveis [KRAGH-HANSEN, 1999]. Uma taxa elevada de fármaco ligado a proteínas plasmáticas reduz a sua concentração nos tecidos (em geral, local da ação terapêutica), bem como a velocidade de sua eliminação pelo rim, influenciando diretamente a sua distribuição no corpo e a absorção pelos tecidos e eliminação [KATZUNG et al., 2011, BENET et al., 1996]. Dessa forma, a determinação de sítios de ligação e graus de afinidade das drogas com a albumina se torna especialmente importante, bem como a verificação da competição local por diferentes drogas, já que essa proteína representa 50 a 60% do total das proteínas plasmáticas e participa na maioria das ligações de substâncias no soro, junto com as  $\alpha$  1-ácido-glicoproteínas [BERTUCCI e DOMENICI, 2002; KRAGH-HANSEN, 1981].

As albuminas, em geral, emitem fluorescência, e a interação de ligantes com essas proteínas pode diminuir a intensidade dessa emissão, sendo este processo denominado de supressão da fluorescência e o ligante funciona como supressor [CORTEZ et al., 2012, FRAGOSO et al., 2012, SILVA et al., 2004a; 2004b; 2004c].

A técnica da supressão da fluorescência pode ser expressa matematicamente utilizando a equação de Stern-Volmer (SV) e fornece informação considerável sobre as características da interação do ligante com a proteína [LAKOWICZ, 2001]. CORTEZ e colaboradores (2012) têm sugerido que o confronto dos dados da supressão de fluorescência da BSA com os da HSA pode fornecer muita informação, inclusive dar uma indicação da posição relativa dos sítios de ligação

para vários ligantes, uma vez que as sequências de aminoácidos dessas duas proteínas foram conservadas ao longo da evolução e são bem conhecidas.

Na atualidade, há um grande interesse na localização de sítios de ligação nas albuminas para fármacos, devida à aplicabilidade desse dado na pesquisa em Farmacologia Computacional (ou *in silico*). Nesta se estuda em detalhe os grupos responsáveis pela interação de duas moléculas, desde a sua identificação até o entendimento dos processos atômicos e moleculares que participam na interação [BELINSKAIA et al., 2014, EKINS, 2007]. Os métodos *in silico*, que visam a criação de modelos e a testagem destes, têm primariamente como base dados gerados através de métodos de pesquisa biológica experimentais, *in vitro* e *in vivo*. Tais modelos podem então ser aplicados na descoberta e otimização de novas moléculas com afinidade para um alvo ou objetivo específico, para caracterização físico-química destas, bem como para elucidação de suas propriedades em geral [EKINS, 2007].

Dentre os métodos experimentais que podem ser empregados no estudo de sítios de ligação para ligantes em proteínas podemos citar: diálise de equilíbrio [PLUM et al., 2013], difração de raios-x [PETITPAS et al., 2001], espectroscopia por ressonância magnética [BARTUSIK et al., 2011], fluorescência resolvida no tempo [TIAN et al., 2009]. A maioria desses métodos depende de equipamentos caros, técnicas sofisticadas no preparo de material para a análise e, muitas vezes, de longa experiência na interpretação de resultados. Dessa forma, o desenvolvimento de um modelo matemático-computacional que permita avaliar a posição relativa de sítios de ligação para fármacos na albumina sérica, baseado na espectroscopia de fluorescência, assume um papel de extrema importância devido ao baixo custo e à alta sensibilidade, à eficiência e simplicidade desse método experimental.

Neste trabalho, apresentamos os resultados de um modelo matemático desenvolvido para estimar a posição relativa de sítios de ligação para ligantes em albuminas séricas, baseado na teoria de supressão de fluorescência, mais precisamente nas diferenças e semelhanças espectrofluorimétrica existentes entre a albumina sérica humana (HSA) e a bovina (BSA). A modelagem computacional foi aplicada para testar e validar o modelo, utilizando conjuntos de dados experimentais relacionados à interação de alguns fármacos (clorpromazina, risperidona e haloperidol) e pesticidas (metilparation e glifosato) com HSA e BSA.

O presente trabalho foi estruturado em sete capítulos. Os três primeiros, apresentam revisões da literatura sobre assuntos pertinentes ao tema de estudo. No Capítulo 1, uma breve revisão sobre modelagem matemática e computacional é feita, focando suas aplicações e métodos. No Capítulo 2 e no Capítulo 3, são apresentados, respectivamente, alguns aspectos relevantes do fenômeno de fluorescência molecular e das albuminas. No Capítulo 4 é feita a descrição do modelo matemático proposto.

O quinto capítulo apresenta os resultados obtidos com a simulação e teste realizados para análise do comportamento do modelo e sua aplicação para determinação da localização de sítios nas albuminas para três fármacos e dois pesticidas. No sexto capítulo, Discussão, todos os resultados são discutidos à luz dos conhecimentos da literatura utilizada, tecendo-se comparações com resultados obtidos por outros autores. O último capítulo, Conclusão, resume os resultados e finaliza unindo as ideias apresentadas no corpo do trabalho.

### **Objetivo do Estudo:**

Descrever um modelo matemático desenvolvido para estimar a posição relativa de sítios de ligação para ligantes em albuminas séricas, com base na teoria de supressão de fluorescência. A modelagem computacional foi aplicada para testar o modelo, utilizando conjuntos de dados experimentais relacionados à interação de alguns fármacos (como a risperidona, a clorpromazina e o haloperidol) e pesticidas (metilparation e glifosato) com HSA e BSA.

## 1 MODELAGEM MATEMÁTICA E COMPUTACIONAL

Atualmente, grande parte dos problemas mais complexos a serem resolvidos necessita de conhecimentos em áreas distintas, como matemática, neurociência, ecologia, física, engenharia, medicina, fisiologia, psicologia, arte, moda, entre outras. Embora oriundos de áreas distintas, os problemas podem ser inter-relacionados e resolvidos por meio de métodos matemáticos e computacionais [GERHARD e DA ROCHA FILHO, 2012]. A interdisciplinaridade é fundamental para este fim. O enfoque do nosso trabalho situa-se nas áreas de Matemática e de Biologia, inserido na linha de pesquisa de nosso interesse, que é a Biomatemática.

A Biomatemática é fruto da junção de áreas teoricamente distintas em sua totalidade, mas que, na verdade, possuem uma interseção não vazia, ou seja, na linguagem matemática, podemos dizer que não são conjuntos disjuntos. Esta “jovem” ciência se articula por meio de métodos matemáticos e visa entender, formular, analisar, problemas com enfoque biológico [IGALLS, 2012, SANCHES E JAFELICE, 2004; DINIZ, 2014; DINIZ et al., 1997; MEYER, et al. 1997].

Como outras linguagens, a essência da matemática é a forma que nos permite expressar, comunicar e explicar sobre ideias e, especialmente, ideias sobre nosso mundo. O propósito da modelagem matemática é habilitar as pessoas a aprender sobre o mundo formando figuras mentais de como ele funciona, visando a criação de modelos que permitam a compreensão deste funcionamento e também a sua melhora. A modelagem requer a participação ativa do indivíduo - pensando, trabalhando com seu sistema de computação algébrica, com lápis e papel como à moda antiga, explorando o mundo e trocando ideias com outras pessoas. A matemática é uma linguagem que ajuda à descrição e compreensão do mundo e a Modelagem Matemática permite “falar sobre” o mundo real, discutir os seus fenômenos à luz da Matemática [MELNIK 2015, DALLA VECCHIA e MALTEMPI 2012, CARREJO et al. 2007, HILLEL 2001].

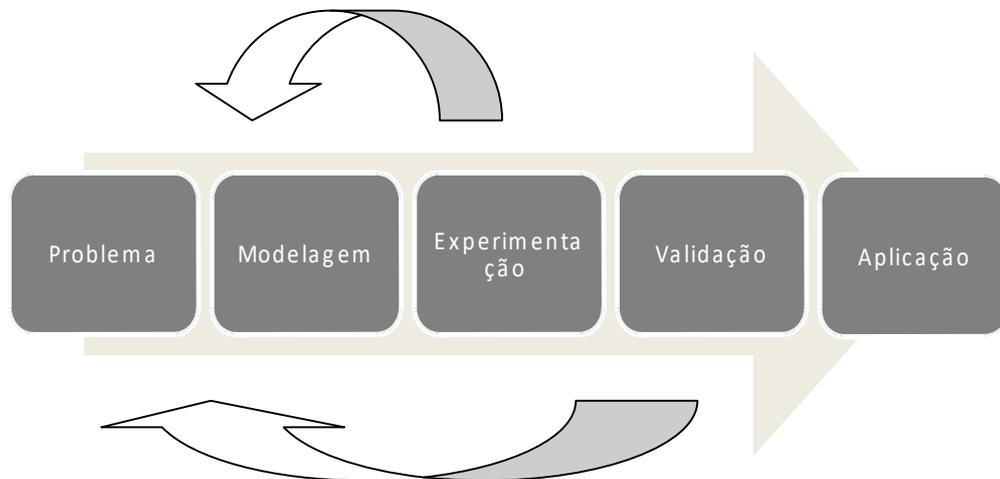
A modelação matemática consiste no estabelecimento de um conjunto de ferramentas matemáticas que permite fazer uma análise teórica de uma situação dada. A modelação é a essência da ciência, visando a compreensão do mundo em que vivemos [MELNIK 2015].

## 1.1 Aspectos da Modelagem Matemática

Quando nos referimos à modelagem, estamos tratando de uma idealização que admite uma série de simplificações do problema real estudado. Essas simplificações permitem o estudo do problema real, possibilitando a busca de sua solução. Ao construir um modelo matemático, estamos identificando variáveis e interpretando-as quantitativamente. Com o modelo já elaborado segue-se, em geral, para as etapas de teste e de validação. Estas envolvem uma avaliação dos resultados obtidos a partir das simplificações, seguindo processos de verificação/ajustes para que o modelo atenda à realidade do problema, na medida do possível [Melnik 2015].

A Figura 1.1 retrata de uma forma generalizada, o fluxo do processo de modelagem matemático/computacional de um problema. As setas, no sentido da direita para a esquerda representam a remodelagem ou correção de alguma etapa do modelo proposto [MOTTA e NEVES, 2015].

Figura 1 - Processo de modelagem matemática



Sumarizando, a **modelagem** é o processo de escolha das variáveis essenciais e transformação da linguagem “natural” para a linguagem matemática e/ou computacional, dando origem ao modelo matemático, com as simplificações do problema em foco [MELNIK 2015]. A **experimentação** é a obtenção de dados experimentais ou empíricos que ajudam à compreensão e à adaptação do problema. É um processo laboratorial e, em alguns casos, estatístico. Em seguida, vem a etapa

de **validação**, pela comparação dos resultados obtidos com os dados reais, esta envolve a resolução do modelo matemático e computacional proposto. Ao final desta etapa, obtem-se um conjunto de expressões e fórmulas, ou equações algébricas, gráficos, representações ou programa computacional que pode representar ou resolver o problema. Caso o modelo não forneça uma resposta adequada, a modelagem deve ser revisada. Por último, a **aplicação** acontece após a elaboração de um modelo eficiente, quando esse modelo deve explicar a realidade ligada ao problema e viabilizar tomada de decisões [Carrejo e Marshall 2007].

## 1.2 Formas de Representação de um Modelo Matemático

Há várias formas de representar um modelo matemático. Como dito acima, ele pode ser expresso por meio de equações matemáticas, tabelas, gráficos, representações, programas computacionais etc [CARREJO e MARSHALL 2007].

A **equação matemática** é a forma mais comum de representar um modelo, podendo os gráficos do modelo serem gerados a partir dessa equação. As equações que expressam modelos podem ser: (1) **algébricas**, quando as relações são representadas somente por operações algébricas; (2) **diferenciais**, se as relações são representadas por operações algébricas e diferenciais; ou (3) **integrais**, quando as relações são representadas por operações algébricas e integrais. Essas equações ainda podem ser classificadas em: lineares ou não lineares, ordinárias ou parciais, determinísticas ou estocásticas, variantes ou invariantes no tempo, contínuas ou discretas no tempo, de acordo com os princípios aplicados na classificação dos sistemas.

A representação em **tabelas** resulta, em geral, da dificuldade de extrair relações algébricas entre os dados do sistema analisado. Isto é comum em caso de sistemas não lineares, com mais de duas dimensões. A **representação gráfica** costuma ser muito ilustrativa e facilita a compreensão da estrutura dos sistemas, podendo aparecer sob a forma de: gráfico da função, diagramas de Blocos, diagramas de Fluxo de Sinal, diagrama de ligação etc. [CARREJO e MARSHALL 2007].

### 1.3 Classificação dos Modelos Matemáticos

Naturalmente, os métodos de classificação dos modelos são complementares, pois muitos deles se enquadram em mais de um tipo dos descritos abaixo e, por isso, precisam ser classificados com base em mais de um desses critérios. Por exemplo, um modelo de movimento planetário baseado em equações diferenciais é classificado como modelo dinâmico contínuo empírico e determinístico.

#### 1.3.1 Tipos de Modelos Matemáticos segundo a Realidade ou Laboratório

Os modelos podem ser criados com base em três diferentes realidades ou laboratórios. Podemos falar em laboratório baseado na **realidade real**, laboratórios baseados em **realidade virtual** ou simulação e laboratórios baseados em pensamentos (*gedanken*) ou **realidade mental**. A **realidade "real"** é a base para todo nosso trabalho, porque diz respeito ao mundo real em que vivemos. A **realidade virtual** relaciona-se com as simulações de todas as formas, que podem ter movimento, som etc, mas são abstrações induzidas como realidade, e nem sempre são reproduzíveis no mundo real. Na **realidade mental**, os modelos são construídos na mente, sendo a única forma para pensarmos o nosso mundo. (FUCHS et al. 2011; BENDER, 2000]

#### 1.3.2 Tipos de Modelos Matemáticos segundo a Evolução Temporal do Sistema

Quanto ao comportamento temporal das variáveis, os modelos podem ser classificados em estático (também chamado de autônomo) ou dinâmico [BENDER, 2000; WYMORE, 1993].

**Modelo estático** ou **autônomo** refere-se a sistemas que não evoluem no tempo, e as variáveis da sua descrição não mudam com o tempo. O **modelo dinâmico** ou **não-autônomo** representa um sistema que evolui explicitamente no tempo e é baseado em variáveis dependentes do tempo. Em alguns casos, um sistema estático pode passar à dinâmico por uma mudança de variáveis. Modelos dinâmicos são tipicamente representados por equações diferenciais.

De acordo com a forma como as variáveis do problema modelado evoluem no tempo, os modelos dinâmicos podem ser contínuos, discretos ou intermitentes. Os **modelos dinâmicos contínuos** no tempo são descritos por equações diferenciais evolutivas, com variação temporal, e representam a evolução do sistema continuamente no tempo. Os **modelos dinâmicos discretos** no tempo representam a evolução do sistema em instantes discretos no tempo e são descritos por equações de diferenças. [BENDER, 2000; WYMORE, 1993]

### 1.3.3 Tipos de Modelos Matemáticos segundo a Abordagem Matemática

Os modelos matemáticos são compostos de variáveis (abstrações de parâmetros do sistema de interesse que podem ser quantificados) e operadores (operadores algébricos, diferenciais, funções etc.) que atuam nas variáveis. Os modelos matemáticos podem ser separados em classes segundo critérios que variam em função de diversos fatores, desde aqueles relacionados com o sistema modelado até a capacidade de predição do modelo.

De acordo com a abordagem matemática do problema, da representação e resultados, os modelos podem ser classificados em analítico analógico, conceitual ou descritivo, mecanístico (lógico) ou empírico [LAW, 2007; Bender, 2000; WYMORE, 1993].

O **modelo matemático analítico** é a representação matemática de um sistema feita através de métodos analíticos, assumindo várias condições de simplificação. Já o **modelo matemático analógico** é constituído através de analogias que aproximam o modelo do sistema real. Um exemplo de modelo matemático analógico é a representação matemática que faz analogia entre um sistema biológico com um circuito elétrico. [BENDER, 2000; WYMORE, 1993].

No **modelo matemático conceitual**, parte ou totalidade do processo modelado é representada de forma simplificada por um conjunto de conceitos expressos em linguagem matemática, que são ligados por uma sequência espaço-temporal correspondente àquela que se observa no sistema real. Já no **modelo descritivo**, o problema é descrito sem especificar as relações de forma numérica [DeCANIO, 2005].

Os **modelos lógicos ou mecânicos** levam em conta os mecanismos através dos quais as mudanças no sistema ocorrem. Dessa forma, eles usam uma grande quantidade de informações teóricas e geralmente descrevem o que acontece em um nível da hierarquia, pela consideração de processos que ocorrem nos níveis abaixo deste. Já nos **modelos empíricos**, nenhuma consideração é feita com relação aos mecanismos implicados nas mudanças. Estas são apenas notadas, e o modelo se restringe a descrever quantitativamente as mudanças associadas com diferentes condições. [MORRIS et al. 2013]

#### 1.3.4 Tipos de Modelos Segundo a sua Estrutura da Predição

Com relação à *reprodutibilidade* ou certeza e a *estrutura da predição*, o modelo pode ser determinístico, estocástico ou de otimização. Nos **modelos determinísticos**, os resultados são obtidos a partir das condições iniciais, sem recorrer a elementos probabilísticos. Inversamente, nos **modelos não determinísticos ou probabilísticos**, o valor de cada variável é dado em uma base probabilística e o sistema é classificado como aleatório. Estes modelos também são chamados de **estocásticos**, porque apresenta uma distribuição de soluções associadas a uma probabilidade. Já o **modelo de otimização** estuda o comportamento de protótipos que não são completamente determinados inicialmente, tendo um critério de ótimo da função objetivo, ou de mérito como um elemento guia, e relações de desigualdade que podem levar a mais de uma solução, se não houver restrições apropriadas. [LIN et al. 2012]

#### 1.3.5 Tipos de Modelos Matemáticos Segundo a sua Representação

Com relação ao *tipo de representação matemática* o modelo pode ser linear ou não-linear, explícito ou implícito, paramétrico ou não-paramétrico, modelo de simulação e modelos numérico e computacional.

Todo operador em um modelo matemático exhibe linearidade ou não linearidade; assim, os modelos são definidos, respectivamente, como **modelo linear** e **não-linear**. Em um modelo de programação matemática, se as funções-

objetivos e as restrições são representadas inteiramente por equações lineares, então o modelo é considerado um modelo linear. Uma aproximação comum para problemas não lineares é a linearização. [BENDER, 2000]

Nos **modelos explícitos** todos os parâmetros de entrada do modelo, como um todo, são conhecidos e os parâmetros de saída podem ser calculados por séries finitas de computações (conhecida como programação linear, não confundir com linearidade descrita acima), já nos **modelos implícitos**, os parâmetros de saída são conhecidos e as saídas correspondentes devem ser resolvidas pela solução de um procedimento iterativo. [FUCHS et al. 2011]

De acordo com a parametrização, há modelos paramétricos e não paramétricos. Os **modelos paramétricos** são definidos em termos de parâmetros que os caracterizam, podendo ser fixos ou modificados (ou adaptado) no processo de modelagem. A estimação dos parâmetros depende de métodos que identifiquem o sistema. Quando a dinâmica do sistema é representada graficamente em vez de matematicamente, como uma função de transferência, tem-se um **modelo não-paramétrico**. [ZHAO, 2008]

### 1.3.6 Tipos de Modelos Matemáticos Segundo a Função Afim.

Com relação à função afim, os modelos podem ainda ser classificados como: modelos numéricos, modelos de simulação ou modelos computacionais [BENDER, 2000].

O **modelo numérico** é a representação discretizada de um sistema ou problema que é feita de forma iterativa usando um computador, sendo menos dependente de simplificações, e permite a representação de diferentes propriedades do sistema. O **modelo de simulação** é um modelo dinâmico que representa a estrutura e o funcionamento de um determinado sistema, explorando as relações entre as suas características e propriedades, a partir das hipóteses ou pressupostos.

Finalmente, o **modelo computacional** é aquele que faz a tradução dos modelos matemáticos ou lógicos para a linguagem computacional. Como princípio fundamental todo modelo computacional é um modelo lógico, pois o fundamento de um computador é a lógica binária. As linguagens e os *software* disponíveis permitem uma tradução automática e transparente aos olhos dos usuários. O desenvolvimento

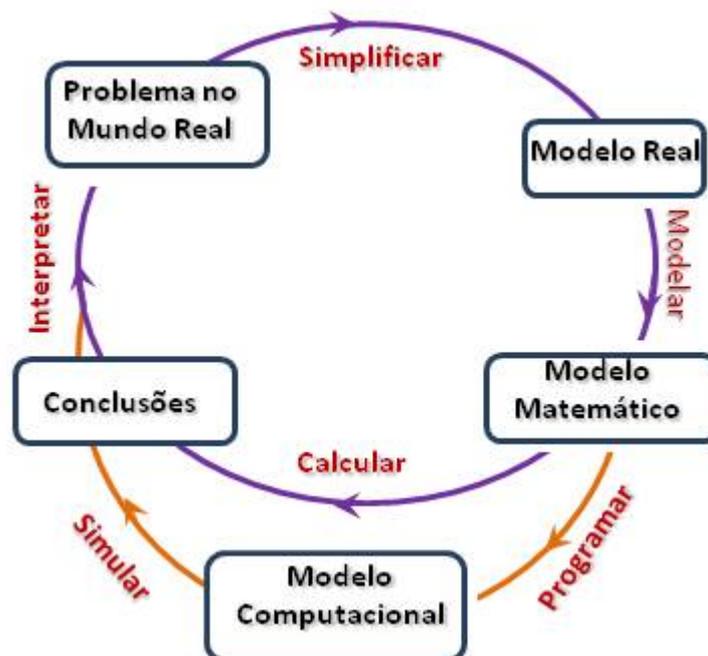
da computação (*software* e *hardware*) ampliou a utilização de modelos matemáticos, visto que eles geralmente necessitam ser implementados para obter a simulação.

Importante ainda considerar que as divisões determinístico/estocástica, mecanístico/empírica, estático/dinâmico e discreto/contínuo representam extremos de escalas de tipos de modelos. Entre cada uma delas há um espectro de tipos de modelos.

#### 1.4 Processo de Modelagem Passo-a-passo

O esquema da Figura 1.2 mostra passo a passo as atividades que compõem a modelagem matemática e computacional, desde a identificação do problema até a simulação [MAKI e THOMPSON, 2014]. Observe a comunicação em duplo sentido, representando o fluxo de informação relevante entre os nós e as fontes de informação correspondentes. Os nós representam a fonte da informação que será coletada, classificada, avaliada e organizada.

Figura 2 - Diagrama completo das atividades na modelagem matemática



Fonte: MAKI; THOMPSON, 2014

O primeiro passo para a modelagem é a *identificação do problema*, que começa, como mostra a Figura 1.2, com um problema do **mundo real**, algumas vezes, em condições relativamente controladas de um laboratório e, em outras, em ambiente muito menos compreensível. Pela análise dos resultados, que podem ser produto da intuição ou, mais frequentemente, da observação e levantamento de dados, uma seleção dos dados relevantes é feita para o entendimento do fenômeno ou sistema a ser modelado. O objetivo é a coleta e organização de informação para a construção do modelo.

O passo seguinte é a tentativa para definir o problema o mais precisamente quanto possível. Um importante aspecto desta etapa é a identificação e a seleção dos conceitos a serem considerados como básicos no estudo, e defini-los cuidadosamente. Isto envolve fazer certas idealizações e aproximações, eliminando as informações desnecessárias para simplificar os dados, de forma a construir o **modelo real**. Neste, o contexto ainda se encontra associado ao mundo real, os componentes do problema ainda preservam suas formas, denominações (animais, aparelhos, pessoas, plantas...) ou funções, mas o modelo não incorpora todas as características da situação original.

O terceiro passo é usualmente muito menos definido e frequentemente envolve um alto grau de criatividade, pois é a etapa mais complexa e desafiadora. Nesta se dá a tradução da situação-problema para a linguagem matemática e/ou computacional, sendo o alvo, então, a expressão da situação inteira em termos simbólicos. Aqui, o modelo real torna-se um **modelo matemático**, no qual as quantidades reais e processos são substituídos por símbolos matemáticos e relações (conjuntos, funções, equações etc.) e operações matemáticas, identificando as variáveis independentes e as interdependências.

O modelo matemático estabelecido vai exigir a construção de algoritmos e a seleção de métodos numéricos com a escolha de *softwares*, bibliotecas de *softwares* e a construção de **programas** que constituirão o **modelo computacional**, que será usado nas simulações e cálculos para a testagem do modelo matemático, visando a validação deste e as conclusões.

O passo final no processo de construção do modelo é a comparação dos resultados previstos com base no trabalho matemático com o mundo real. Para isto, identifica-se as restrições, define-se os alvos e as prioridades, procurando também

indicadores que possam ser usados como critérios para testar a qualidade do modelo.

A existência de qualquer relação inapropriada entre o mundo real e o modelo matemático deve ser identificada. A situação desejada é que o conjunto de conclusões da teoria matemática contenha algo que pareça concordar e algo que pareça discordar com os resultados oriundos de experimentos. Neste caso, deve-se novamente examinar todos os passos do processo. Deve-se enfatizar que pode haver vários modelos matemáticos para uma mesma situação, pois isto depende do observador e do objetivo da modelagem. Da mesma forma, não há o “melhor modelo”, o único a ser usado ou o mais preciso. O resultado do estudo matemático são teoremas, do ponto de vista matemático, e previsões, do ponto de vista empírico. A motivação para a modelagem não é produzir uma “nova” matemática, isto é, novas ideias abstratas ou novos teoremas, embora isto possa acontecer, mas sim produzir novas informações sobre a situação em estudo. [MAKI e THOMPSON, 2014]

## 2 FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

### 2.1 O Fenômeno da Fluorescência

A luminescência molecular é formalmente dividida em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo. A fluorescência, que é o fenômeno de interesse neste trabalho, é a capacidade de uma substância de emitir luz se exposta a radiações específicas: ultravioleta (UV), raios X ou raios catódicos [LAKOWICZ, 2006].

Na fluorescência, moléculas de uma substância química no estado fundamental são excitadas e alcançam níveis mais altos de energia, sendo a fluorescência observada, o resultado da emissão que resulta dos seus retornos ao estado de energia mais baixa, o estado fundamental. Assim, a radiação fluorescente emitida tem comprimento de onda maior do que a radiação incidente, que é a excitante, e a fluorescência pode ocorrer dentro da faixa da luz visível aos olhos humanos ou na faixa invisível, do ultravioleta [LAKOWICZ, 2006]. Neste caso, a fluorescência pode ser evidenciada através técnicas específicas, usando equipamento de fluorimetria (técnica de registro direto) ou técnicas especiais de captação de fluorescência [BAGAL-KESTWAL *et al.* 2015, LAKOWICZ, 1999].

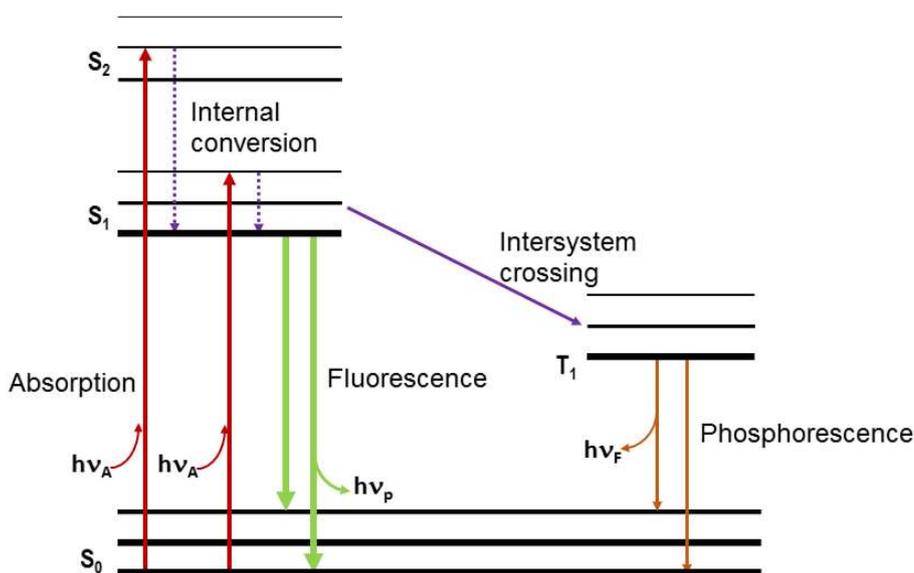
A fluorimetria engloba um conjunto de técnicas analíticas baseadas na detecção dos fótons emitidos por moléculas excitadas de caráter singleto (os elétrons apresentam spins anti-paralelos) quando estas retornam para o estado fundamental, e a espectrofluorimetria se baseia no registro espectroscópico desse tipo de emissão, que é representado por um espectro de fluorescência, que mostra a intensidade luminosa para cada comprimento de onda da luz emitida. [LAKOWICZ, 1999]

A emissão de fluorescência de uma substância quando em solução é influenciada por diversos fatores. A temperatura, o pH, o solvente e a presença de outras espécies químicas podem ter um profundo efeito nas características luminescentes da substância, afetando diretamente a velocidade de emissão, bem

como a natureza e a energia relativa do estado excitado de menor energia [SCHULMAN, 1977].

A fluorescência envolve as transições de estado e a Figura 2.1 mostra um esquema representativo do diagrama de Jablonski, que foi o modelo proposto por Aleksander Jablonski na década de 1930, e expressa de forma simplificada tanto o processo de fluorescência quanto o de fosforescência.

Figura 2.1 - Diagrama de Jablonski  $S_0$ - Estado fundamental,  $S_1$ -Estado singlete excitado 1,  $S_2$ -Estado singlete excitado 2 e  $T_1$ -Estado tripleto excitado 1 [LAKOWICZ, 1999].



No diagrama, as linhas verticais representam as transições entre os estados eletrônicos, ilustrando a sua natureza instantânea, da ordem de  $10^{-15}$  s. Os estados eletrônicos singletos estão representados por  $S_0$ ,  $S_1$  e  $S_2$ . Em cada um desses estados, há níveis energéticos vibracionais: 0, 1, 2 etc, aonde o fluoróforo pode estar. Devida a incidência e absorção de luz, a substância luminescente fica excitada e passa a vibrar em níveis energéticos mais altos,  $S_1$  ou  $S_2$ . Salvo raras exceções, as moléculas no estado condensado relaxam rapidamente para o nível vibracional mais baixo de  $S_1$ , em um processo denominado de conversão interna, que ocorre em um tempo menor que  $10^{-12}$  s. [LAKOWICZ, 2006]

Na fluorescência, os elétrons nos estados singlete (estado em que os spins eletrônicos são essencialmente paralelos)  $S_1$  retornam rapidamente para o  $S_0$  através da emissão de um fóton, com tempo de vida fluorescente de  $10^{-8}$  s [EISBERG

e ROBERT, 1986]. Já na fosforescência, ocorre uma conversão interna na molécula do estado  $S_1$  para o primeiro estado de spin tripleto<sup>1</sup>  $T_1$  (no qual os spins eletrônicos são essencialmente anti-paralelos), seguindo um decaimento para o estado singlete fundamental. Esta transição envolve taxas de emissão pequenas e os tempos de vida são longos, da ordem de milisegundos a segundos [LAKOWICZ, 2006].

## 2.2 A espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência constitui um método poderoso para investigação das propriedades dinâmicas de soluções de interesse biológico [FRAGOSO et al. 2015; CORTEZ et al., 2012; SILVA et al., 2010; 2004(a)].

Uma variedade de moléculas biológicas apresenta fluorescência intrínseca, devida a presença de fluoróforo(s) em sua constituição. Nas proteínas, por exemplo, o triptofano (Trp) é o aminoácido de maior fluorescência, sendo os resíduos deste aminoácido responsáveis por cerca de 90% da fluorescência total das proteínas. A tirosina (Tyr) emite radiação fluorescente de alta intensidade quando pura em solução, mas a emissão dos seus resíduos nas proteínas é bem mais fraca do que a do Trp. A desnaturação de proteínas em geral resulta em aumento da emissão da Tyr [LAKOWICZ, 2006; SOUZA *et al.* 2000].

Uma técnica de espectroscopia de fluorescência que tem sido muito explorada em áreas da Biologia e Biomédicas é a técnica da **supressão de fluorescência**. Esta se baseia na supressão ou diminuição da intensidade da fluorescência emitida por uma substância fluorescente em solução quando esta interage com uma outra substância adicionada à mesma solução.

Esta técnica tem auxiliado muito na farmacologia e na toxicologia, principalmente em estudos farmacocinéticos, investigando especialmente a interação de drogas, pesticidas e outros xenobióticos com as proteínas plasmáticas e outras proteínas. Uma série de informações referentes à interação molecular podem ser determinadas, entre elas: a constante de supressão e associação, a formação de complexo, a competição por sítio de ligação e natureza e o número de

---

<sup>1</sup>Um tripleto de spin é um conjunto de três estados quânticos em um sistema

sítios primários de ligação [FRAGOSO et al. 2015, SIMMONS et al. 2014, ARNOLD et al. 2012, CORTEZ et al. 2012, SILVA et al. 2010a, 2010b, SILVA et al. 2004a, 2004b], que contribuem para a formação do perfil farmacocinético da substância em estudo.

### 2.2.1 A Supressão da Fluorescência

A supressão pode ocorrer por diferentes mecanismos. Dentre os vários processos moleculares capazes de gerar a supressão da fluorescência, podemos citar: reações de estados excitados, transferência de energia, formação de complexo e a supressão por colisão [LAKOWICZ, 2006]. De uma forma geral, considera-se a existência de dois tipos básicos de supressão: a supressão por colisão ou dinâmica e a supressão estática.

A **supressão por colisão ou dinâmica** é o resultado da colisão entre o fluoróforo em estado excitado e o supressor, o qual desativa o fluoróforo, sem que haja qualquer reação química, sendo a perda de energia devida a própria colisão.

A **supressão estática** é devida à formação de um complexo no estado fundamental. Neste caso, a intensidade da emissão fluorescente da amostra da substância fluorescente reduz pela sua complexação com o supressor.

Uma forma de distinguir a supressão estática da dinâmica é através do exame criterioso do espectro de absorção do fluoróforo. A supressão colisional só afeta os estados excitados dos fluoróforos e, por isto, nenhuma mudança resultante da supressão será observada no espectro de absorção. Já a formação de complexo frequentemente resulta em perturbação do espectro de absorção do fluoróforo [LAKOWICZ, 2006]. Uma outra forma de determinar o tipo de supressão é pela observação dos valores das constantes de supressão (que serão explicadas a seguir) para diferentes temperaturas.

O aumento da temperatura do meio aumenta os coeficientes de difusão das substâncias em solução, e a supressão dinâmica depende da difusão do supressor através da estrutura da molécula que contém o grupamento fluorescente. Isto implica na facilitação da supressão, com aumento da taxa de supressão. Já a taxa de supressão do tipo estática tende a diminuir com o aumento da temperatura da solução, porque este aumento leva à redução da estabilidade dos complexos.

A teoria da supressão de fluorescência por colisão é descrita pela equação de Stern-Volmer, desta equação pode ser calculada a constante de Stern-Volmer ou de supressão [BHATTACHARYYA *et al.* 1990].

### 2.2.2 A Equação e a Constante de Stern-Volmer - Constante Bimolecular

Considerando que a intensidade da fluorescência observada para um fluoróforo é proporcional à sua concentração no estado excitado,  $[F^*]$ , sob iluminação contínua pode-se admitir que a variação no tempo da população de fluoróforos excitados será nula, ou seja,

$$\frac{d[F^*]}{dt} = 0. \quad (2.1)$$

Na ausência e presença de um supressor, as equações diferenciais que descrevem a variação de  $[F^*]$  no tempo será

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - \gamma[F^*]_0 = 0, \quad (2.2)$$

Onde  $f(t)$  é a função de excitação constante e  $\gamma$  é a taxa de decaimento do fluoróforo na ausência do supressor. Considerando que  $\gamma$  é o inverso do seu tempo de meia vida ( $\tau_0$ ), ou seja,  $\gamma = 1/\tau_0$ . Na ausência de supressão, a população de estados excitados decai com uma taxa de  $\gamma = (\Gamma + k_{nr})$ , onde  $\Gamma$  é a taxa radioativa e  $k_{nr}$  a taxa de decaimento não-radioativo, na presença de um supressor, a uma taxa de decaimento adicional  $k_q[Q]$ . Com a excitação continuada, a população de estados excitados é constante, assim, neste caso, as derivadas podem ser um conjunto nulo.

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - (\gamma + k_q[Q])[F^*] = 0. \quad (2.3)$$

Sendo  $k_q$  a divisão da Eq. 2.3 pela 2.2, temos que

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\gamma + k_q[Q]}{\gamma} = 1 + \frac{k_q}{\gamma}[Q], \quad (2.4)$$

Onde  $F_0$  e  $F$  são as intensidades da fluorescência emitida, respectivamente, na ausência e presença do supressor,  $k_q$  é a constante bimolecular de supressão. A Eq. 2.4 é a equação de Stern-Volmer, que pode ainda ser escrita na forma, considerando que  $\gamma = 1/\tau_0$ :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q\tau_0[Q], \quad (2.5)$$

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q] \quad (2.6)$$

e  $K_S$  pode ser chamada, de uma forma geral, de constante de Stern-Volmer. A Eq. 2.6 é uma equação linear e, portanto,  $K_S$  corresponde ao coeficiente angular do gráfico linear de Stern-Volmer.

Entretanto, o gráfico de Stern-Volmer nem sempre é linear. Um exemplo, é o gráfico de uma proteína nativa mostrando uma significativa curvatura para baixo. Este é característico de proteínas que têm mais de um resíduo de Trp em sua cadeia e, pelo menos, um deles não é acessível ao supressor. Se esta proteína for desdobrada por desnaturação, a supressão aumenta e o gráfico de Stern-Volmer torna-se linear. Outra situação em que a linearidade não é presente é no caso da ocorrência de supressão combinada, isto é, colisional e estática ao mesmo tempo. Neste caso, o gráfico encurva para cima.

A Eq. 2.5 também pode ser deduzida por outro caminho, considerando a relação da fração das moléculas excitadas do total de moléculas do fluoróforo que decai com a emissão. Essa fração ( $F/F_0$ ) é dada pela taxa de decaimento  $\gamma$  e o decaimento total na presença do supressor ( $\gamma + k_q[Q]$ ),

Já que a supressão por colisão é um processo proporcional ao esvaziamento dos estados excitados, o tempo de vida na ausência ( $\tau_0$ ) e na presença do supressor ( $\tau$ ) serão dados por

$$\tau_0 = \gamma^{-1} \quad (2.7)$$

$$\tau = (\gamma + k_q[Q])^{-1} \quad (2.8)$$

sendo, então,

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (2.9)$$

A Eq. 2.10 ilustra uma importante característica da supressão por colisão, que é um decréscimo equivalente na intensidade da fluorescência e no tempo de vida. A supressão estática não reduz esse tempo porque somente as moléculas fluorescentes são observadas.

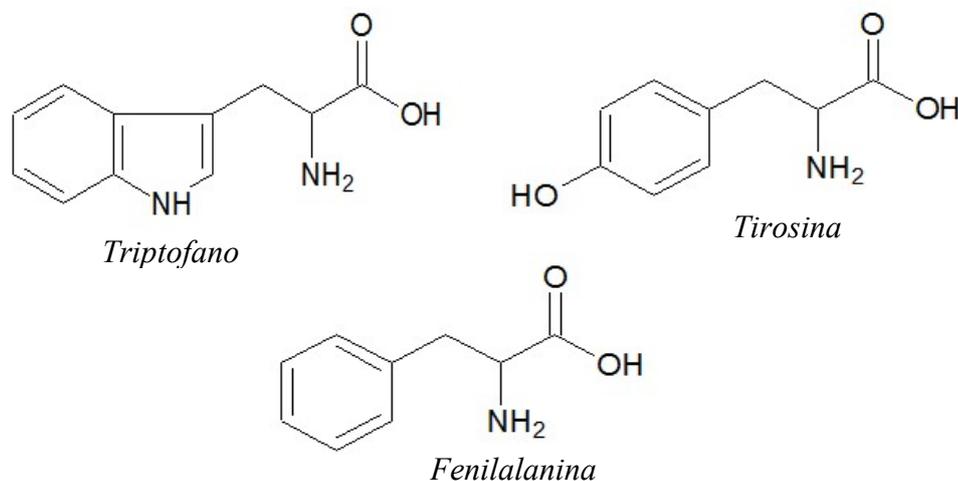
A medida dos tempos de meia-vida de fluorescência é o método mais adequado para a definição do tipo de supressão. A supressão estática remove uma fração da fluorescência devido ao envolvimento de parte dos fluoróforos na formação de complexo não fluorescente.

### 2.3 Fluorescência das proteínas

Dos 20 aminoácidos que podem compor as proteínas, apenas três possuem essa propriedade: o Trp, a Tyr e a fenilalanina (Phe). Esses três aminoácidos possuem estruturas com cadeias laterais aromáticas como mostrado na Figura 2.2. O Trp é o resíduo mais utilizado como fluoróforo, pois, como mencionado acima, é o que apresenta maior rendimento quântico (maior relação entre a quantidade de energia emitida e a absorvida) quando interligado nas cadeias protéicas. [SILVA et al., 2004; SOUZA et al., 2000].

O Trp tem um anel indol (Figura 2.3) ligado a um grupamento metileno; essa cadeia lateral possui um átomo de nitrogênio, além de átomos de carbono e hidrogênio, e pode servir apenas como formadora de pontes de hidrogênio. Os anéis aromáticos da Phe, Trp e Tyr contêm nuvens de elétrons  $\pi$  deslocados, que permitem a interação com outros sistemas  $\pi$  que transfiram elétrons.

Figura 2.2: Estruturas químicas dos três aminoácidos fluorescentes: fenilalanina, tirosina e triptofano.



A Phe e o Trp são muito hidrofóbicos, e a Tyr é mais hidrófila, pela presença da hidroxila ligada ao anel aromático,. A Tyr é o aminoácido que apresenta os menores comprimentos de onda de emissão e absorção, com próximo de 282 nm. Para o Trp em água a emissão máxima ocorre em 350 nm, e é altamente dependente da polaridade do solvente e/ou da sua circunvizinhança. [LAKOWICZ, 2006]

A emissão de fluorescência pelas proteínas por absorção de luz de comprimento de 280 nm se deve à presença de Tyr e Trp na sua cadeia, enquanto à emissão por absorção a comprimentos de onda maiores que 290 nm é devida primariamente ao Trp. Assim, a fluorescência do deste aminoácido pode ser seletivamente excitada em comprimentos de onda entre 290 e 305 nm. Parece que o anel indol do Trp, por sua tendência a doar elétrons quando excitado, favorece à ocorrência de supressão por colisão, pois este aminoácido é o único aminoácido sensível a esse tipo de supressão. [SILVA et al., 2004; TONEATTO e ARGUELLO, 2011]

A supressão colisional também depende da conformação da proteína e da associação de suas subunidades. Para supressores solúveis em água, que não

penetram prontamente nas regiões hidrofóbicas da proteína, há uma forte correlação entre o máximo de emissão e a constante de supressão. [LAKOWICZ, 2006]

### 3 ESPECTROSCOPIA DE ALBUMINAS SÉRICAS

As proteínas, albumina e globulinas, são os componentes mais abundantes do soro sanguíneo, onde desempenham a importante função de transporte de substâncias no sangue, como hormônios, sais, vitaminas, lipídios etc. Além disso, as proteínas também auxiliam na manutenção da pressão osmótica dos tecidos e do balanço ácido-básico do sangue, além de representarem uma fonte de reserva energética para todos os tecidos, na ausência de ingestão adequada. [KRAGH-HANSEN, 1981]

Por sua alta concentração plasmática, a albumina contribui de forma importante para o transporte, a distribuição e o armazenamento de várias substâncias endógenas e exógenas de baixa solubilidade em água, tendo um importante papel no efeito dos medicamentos e substâncias tóxicas no organismo animal, já que controla suas concentrações livres no plasma. Sabe-se que a fração livre é a responsável pelos efeitos terapêuticos de um medicamento, bem como pelos seus efeitos adversos e toxicidade de [FANALI et al., 2009; FASANO et al., 2005; SAKURAI, et al., 2004].

Existem hormônios, toxinas, ácidos graxos, íons e inúmeros fármacos, que formam complexos não covalentes com a albumina, ligando-se em sítios específicos, os **sítios primários de ligação**, podendo existir mais de um desses sítios para um dado ligante (substância que se liga no sítio) [FRAGOSO et al. 2015, 2012, CORTEZ et al. 2012, SILVA et al. 2004]. Outros sítios de menor afinidade podem surgir após a ocupação do(s) sítio(s) primário(s) [LAKOWICZ, 2006]. Devida a sua alta afinidade com ácidos graxos de longas cadeias, a albumina tem importante papel no transporte dessas moléculas e na modulação indireta do seu metabolismo [PETERS, 1996].

#### 3.1 Albumina sérica humana - HSA

Em humanos, a albumina representa cerca de 60% do total das proteínas do soro. A HSA é uma proteína de cadeia polipeptídica simples, com peso molecular de

aproximadamente 66.462 Da, e contém 585 resíduos de aminoácidos com apenas um triptofano na posição 214 ao longo da cadeia, como mostra a Tabela 3.1. Essa proteína apresenta 35 resíduos de cisteína e um grupo sulfidrila livre na cisteína da posição 34 (Cys<sub>34</sub>), além de muitos resíduos de aminoácidos carregados. O grupo sulfidrila livre não participa da ligação com nenhum ligante externo. Todos os outros resíduos de cisteína formam 17 pontes dissulfídicas, que contribuem fortemente para a estabilidade da proteína. A alta porcentagem de aminoácidos iônicos, como a lisina, a arginina, o ácido glutâmico e o ácido aspártico, presentes na cadeia, conferem à HSA uma solubilidade relativamente alta em água, pois muitos deles permitem formar uma camada superficial de solvatação. O dobramento da cadeia de aminoácidos cria domínios e subdomínios em três  $\alpha$ -hélices contíguas em paralelo. [WU et al., 2011].

**Tabela 3.1**  
**Estrutura primária das albuminas séricas bovina (BSA)**  
**e humana (HSA) - Número de aminoácidos**

<b>Aminoácido</b>	<b>BSA</b>	<b>HSA</b>
Cisteína	35	35
Ácido aspártico	41	36
Ácido glutâmico	59	62
Alanina	46	62
Arginina	23	24
Asparagina	13	17
Fenilalanina	27	31
Glicina	16	12
Glutamina	20	20
Histidina	17	16
Isoleucina	14	8
Leucina	61	61
Lisina	59	59
Metionina	4	6
Prolina	28	24
Serina	28	24
Tirosina	19	18
Treonina	34	28
Triptofano	2	1
Valina	36	41
<b>Total</b>	<b>582</b>	<b>585</b>
Nº de átomos de Nitrogênio	779	786

Na sequência de aminoácidos da HSA há um grupamento sulfidrila livre na posição 34, enquanto os demais grupamentos são ligados, sendo aproximadamente 60% deles reativos. A maioria das sulfidrilas não reativas está bloqueada através de ligações covalentes à cisteína ou ao glutatión. O resíduo de cisteína 34 também pode formar uma ligação dissulfeto com outras substâncias, por exemplo, vasopressina.

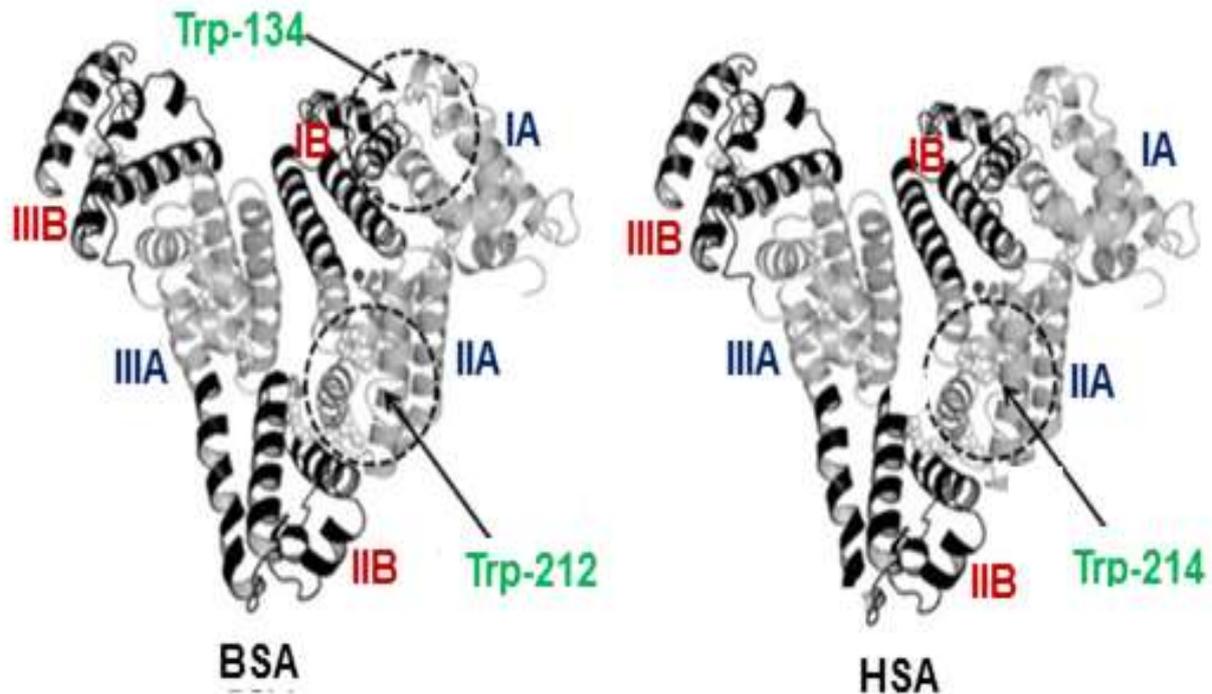
CARTER e colaboradores (1989) mostraram, pela técnica de difração de raio X, que a estrutura secundária da molécula da HSA é helicoidal, sendo o conteúdo em alfa-hélice formado por 67% da proteína, 23% constitui cadeia estendida e 10% se apresenta como dobra em beta. É uma proteína globular com forma aproximada de um triângulo equilátero de 80 Å de lado com espessura média de 30 Å e um volume calculado em cerca de 88.249 Å.

A estrutura tridimensional da HSA, com resolução de 2,8 Å, apresenta três domínios estruturalmente semelhantes (I, II e III), com padrão helicoidal similar, que são arranjados em formato de um triângulo equilátero (Figura 3.1). Cada domínio contém 10 hélices, sendo dividido em seis hélices antiparalelas e dois subdomínios (A e B), ligados por pontes dissulfeto [TAVIRANI et al., 2006]. A junção de dois subdomínios através da união de seus encaixes forma um domínio. O terminal desses domínios contribui para formação das hélices, que ligam os domínios IB e IIA e os domínios IIB e IIIA, como podem ser observados na Figura 3.1 [BERTUCCI e DOMENICI, 2002; FASANO et al., 2005; FANALI et al., 2009; PETERS, 1996; PETITPAS et al., 2001; SAKURAI et al., 2004; SUGIO et al., 1990].

A Figura 3.1 mostra um modelo representativo da estrutura molecular da HSA, onde podem ser identificados os três domínios, assinalando o Trp em sua posição 214, dentro do subdomínio IIA. Os domínios IIA e IIIA tem, cada um deles, uma cavidade formada principalmente por resíduos hidrofóbicos e outros carregados positivamente, dentro da qual uma grande variedade de compostos pode ser acomodada [PETERS, 1996]. Como pode ser observado na Figura 3.1, o único resíduo de Trp da HSA fica localizado na posição 214, no subdomínio IIA.

A Tabela 3.2 mostra as constantes de ligação de algumas substâncias endógenas à albumina sérica humana (HSA) para certas temperaturas, pH e números de sítios de ligação primários.

Figura 3.1: Representação dos arcabouços protéicos das albuminas do soro bovino (BSA) e humano (HSA), destacando a localização dos resíduos de triptofanos. [based in Protein data bank, <http://www.rcsb.org/pdb>]



**Tabela 3.2**

Constantes de ligação de substâncias endógenas à albumina sérica humana

Ligante	$n_1^*$	pH	Temp. (°C)	Constante de equilíbrio da ligação ( $M^{-1}$ )
Bilirrubina	1	7,40	37	$5,5 \times 10^7$
Cortisol	2	7,40	37	$5,0 \times 10^3$
Hemina	1	7,50	23	$5,0 \times 10^7$
Palmitato	2	7,45	23	$6,0 \times 10^7$
Oleato	2	7,45	23	$1,1 \times 10^8$
Progesterona	1	7,40	4	$3,6 \times 10^5$

$n_1$  é o número de sítios primários [VERBEECK et al., 1983]

### 3.2 Albumina sérica bovina - BSA

Pela semelhança no número de aminoácidos e por apresentar um resíduo de Trp a mais, a BSA tem sido utilizada em análises para complementar estudos da HSA. Normalmente, a BSA é usada como padrão em muitos métodos de laboratório, tais como a eletroforese e cromatografia, para a determinação de massa molecular e identificação de proteínas [AOKI et al. 1969].

A molécula da BSA é formada por uma sequência de 586 resíduos de aminoácidos, com seu único grupamento sulfidrila livre localizado na mesma posição que o da HSA. Também apresenta uma ponte disulfídrica simples e oito pares de pontes arranjados de forma análoga à da HSA. Enquanto a esta albumina apresenta apenas um resíduo de Trp, na posição 214 da sequência de aminoácidos (no subdomínio IIA), na BSA são encontrados dois resíduos, nas posições 134 (no subdomínio IB) e 212 (no subdomínio IIA) [Kragh-Hansen, 1981]. Essa diferença entre as duas albuminas pode ser usada como um parâmetro para a análise das características de sítios de ligação de um ligante à albumina [Silva et al., 2010].

A comparação das sequências de aminoácidos da BSA e da HSA mostra fortes semelhanças (Tabela 3.1). Além disso, as diferenças observadas conservam a natureza físico-química destas duas proteínas, isto é, os aminoácidos hidrofóbicos são substituídos por outros hidrofóbicos e não por outros polares [Brown e Crooks, 1976].

### 3.3 Sítios de ligação nas albuminas

A localização e a determinação do número de sítios de ligação na HSA é de importância fundamental no estudo da farmacocinética de drogas e qualquer outro ligante exógeno. A maioria dos ligantes se fixa primariamente a uns poucos sítios com alta afinidade e a um número maior de sítios com baixa afinidade. Os de mais alta afinidade são também chamados de sítios primários, que são sítios de ligação forte.

Certos compostos endógenos, tais como a bilirrubina, os ácidos graxos de cadeia longa e a hemina, ligam-se à albumina com alta afinidade (Tabela 3.2). Já os esteróides, que *in vivo* são ligados primariamente a várias globulinas e pré-albumina, exibem uma moderada afinidade de ligação à albumina [KAMISARA et al., 1974; KRAGH-HANSEN et al., 1974]. Um grande número de substâncias exógenas neutras e negativamente carregadas, como certas drogas, se ligam à albumina com constantes de equilíbrio da associação na ordem de  $10^4$  a  $10^5$  M<sup>-1</sup>, embora a albumina apresente uma carga líquida favorável a ligantes positivos [BROWN e CROOKS, 1976].

A organização estrutural da HSA fornece vários sítios de ligação. Atualmente existe um consenso de que duas regiões contem sítios de ligação de alta afinidade na HSA, responsáveis pelas ligações de várias substâncias à albumina. Para os compostos aromáticos e heterocíclicos com pequeno volume, SUDLOW et al. (1976) identificaram que a ligação na HSA limita-se aos subdomínios II e III, preferencialmente no sítio que passou a ser conhecido como Sudlow I (localizado no subdomínio IIA) [HE e CARTER, 1992; PETERS, 1996]. O sítio conhecido como Sudlow II, localizado no subdomínio IIIA, apresenta maior afinidade para os compostos carboxilados aromáticos (Figura 3.2) [FANALI et al., 2009; WU et al., 2011]. Para os ácidos graxos de cadeia longa, os sítios de ligação primários se encontram nos domínios IB e IIIB [SUDLOW et al., 1975]. E, por último, dois diferentes locais de ligação a metais foram descobertos na HSA, um envolvendo a cisteína na posição 34 e o outro a ligação N-terminal, perfazendo um total de seis áreas dominantes da albumina para associação com o ligante [DOCKAL et al., 1999; PETERS, 1996].

Diversos estudos revelaram a ligação de drogas no subdomínio IIA, como a warfarina, que apresenta ligação de alta afinidade a HSA [CARTER e HO, 1994; PETERS, 1996]. WATANABE et al. (2001) observou que o Trp-214 (Trp-214) faz parte do sítio de alta afinidade de ligação da albumina para a warfarina, mas parece não ser essencial para ligação. Os autores observaram que a HSA apresentava resíduos de arginina que possivelmente contribuíam para essa ligação.

A visão da albumina como uma estrutura dinâmica, consistindo em uma molécula flexível que muda continuamente conforme o meio, conduz a um modelo mais adequado para explicar que suas propriedades de ligação podem ser significativamente alteradas por diversos fatores fisiológicos e patológicos (idade,

doença, aspectos genéticos). Tais fatores devem afetar essas propriedades em consequência de mudanças na estrutura e na concentração da proteína, bem como por ligações reversíveis ou covalentes de ligantes endógenos e xenobióticos. A flexibilidade da albumina, junto com uma carga distribuída de forma heterogênea ao longo da molécula, torna possível a ligação para muitas classes de compostos, sendo os de características hidrofóbicas e aniônicos os que se ligam mais fortemente [PETERS, 1996].

KRAGH-HANSEN (1981) classificou seis ou mais regiões de ligação na albumina, baseado na interação mútua de ligantes associados simultaneamente à proteína e considerando que grupos de ligantes ligam-se preferencialmente a uma determinada região de sua molécula. Dessa forma, assumiu que o deslocamento de um ligante A por um ligante B indicaria ligação na mesma região, por competição. Essa divisão baseou-se em estudos de observação do bloqueio competitivo de sítios idênticos e de sítios superpostos quando a proteína é exposta a mais de um ligante. Os resultados obtidos referentes à ligação de dois ligantes de acordo com o esquema de competição e os vários exemplos de ligações independentes apresentados na literatura fornecem fortes evidências da existência de mais regiões de ligação na molécula de albumina. Entretanto é possível que tal bloqueio possa ser causado por outros mecanismos. Deve ser considerado que a ligação de um ligante A pode resultar em mudança conformacional da albumina suficiente para mascarar o sítio de ligação de B [GOTOH; SHIBANOK; ISHIKAWA, 1986].

### **3.4 Fluorescência e sua supressão nas albuminas**

Uma característica da fluorescência intrínseca das albuminas é a alta sensibilidade do Trp a mudanças físico-químicas na sua vizinhança. Alterações no espectro de emissão deste aminoácido podem ser observadas, em resposta a mudanças conformacionais da proteína, a associação de subunidades, a ligação de substratos ou a desnaturação, que podem afetar o ambiente em torno do grupamento indol. A complexidade da fotofísica do indol tem estimulado estudos detalhados de fluorescência de proteínas [LAKOWICZ, 1999].

Estudos mais recentes de supressão e polarização da fluorescência da HSA têm sido realizados como métodos para determinação das constantes de

dissociação de uma variedade de fármacos com a HSA [MATHIAS e JUNG, 2007]. A ligação do antipsicótico clorpromazina à albumina foi estudada por SILVA et al. (2004a e 2004b), que observaram que o tipo de supressão era colisional com o sítio de ligação primária localizado próximo ao resíduo do aminoácido Trp.

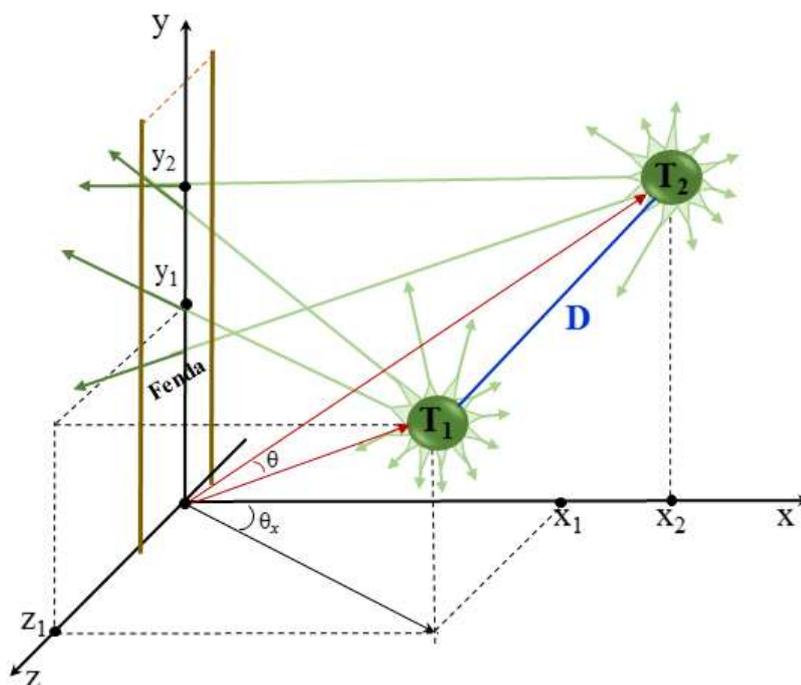
## 4 DESCRIÇÃO DO MODELO

Neste capítulo vamos descrever a modelagem matemática da interação de ligantes com BSA e HSA realizada com vista à elaboração de um modelo para determinar a localização relativa dos sítios primários para ligantes nas moléculas da BSA e HSA, levando em conta as suas características individuais e semelhanças.

### 4.1 Triptofanos e a Emissão de Fluorescência da Proteína

A Figura 4.1 mostra uma representação gráfica simplificada da emissão fluorescente dos dois resíduos de Trp da BSA passando pela fenda do espectrofluorímetro em direção ao detector.

Figura 4.1: Representação esquemática do registro da fluorescência da BSA. Os dois triptofanos,  $T_1$  e  $T_2$ , emitem radiação fluorescente, cuja a parte que atravessa a fenda é registrada pelo espectrofluorímetro.



Na Figura 4.1, os dois triptofanos T1 e T2 estão plotados nos eixos cartesianos 3D, distam entre si de uma distância D (linha azul) e a fenda do fluorímetro é representada por duas linhas marrons paralelas ao eixo Y. As setas verdes representam raios luminosos fluorescentes emitidos por T1 e T2, cuja parte que atravessa a fenda é registrada pelo espectrofluorímetro.

Considerando que a fluorescência emitida por uma proteína excitada por UV de 290-305 nm se deve, especialmente, à presença de resíduos de Trp na molécula, podemos assumir que cada resíduo contribuirá com uma parcela da fluorescência total emitida.

Chamando de  $F_{Alb_0}$  a fluorescência total emitida e de  $F_{T_i}$  a fluorescência emitida pelo resíduo de Trp $i$  presente na proteína, podemos escrever que

$$F_{Alb_0} = \sum_{i=1}^n F_{T_i}. \quad (4.1)$$

A BSA contém dois resíduos de triptofano: Trp212, localizado no subdomínio IIA, e Trp134, localizado no subdomínio IB. A HSA possui apenas o Trp214, localizado no subdomínio IIA. Dessa forma, a equação 4.1 para essas albuminas pode ser escrita nas seguintes formas:

$$\begin{aligned} F_{B_0} &= F_{T_{212}} + F_{T_{134}}, & (a) \\ e \quad F_{H_0} &= F_{T_{214}}. & (b) \end{aligned} \quad (4.2)$$

Como o Trp212 e o Trp214 estão localizados no mesmo subdomínio (IIA), podemos considerá-los “semelhantes”. Assim, para simplificar a notação, chamaremos Trp212 e Trp214 de T<sub>1</sub> e o Trp134 de T<sub>2</sub>. Assim, temos que

$$\begin{aligned} F_{B_0} &= F_{T_1} + F_{T_2}, & (a) \\ e \quad F_{H_0} &= F_{T_1}. & (b) \end{aligned} \quad (4.3)$$

Relacionando as intensidades da fluorescência emitida por T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> da BSA, podemos assumir que  $F_{T_1} = \gamma F_{B_0}$  e  $F_{T_2} = 1 - \gamma F_{B_0}$ , e que

$$F_{T_2} = aF_{T_1} \quad (4.4)$$

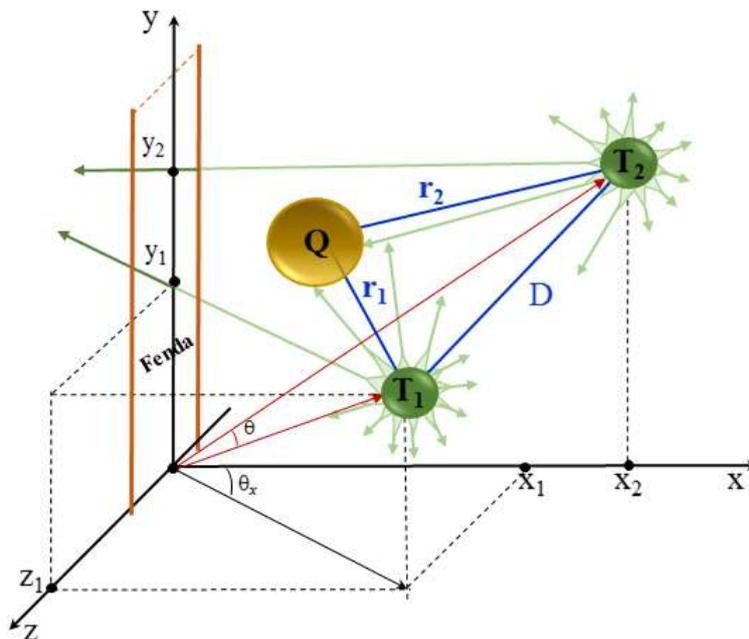
$$a = \frac{1 - \gamma}{\gamma} \quad (4.5)$$

onde  $\gamma$  é a fração da fluorescência total da BSA emitida pelo  $T_1$ , que depende primariamente da posição relativa do Trps na molécula, já que a contribuição do resíduo de triptofano mais internalizado deve ser menor.

#### 4.2 Triptofanos e a supressão da fluorescência das albuminas

Na Figura 4.2 pode-se ver o esquema da figura anterior considerando a presença de uma molécula de supressor no caminho da radiação emitida pelos dois triptofanos. Observe que parte da fluorescência é suprimida, não alcançando a fenda do fluorímetro.

Figura 4.2: Representação esquemática do registro da supressão da fluorescência da BSA devido a presença do supressor (Q). Os dois triptofanos,  $T_1$  e  $T_2$ , emitem radiação fluorescente; e a parte que atravessa a fenda é registrada pelo espectrofluorímetro.



Para um dado supressor, em uma dada concentração  $Q$ , a fluorescência remanescente, que é a registrada ( $F_{Alb|Q}$ ), é igual à fluorescência da albumina pura ( $F_{Alb_0}$ ) subtraída da porção suprimida. Esta é a soma das frações suprimidas por cada Trp, ou seja:

$$F_{Alb|Q} = F_{Alb_0} - \sum_{i=1}^n x_i F_{Ti}, \quad (4.6)$$

onde  $x_i$  é a taxa de supressão da fluorescência do triptofano  $i$ , a qual varia apenas com a distância entre o supressor e o fluoróforo, pois estamos considerando apenas um tipo de fluoróforo (Trp) para um mesmo supressor. Isto anula todos os outros parâmetros relacionados ao fenômeno de propagação e ao solvente.

Dividindo ambos os lados da Eq. (6) pela fluorescência da albumina pura (fluorescência medida inicialmente), temos que

$$\frac{F_{Alb|Q}}{F_{Alb_0}} = 1 - \frac{1}{F_{Alb_0}} \sum_{i=1}^n x_i F_{Ti}. \quad (4.7)$$

Para a BSA e a HSA a Eq. 4.7 fica:

$$\frac{F_B}{F_{B_0}} = 1 - \frac{1}{F_{B_0}} (x_1 F_{T1} + x_2 F_{T2}), \quad (4.8)$$

$$\frac{F_H}{F_{H_0}} = 1 - \frac{1}{F_{H_0}} (x_3 F_{T1}), \quad (4.9)$$

onde  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são fatores referentes às taxas suprimidas da fluorescência emitida por cada triptofano, na interação albumina-supressor. Esses fatores se relacionam com a distância ( $r_i$ ) do(s) triptofano(s) até o sítio de ligação primário (de mais alta afinidade) para o supressor na albumina. Subtraindo a Eq. (4.8) da Eq. (4.9), vem

$$\frac{\frac{F_B}{F_{B_0}} - 1}{\frac{F_H}{F_{H_0}} - 1} = \frac{\frac{1}{F_{B_0}} (x_1 F_{T_1} + x_2 F_{T_2})}{\frac{1}{F_{H_0}} (x_3 F_{T_1})}, \quad (4.10)$$

e com algumas simplificações, obtemos

$$\frac{\frac{F_B}{F_{B_0}} - 1}{\frac{F_H}{F_{H_0}} - 1} = \frac{F_{H_0}}{F_{B_0}} \frac{(x_1 F_{T_1} + x_2 F_{T_2})}{(x_3 F_{T_1})}. \quad (4.11)$$

Como os Trp212 e Trp214 estão no mesmo sítio, podemos assumir que  $x_3 F_{T_1} = x_1 F_{T_1}$ , temos que

$$\frac{\frac{F_B}{F_{B_0}} - 1}{\frac{F_H}{F_{H_0}} - 1} = \frac{F_{H_0}}{F_{B_0}} \left( 1 + \frac{x_2 F_{T_2}}{x_1 F_{T_1}} \right). \quad (4.12)$$

Assim a relação entre as frações suprimidas de fluorescência emitida por cada Trp é dada pela equação:

$$\frac{x_2 F_{T_2}}{x_1 F_{T_1}} = \left( \frac{\frac{F_B}{F_{B_0}} - 1}{\frac{F_H}{F_{H_0}} - 1} \right) \frac{F_{B_0}}{F_{H_0}} - 1, \quad (4.13)$$

que pode ainda ser escrita na seguinte forma:

$$\frac{x_2 F_{T_2}}{x_1 F_{T_1}} = \left( \frac{F_{B_0} - F_B}{F_{H_0} - F_H} \right) - 1, \quad (4.14)$$

onde  $\Delta F_{BSA}$  e  $\Delta F_{HSA}$  é a redução da fluorescência emitida, respectivamente, pela BSA e HSA para a concentração  $Q$  do supressor,  $[Q]$ .

Usando a equação de Stern-Volmer para a BSA ( $F_{B_0}/F_B = 1 + K_B[Q]$ ) e HSA ( $F_{H_0}/F_H = 1 + K_H[Q]$ ), podemos também representar a razão  $x_2F_{T_2}/x_1F_{T_1}$  em função da constante de Stern-Volmer, substituindo o termo  $F_B/F_{B_0}$  na Eq. 4.13:

$$\frac{x_2F_{T_2}}{x_1F_{T_1}} = \left( \frac{\frac{1}{1+K_B[Q]} - 1}{\frac{1}{1+K_H[Q]} - 1} \right) \frac{F_{B_0}}{F_{H_0}} - 1, \quad (4.15)$$

e com as simplificações adequadas obtém-se

$$\frac{x_2F_{T_2}}{x_1F_{T_1}} = \frac{K_B}{K_H} \frac{F_B}{F_H} - 1. \quad (4.16)$$

### 4.3 Distâncias entre os triptofanos e os sítios de ligação

Nas primeiras adições do supressor, suas moléculas vão ocupar o sítio primário, sendo possível relacionar a supressão da fluorescência com a distância deste sítio ao resíduo de triptofano (Figura 4.2), comparando os resultados obtidos para as duas albuminas, HSA e BSA. Entretanto, precisamos encontrar uma equação que relacione a intensidade da fluorescência medida com a distância percorrida pela radiação ( $r_i$ ) desde o fluoróforo até o ligante, que é o supressor.

Usando uma abordagem quântica semi-clássica, FÖRSTER (1948) obteve a seguinte expressão, que relaciona a taxa de transferência de energia ( $k_T$ ) entre uma molécula doadora de energia e uma outra receptora, com a distância  $r$  entre as duas:

$$k_T = \frac{1}{\tau_0} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6, \quad \text{para } i = 1,2 \quad (4.17)$$

onde  $\tau_0$  é a vida útil da doadora, e  $r$  é assumida permanecer inalterada durante o tempo de vida do doador, e  $R_0$  é a distância crítica ou raio Förster, ou seja, a distância à qual a transferência e o decaimento espontâneo do doador excitado são igualmente prováveis [HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2013; FÖRSTER, 1948].

Na Eq. 4.14, o fator  $x_i$  se refere à taxa da fluorescência suprimida do triptofano  $i$  na interação albumina-supressor, que é proporcional ao inverso da distância ( $r_i$ ) do

sítio de ligação do supressor na albumina ao triptofano  $i$ . Essa taxa se refere justamente à taxa de transferência da energia fluorescente do fluoróforo (doador) ao supressor e, por isto, adotamos o modelo de Förster para representar  $x_i$ , de forma que

$$x_i = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r_i} \right)^6, \quad \text{para } i = 1,2 \quad (4.18)$$

Substituindo a Eq. (4.18) na Eq. (4.14),

$$\frac{\frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r_2} \right)^6 F_{T_2}}{\frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r_1} \right)^6 F_{T_1}} = \left( \frac{F_{B_0} - F_B}{F_{H_0} - F_H} \right) - 1. \quad (4.19)$$

Como estamos tratando com um único tipo de fluoróforo, o triptofano, podemos considerar  $F_{T_2} = F_{T_1}$ , e fazendo as devidas simplificações na Eq. (4.19), obtemos:

$$\frac{r_1^6}{r_2^6} = \left( \frac{F_{B_0} - F_B}{F_{H_0} - F_H} \right) - 1 \quad (4.20)$$

ou

$$\frac{r_1}{r_2} = \sqrt[6]{\frac{\Delta F_B}{\Delta F_H} - 1}, \quad (4.21)$$

onde  $r_1$  e  $r_2$  são respectivamente as distâncias do sítio de ligação do supressor na albumina aos resíduos de Trp134 e Ttp212 da BSA (ou 214 da HSA), e  $\Delta F_B$  e  $\Delta F_H$  são as diferenças entre as intensidades da fluorescência emitida, respectivamente, pela BSA e HSA na ausência do supressor e na sua presença em uma concentração molar [Q]. Devida à raiz sexta, o modelo só é válido para

$$\frac{\Delta F_B}{\Delta F_H} - 1 \geq 0. \quad (4.22)$$

De acordo com a Eq. 4.16, temos ainda:

$$\frac{r_1}{r_2} = \sqrt[6]{\frac{K_B F_B}{K_H F_H} - 1}, \quad (4.23)$$

sendo necessário que:

$$\frac{K_B F_B}{K_H F_H} - 1 \geq 0 \quad (4.24)$$

Analisando as Eqs. 4.21 e 4.23, verificamos a existência das seguintes condições de contorno:

- I.* Quando  $r_1/r_2=0$ ,  $r_1=0$ , ou seja, o sítio de ligação para o supressor se encontra no domínio do *trp* da HSA, pode-se tirar da Eq 4.21 que

$$\frac{\Delta F_B}{\Delta F_H} = 1 \rightarrow \Delta F_B = \Delta F_H \quad (4.25)$$

e da Eq. 4.24 que

$$\frac{K_B F_B}{K_H F_H} = 1 \rightarrow \frac{K_B}{K_H} = \frac{F_H}{F_B}. \quad (4.26)$$

Isto significa que a intensidade da fluorescência das albuminas variou igualmente para a mesma concentração de supressor, e a constante de Stern-Volmer para a interação do supressor com a BSA cresce em relação a constante para a HSA, uma vez que a fluorescência emitida na titulação da HSA é mais intensa do que aquela medida na titulação da BSA, para o mesmo supressor.

- II.* Quando  $r_1/r_2 = 1$ ,  $r_1=r_2$ , ou seja, o sítio de ligação para o supressor está à mesma distância dos dois triptofanos. Se o sítio de ligação está no eixo entre os dois fluoróforos, que distam de uma distância  $D$  entre eles (ver Figuras 4.1 e 4.2), teremos  $r_1=r_2= D/2$ . Se o sítio estiver fora do eixo,  $r_1 = r_2= D$ . Em ambos os casos, das Eqs. 4.21 e 4.23 obtém-se, respectivamente, as condições:

$$\sqrt[6]{\frac{\Delta F_B}{\Delta F_H} - 1} = 1 \rightarrow \Delta F_B = 2\Delta F_H \quad (4.27)$$

e

$$\sqrt[6]{\frac{K_B F_B}{K_H F_H} - 1} = 1 \rightarrow \frac{K_B}{K_H} = 2 \frac{F_H}{F_B} \quad (4.28)$$

o que significa que a variação da fluorescência da BSA foi duas vezes a da HSA, e a razão entre as constantes de Stern-Volmer  $K_B/K_H$  será o dobro da razão entre as intensidades da fluorescência emitida pela HSA e a BSA, para o mesmo supressor.

III. Para  $r_1 < r_2$ , o supressor está no domínio IIA, mais próximo de trp212 da BSA do que do trp134 (subdomínio IB), sendo  $0 < r_1/r_2 < 1$ . Neste caso, temos que

$$0 < \sqrt[6]{\frac{\Delta F_B}{\Delta F_H} - 1} < 1 \rightarrow \Delta F_H < \Delta F_B < 2\Delta F_H \quad (4.29)$$

e

$$0 < \sqrt[6]{\frac{K_B F_B}{K_H F_H} - 1} < 1 \rightarrow \frac{F_H}{F_B} < \frac{K_B}{K_H} < 2 \frac{F_H}{F_B} \quad (4.30)$$

e que a variação da fluorescência emitida pela BSA foi menor que o dobro daquela emitida pela HSA, embora tenha sido maior que esta. A razão entre as constantes de Stern-Volmer  $K_B/K_H$  estará entre o dobro da razão  $F_H/F_B$ , para o mesmo supressor.

IV. Para  $r_1 > r_2$ , o supressor está no domínio IB, mais próximo de trp134 da BSA do que do trp212, sendo  $0 < r_1/r_2 < 1$ . Neste caso, das Eqs. 4.21 e 4.23 tira-se que

$$\sqrt[6]{\frac{\Delta F_B}{\Delta F_H} - 1} > 1 \rightarrow \Delta F_B > 2\Delta F_H \quad (4.31)$$

e

$$\sqrt{\frac{K_B F_B}{K_H F_H} - 1} > 1 \quad \rightarrow \quad \frac{K_B}{K_H} > 2 \frac{F_H}{F_B}, \quad (4.32)$$

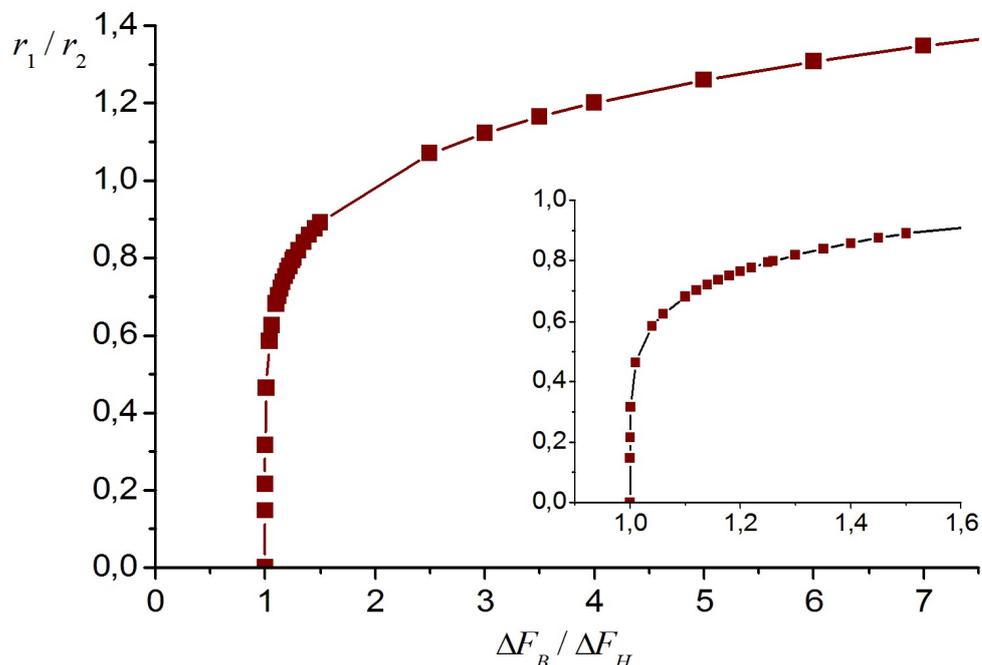
ou seja, a variação da fluorescência emitida pela BSA foi maior do que o dobro daquela emitida pela HSA, e a razão entre as constantes de Stern-Volmer  $K_B/K_H$  será o dobro da razão  $F_H/F_B$ , para o mesmo supressor.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Interpretando o comportamento do modelo

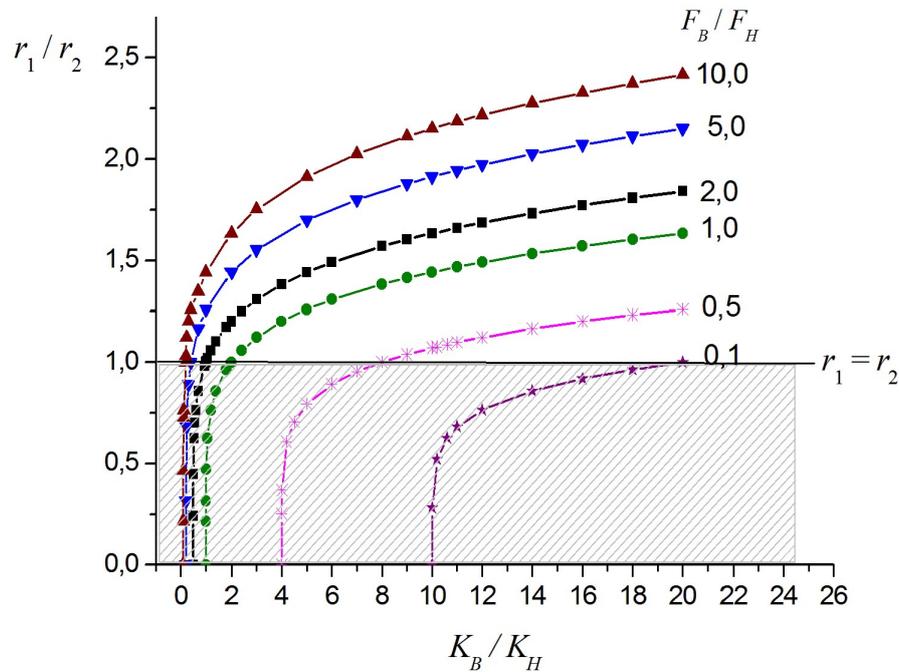
A Figura 5.1 mostra como a razão das distâncias  $r_1/r_2$  cresce com o aumento da razão  $\Delta F_B/\Delta F_H$ , de acordo com o modelo representado pela Eq. 4.21. Lembrando que, o numerador  $r_1$  representa a distância do sítio de ligação do supressor ao triptofano localizado no subdomínio IIA, Trp 214 na HSA e Trp 212 da BSA. O denominador  $r_2$  refere-se à distância do mesmo sítio ao triptofano da BSA localizado no subdomínio IB, ou Trp 134. Na razão  $\Delta F_B/\Delta F_H$ , o numerador é a diferença entre a intensidade da fluorescência emitida pela BSA na presença do supressor e aquela emitida na ausência deste ( $F_B - F_{B_0}$ ) e o denominador representa a mesma diferença para a HSA ( $F_H - F_{H_0}$ ).

Figura 5.1. Razão das distâncias  $r_1/r_2$  versus a razão  $\Delta F_B/\Delta F_H$  para qualquer concentração do supressor (Eq. 4.21).  $\Delta F_B$  e  $\Delta F_H$  são as diferenças entre as intensidades da fluorescência emitida, respectivamente, pela BSA e HSA na ausência e na presença do supressor, sendo  $\Delta F_B = F_{B_0} - F_B$  e  $\Delta F_H = F_{H_0} - F_H$ . O detalhe à direita evidencia a região de  $\Delta F_B/\Delta F_H$  de 1,0 a 1,6.



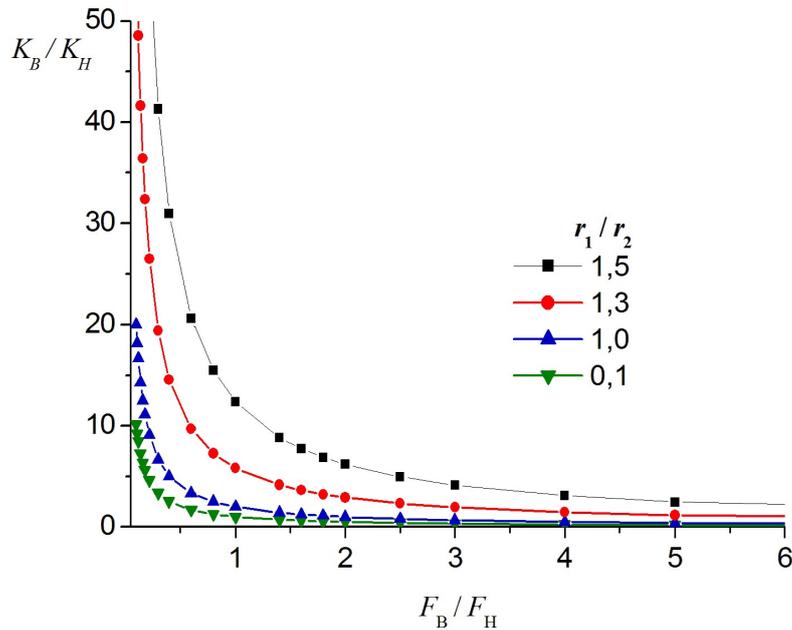
A Figura 5.2 ilustra o comportamento da razão  $r_1/r_2$  com o aumento da razão entre as constantes de supressão (ou de Stern-Volmer) para a BSA e a HSA ( $K_B/K_H$ ), considerando os valores da razão  $F_B/F_H$  entre 0,1 a 10,0. A constante de Stern-Volmer é normalmente calculada a partir do gráfico de Stern-Volmer, que por sua vez é obtido pela aplicação dos dados experimentais obtidos com a titulação da proteína pelo supressor na Eq. 2.26. Observe a linha  $r_1 = r_2$  que limita a região de  $r_1 < r_2$ .

Figura 5.2. Variação da razão das distâncias  $r_1/r_2$  com a razão das constantes de supressão  $K_B/K_H$ , para os seguintes valores de  $F_B/F_H$ : 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 de acordo com o modelo representado pela Eq. 4.23.



A Figura 5.3 ilustra a variação da razão  $K_B/K_H$  com a razão  $F_B/F_H$  para quatro valores de  $r_1/r_2$ . Esta figura evidencia que a constante de supressão e a intensidade da fluorescência emitida variam inversamente. Neste gráfico verificamos que, por sua vez, um crescimento maior da distância  $r_1$  comparado com o de  $r_2$  afasta o gráfico dos eixos coordenados e aumenta a área de validade do modelo. Neste caso, quanto maior  $r_1/r_2$ , mais ampla será a região de validade do modelo.

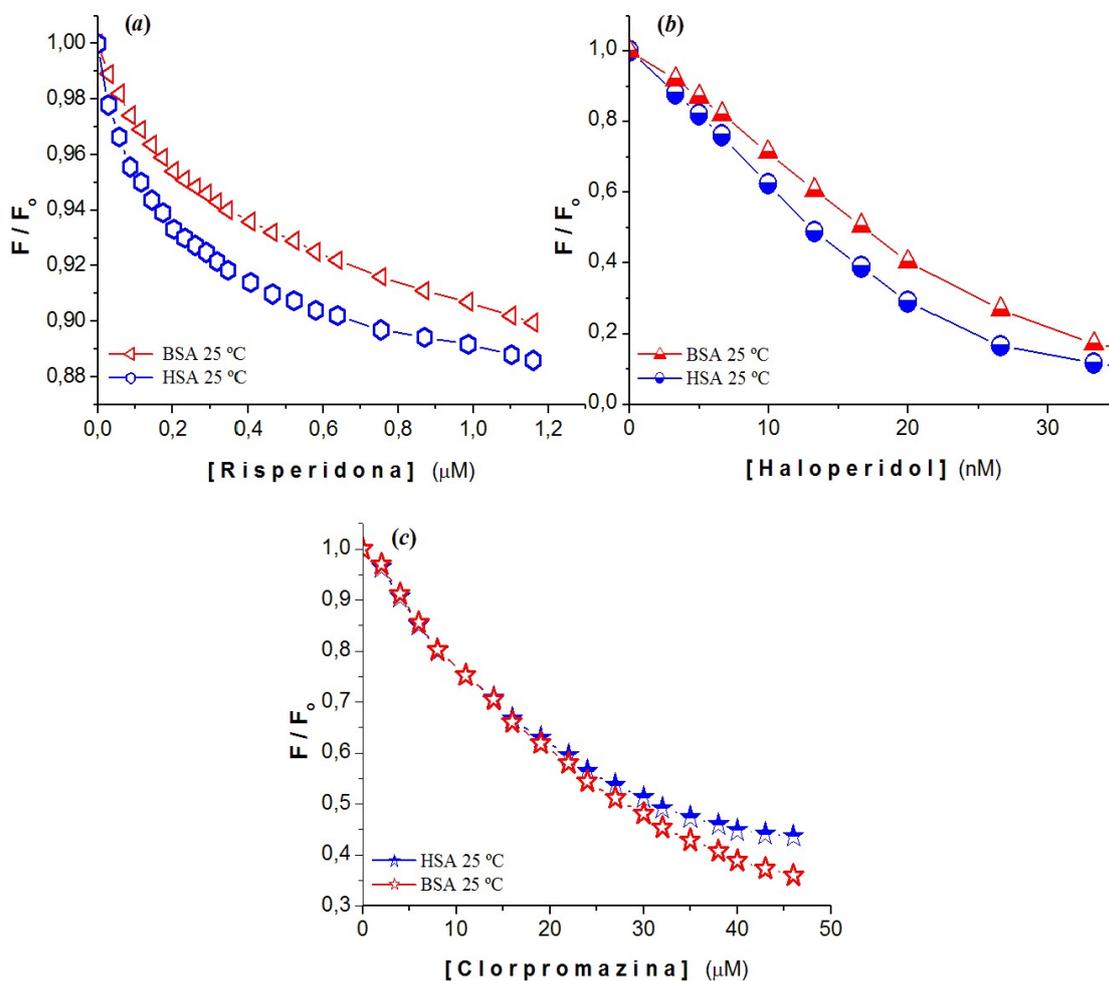
Figura 5.3. Variação da razão  $K_B/K_H$  com a razão  $F_B/F_H$  para  $r_1/r_2$  iguais a 0,1; 1,0; 1,3; 1,5 de acordo com o modelo representado pela Eq. 4.23.



## 5.2 Aplicações do modelo

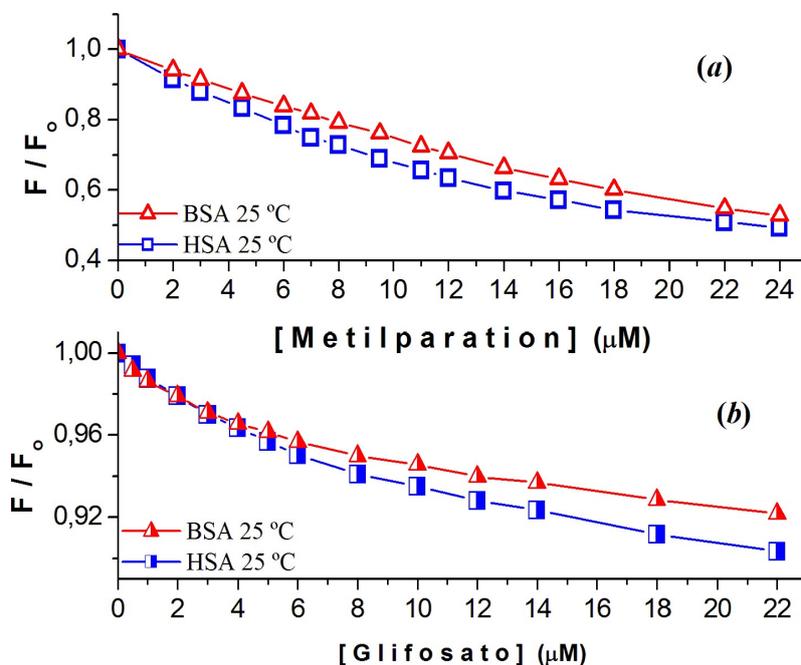
Para verificar o comportamento do modelo descrito pela Eq. 4.23 foram usados resultados obtidos em estudos espectrofluorimétricos da interação das albuminas com três fármacos, risperidona, clorpromazina e haloperidol, e dois pesticidas muito usados na lavoura brasileira, o metilparation e o glifosato. Nesses estudos da supressão da fluorescência, soluções de BSA e HSA foram tituladas a 25 °C, e nas Figuras 5.4 (a)-(c) são apresentados os gráficos de supressão normalizada obtidas para os fármacos [FRAGOSO et al., 2012; MORAIS e COURA et al. 2016; SILVA et al. 2004]. O mesmo tipo de gráfico para os pesticidas pode ser visto nas Figuras 5.5 (a) e (b), [SILVA et al. 2004]. Nestes gráficos, os valores da razão  $F/F_0$  (intensidades de fluorescência da albumina registrada, respectivamente na ausência e presença do fármaco) são plotados em função da concentração da substância supressora ou ligante,  $[Q]$ , considerando que a taxa da fluorescência suprimida para cada adição de supressor é dada por  $1 - (F/F_0)$ , e a equação de Stern-Volmer (Eq. 2.6) descreve a evolução da supressão da fluorescência.

Figura 5.4. Gráficos de supressão da fluorescência da HSA e BSA tituladas a 25 °C pelos fármacos antipsicóticos: (a) risperidona, (b) haloperidol,



Observe que a fluorescência das albuminas cai paulatinamente com a adição do supressor, sendo que, no caso da risperidona e do haloperidol, a HSA sofre uma supressão maior do que a BSA, já que o gráfico desta desvia em direção do eixo X mais rapidamente. No caso da clorpromazina, observa-se que para concentrações até 10  $\mu\text{M}$ , o gráfico exibe supressão igual para as duas albuminas, acima dessa concentração a supressão é maior para a BSA.

Figura 5.5. Gráficos de supressão da fluorescência da HSA e BSA tituladas a 25 °C pelos pesticidas: (a) metilparation e (b) glifosato [SILVA et al., 2004b; ESCOBAR et al., 2016].



Nos gráficos da Figura 5.5 verifica-se que o comportamento é semelhante com o aumento da concentração do supressor, os dois pesticidas suprimem mais intensamente a HSA.

### 5.2.1 A Razão $r_1/r_2$ para Drogas Antipsicóticas Avaliadas

A Figura 5.6 mostra a variação da razão das distâncias  $r_1 / r_2$  com a concentração dos fármacos supressores: risperidona, clorpromazina e haloperidol, de acordo com o modelo representado pela Eq. 4.23. Essas três drogas são antipsicóticos de diferentes famílias químicas.

Na Tabela 5.1 podem ser avaliadas as médias dos valores calculados, que foram:  $\overline{r_1 / r_2} = 1,12 (\pm 0,04)$  para a clorpromazina,  $\overline{r_1 / r_2} = 1,12 (\pm 0,04)$  para a risperidona, e  $\overline{r_1 / r_2} = 0,92 (\pm 0,04)$  para o haloperidol. A análise de significância mostrou que o deslocamento do gráfico, isto é, a variação da razão  $r_1 / r_2$  foi estatisticamente significativa para hipótese de  $\overline{r_1 / r_2} = 1$  nos três casos, nas escalas

de concentração de fármaco testadas. Os valores da razão calculados para a primeira e última adições do supressor e os respectivos valores de *t-student* e variância constam na Tabela 5.1.

Figura 5.6. Variação da razão das distâncias  $r_1 / r_2$  com a concentração

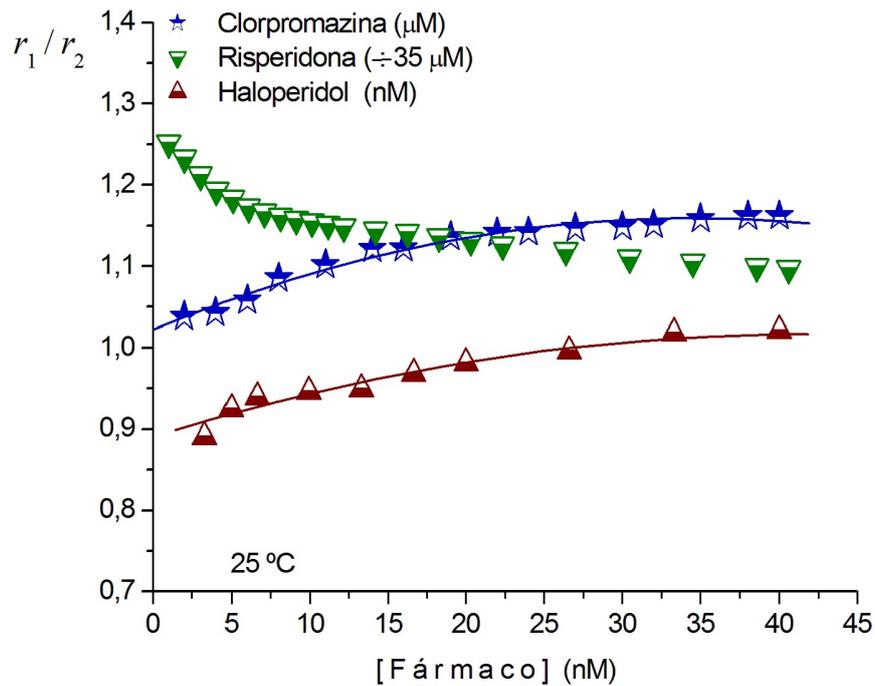


Tabela 5.1 Média e valores máximos e mínimos, variância e *t-student* das razões das distâncias para os fármacos e pesticidas estudados.

Substância	$\overline{r_1/r_2} \leq 1$	1ª adição	Última adição	Variância / <i>n</i>	<i>t-student</i> *
Clorpromazina	1,12( $\pm 0,04$ )	1,04	1,16	0,0018 / 16	11,37
Risperidona	1,15( $\pm 0,04$ )	1,25	1,09	0,0017 / 22	17,50
Haloperidol	0,92( $\pm 0,04$ )	0,89	1,02	0,0017 / 10	-2,75
Metiparation	0,96( $\pm 0,03$ )	0,92	1,02	0,001 / 14	-3,83
Glifosato	1,04( $\pm 0,05$ )	1,17	1,00	0,002 / 13	2,88

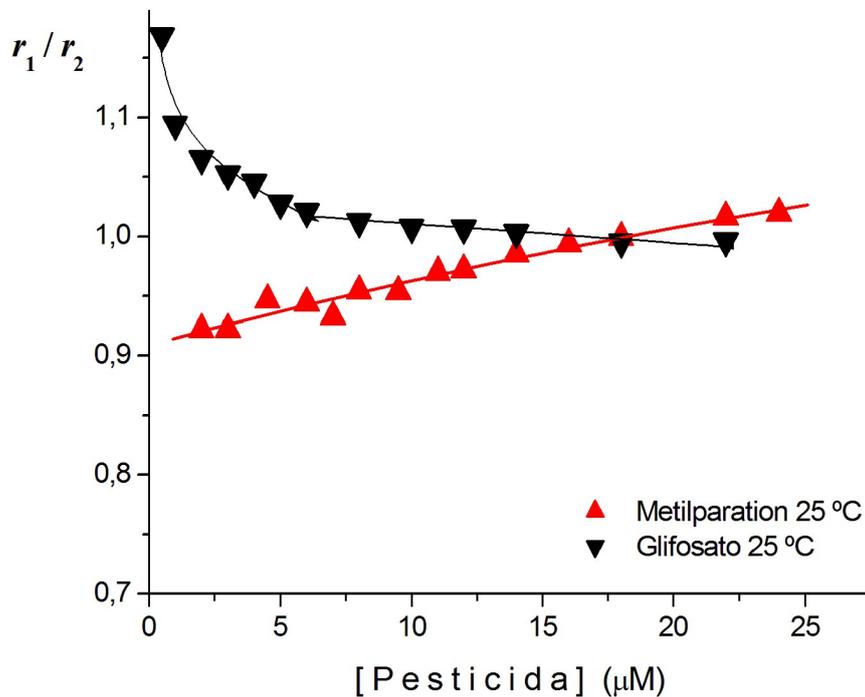
\*para  $\overline{r_1 / r_2} = 1$  ( $p < 0.05$ ); *n* = número de pontos.

### 5.2.2 A Razão $r_1/r_2$ para os Pesticidas Avaliados

Na Figura 5.7 pode ser avaliado o comportamento da razão das distâncias  $r_1/r_2$  com o aumento da concentração dos pesticidas: metilparation e glifosato, de acordo com o modelo representado pela Eq. 4.23.

Como no caso dos fármacos, a análise de significância mostrou que o deslocamento do gráfico foi estatisticamente significativo para hipótese de  $\overline{r_1/r_2} = 1$  para os dois pesticidas, na escala de concentrações testadas. Os valores da razão calculados para a primeira e última adições dos pesticidas e respectivos valores de *t-student* e variância estão na Tabela 5.1.

Figura 5.7. Variação da razão das distâncias  $r_1/r_2$  com a concentração dos pesticidas: metilparation e glifosato, de acordo com o modelo representado pela Eq. 4.23.



## 6 DISCUSSÃO

A interpretação do modelo através da análise das Figuras 5.1 e 5.2 evidencia o crescimento linear inicial da razão  $r_1/r_2$  (Eq. 4.21) com o aumento de  $\Delta F_B/\Delta F_H$  e  $K_B/K_H$ , respectivamente, sendo  $r_1$  e  $r_2$  as distâncias do sítio de ligação do ligante aos resíduos de triptofano localizado, respectivamente, nas posições 212 e 134 da BSA. A partir de um dado ponto nos gráficos, o aumento de  $r_1/r_2$  reduz significativamente e os gráficos encurvam, tendendo a valores limites. Já que necessariamente  $r_1/r_2 \geq 0$  e  $\Delta F_B/\Delta F_H \geq 1$ , a região  $r_1/r_2 < 0$  configura a região de restrição do modelo.

Na Figura 5.2 pode-se observar que a redução da razão entre as intensidades de fluorescência emitida pela albumina na presença do supressor ( $F_B/F_H$ ) provoca o deslocamento do gráfico para a direita, aumentando a região de restrição do modelo, localizada à esquerda de cada gráfico. Isto é,  $r_1/r_2$  é nula para, por exemplo,  $K_B/K_H = 4,0$ , quando  $F_B/F_H = 0,5$ , e para  $K_B/K_H = 10$ , se  $F_B/F_H = 0,1$ . Por outro lado, a Figura 5.3 evidencia que, para a mesma concentração de supressor, se a fluorescência emitida pela BSA for muito maior do que a emitida pela HSA, a constante de supressão para a BSA tenderá a zero.

O estudo do comportamento do modelo (Eq. 4.23) usando dados da espectrofluorimetria dos fármacos: clorpromazina [SILVA et al., 2004], risperidona [FRAGOSO et al., 2012] e haloperidol [MORAIS e COURA et al., 2016], cujas Figuras 5.4 (a)-(c) apresentam os respectivos gráficos de supressão normalizada, mostrou que os valores da razão  $r_1/r_2$  para a primeira adição dos três fármacos a 25 °C foram bem diferentes entre si (Tabela 5.1), sugerindo diferentes sítios de ligação primários (sítio de maior afinidade) na albumina.

Para a clorpromazina, o valor da razão ficou muito próximo da unidade ( $p < 0,05$ ), sugerindo que o seu sítio primário possa estar a meia distância dos dois triptofanos presentes na BSA, de acordo com a condição de contorno II ( $r_1/r_2 = 1$ ). No caso da risperidona, a  $r_1/r_2 > 1$  (condição IV), indica um sítio primário localizado mais próximo do Trp134 do que do Trp212 da BSA, ou seja, um sítio nas proximidades ou dentro do subdomínio 1B das duas albuminas. Quanto ao haloperidol, a razão  $r_1/r_2 < 1$  (condição III) sugere que o sítio primário esteja mais próximo do Trp 212 do que do Trp 134 da BSA, mais precisamente nas proximidades ou dentro do subdomínio IIA das albuminas.

Segundo STRYER [1969], compostos ligados até 60 Å de distância dos triptofanos de uma proteína podem ainda suprimir a fluorescência deste fluoróforo, e o anel de clorpromazina não é maior que 10 Å.

Analisando as Figuras 5.6, verificamos que os gráficos evoluem para baixo (risperidona) ou para cima (clorpromazina e haloperidol) com o aumento de suas concentrações, ou seja, a variação da razão  $r_1 / r_2$  com a concentração pode estar indicando a existência de outros sítios de menor afinidade que passam a ser ocupados.

No caso da clorpromazina, o gráfico se desloca para cima e alcança o valor de 1,16 para a concentração de 40  $\mu\text{M}$ , sendo este deslocamento estatisticamente significativo ( $t = 11,37$ ,  $p > 0,05$ ). Dessa forma, em conformidade com a condição IV ( $r_1 / r_2 > 1$ ), as moléculas adicionais da clorpromazina gradualmente ligam-se em sítio(s) mais próximo(s) da posição 134. Já o gráfico da risperidona inclina para baixo, realizando uma curva que varia de 1,25 (para 0,5  $\mu\text{M}$ ) a 1,09 (para 41  $\mu\text{M}$ ), mostrando um afastamento do subdomínio 134 com o aumento da concentração. Com base na análise da Figura 5.6 ainda é possível sugerir que esses dois fármacos podem ter alguns sítios comuns, quando em concentrações aumentadas.

A existência de mais de um sítio de ligação para a clorpromazina na HSA (e na BSA) revelada por nosso modelo está em acordo com os resultados dos experimentos usando diálise de equilíbrio de SHARPLES [1974], um dos pioneiros no estudo da ligação da clorpromazina na HSA. Este autor sugeriu a existência de 2-3 sítios, sendo dois deles hidrofóbicos de igual afinidade, com uma constante de afinidade igual a  $4,05 \times 10^5$  L/mol a 28 °C. Anteriormente, NAMBU e NAGAI [1972] tinham descoberto 2 sítios para a ligação da clorpromazina na HSA a 10 °C. Em trabalho prévio, FRAGOSO et al. [2012] já tinham sugerido, com base na análise visual das curvas de supressão da HSA e BSA, que o sítio primário da risperidona poderia estar localizado próximo ao triptofano da posição 134 da cadeia de peptídeos da BSA, no subdomínio IB, com uma constante de associação igual a  $2,56 \times 10^5$  / M, calculada para a razão de concentração [risperidona] / [HSA] < 1:10 a 25 °C.

Segundo o presente modelo, o sítio primário do haloperidol a 25 °C (Figura 5.6, Tabela 5.1) parece estar localizado mais próximo do Trp212 do que do Trp134 (condição III,  $0 < r_1 / r_2 < 1$ ), já que o valor médio da razão  $r_1 / r_2$  foi  $0,92(\pm 0,04)$ . A razão  $r_1 / r_2$  tende para a unidade com o aumento da concentração (valor máximo:

40 nM). Não encontramos na literatura qualquer referência sobre a localização ou o número de sítios do haloperidol em albuminas para que pudéssemos fazer comparações.

No caso dos pesticidas testados (Figura 5.7), cujos gráficos de supressão são mostrados na Figura 5.5 [SILVA et al., 2004b, ESCOBAR et al., 2016], quase todos os valores da razão  $r_1/r_2$  para o metilparation foram descobertos entre 0 e 1, mínimo 0,92 e máximo 1,02 (Tabela 5.1), indicando que o sítio para este pesticida na BSA (ou na HSA) está nas proximidades ou dentro do subdomínio IIA, de acordo com a condição III ( $0 < r_1/r_2 < 1$ ) do modelo.

Por outro lado, o herbicida glifosato parece ter seu sítio primário localizado mais para próximo do Trp 134 do que do Trp 212 (condição IV,  $r_1/r_2 > 1$ ), tendo sido o valor de  $r_1/r_2$  calculado para a menor concentração igual 1,17 (Tabela 5.1). Com o aumento da sua concentração, observa-se que o gráfico da Figura 5.7 inclina-se no sentido do eixo X, descrevendo uma curva de concavidade para cima. Mas, para concentrações maiores do que 10  $\mu$ M do glifosato, a razão  $r_1/r_2$  tende ao valor unitário, sugerindo ligações em sítios à mesma distância dos dois triptofanos da BSA (condição II), isto é, entre os domínios IB e IIA. A Figura 5.7 evidencia que pode haver sítios comuns para os dois xenobióticos.

Os resultados de nossa modelagem confirmam a sugestão anterior de SILVA e colaboradores (2004a) quando comentam, com base nos gráficos de supressão normalizada (Figura 5.5(a)), que o metilparation suprime a fluorescência da HSA mais intensamente do que da BSA para 25 °C; e que esta observação junto com a alta hidrofobicidade do pesticida sugerem que este se liga às albuminas em sítio mais próximo do resíduo de triptofano do subdomínio IIA. Este aminoácido se encontra localizado profundamente em uma cavidade hidrofóbica, enquanto o trp134 da BSA é mais exposto ao ambiente hidrofílico [STEINHARDT et al., 1972; KRAGH-HANSEN, 1990].

SUDLOW et al. (1976) identificaram que o sítio de Sudlow I (no subdomínio IIA) tem alta afinidade para ligar fármacos. No subdomínio IIA, que é uma cavidade hidrofóbica, há dois grupos de aminoácidos polares e carregados positivamente: um localizado na entrada da cavidade e outro em direção do fundo da cavidade [SUDLOW et al., 1975 e 1976, LAMMERS, 2011]. O subdomínio IIA é uma região de ligação grande e flexível, com vários sítios que podem ser independentes para ligação de diferentes moléculas, mas há casos em que um ligante pode

influenciar no outro. A grande flexibilidade da sua estrutura é um fator fundamental para sua grande capacidade de adaptação à ocupação dos sítios [KRAGH-HANSEN, 1988].

Sabe-se que a disponibilidade sérica de um fármaco para se obter o efeito desejado pode ser formulada como um evento termodinâmico e cinético complexo, que leva em conta que o fármaco é capaz de se ligar a proteínas diferentes com diferentes propriedades de ligação. Vários fármacos podem ligar-se ao mesmo local da proteína ou a cavidades funcionalmente diferentes, seguindo mecanismos competitivos e sinérgicos. A fração de um fármaco que se liga a HSA pode chegar a ser superior a 90%. Assim, na presença de HSA, a concentração plasmática do fármaco necessária para seu efeito terapêutico poderá ser mais de dez vezes acima daquela necessária na ausência da proteína [FASANO et al. 2005].

Apesar do grande número de estudos destinados à avaliação da interação de fármacos com HSA, ainda há pouca informação na literatura sobre a localização de sítios de ligação nas albuminas para a maioria deles. Na atualidade, este conhecimento assume um outro patamar de importância, devida a sua aplicabilidade na pesquisa em farmacologia computacional (ou *in silico*) usando procedimentos de *docking* (ancoragem) molecular [EKINS et al., 2002, 2006]. Os procedimentos de *docking* são métodos capazes de enriquecer o processo de identificação de moléculas ativas para alvos de interesse farmacológico, tendo o potencial para gerar previsões para os muitos e variados tipos de propriedades farmacológicas e físico-químicas de cada estrutura molecular [BELINSKAIA et al., 2014]. A afinidade de ligação da HSA já foi usada para mostrar que descritores de *docking* podem ser úteis para estimar valores exatos de propriedades farmacocinéticas de drogas [CHEN E CHEN, 2012].

## CONCLUSÃO

O modelo baseado na teoria de supressão de fluorescência mostrou-se adequado para a avaliação da posição de sítios na BSA e HSA para os ligantes aqui testados. O modelo permitiu, inclusive, observar a dinâmica de movimentação das moléculas do ligante dentro da proteína em função do aumento da concentração do ligante na solução, pela análise da variação da razão entre as distâncias do sítio aos triptofanos da BSA,  $r_1/r_2$ , sendo  $r_1$  a distância do sítio ao Trp 212 (subdomínio IIA) e  $r_2$  a distância ao Trp134 (subdomínio IB).

Os resultados permitem concluir que os sítios de ligação primários para os três fármacos estudados, clorpromazina, risperidona e haloperidol, podem estar localizados, respectivamente: (1) a meia distância dos dois triptofanos presentes na BSA, de acordo com a condição de contorno II ( $r_1/r_2 = 1$ ); (2) nas proximidades ou dentro do subdomínio 1B das duas albuminas; e (3) nas proximidades ou dentro do subdomínio IIA.

Com o aumento da concentração, a clorpromazina gradualmente liga-se em sítios de menor afinidade mais próximos da posição 134, subdomínio IB, enquanto a risperidona se afasta deste subdomínio com o aumento da sua concentração na solução de albumina, sendo que estes dois fármacos podem ter sítios comuns em maiores concentrações. Sítios para o haloperidol mais afastados da posição 212 da BSA (ou 214 da HSA) parecem surgir com o aumento da sua concentração.

Quanto aos pesticidas usados no teste do modelo, verificou-se que o sítio primário para o metilparation nas albuminas se encontra nas proximidades ou dentro do subdomínio IIA, não tendo sido observado afastamento deste subdomínio com o aumento da concentração. Já o sítio primário para o glifosato parece estar próximo à posição 134 da cadeia peptídica, e outros sítios mais afastados parecem surgir com o aumento da concentração.

## REFERÊNCIAS

- AOKI K.; HIRAMATSU, K.; KIMURA, K. Heat Denaturation of Bovine Serum Albumin. I. Analysis by Acrylamide-gel Electrophoresis. *Bull. Inst. Chem. Res.*, 1969; 47:274-282
- BARTUSIK, D.; TOMANEK, B.; BLICHARSKA, B.; FALLONE, G. Magnetic resonance assays of haloperidol in human serum albumin. *Med. Chem. Res.* 2011; 20:62–66.
- BATRA, D. Conceptual Data Modeling Patterns. *J Database Manag* 2005; 16:84-106
- BELINSKAIA, D.A.; SHMURAK, V.I.; PROKOF'EVA, D.S.; GONCHAROV, N.V. Serum albumin: search for new sites with esterase activity according to molecular modeling data. *Bioorg Khim* 2014;40:541-9.
- BENDER, E.A. *An Introduction to Mathematical Modeling*, New York: Dover, 2000.
- BENET, L.Z.; KROETZ, D.L; SHEINER L.B. IN GOODMAN AND GILMAN'S, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed., Edited by JG Hardman, LE Limbird, PB Molinoff, RW Ruddon. McGraw-Hill, New York, 1996.
- BERTUCCI, C.; DOMENICI, E. Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance. *Curr. Med. Chem.* 2002; 19:1463-1481.
- BHATTACHARYYA, M.; CHAUDHURI, U.; PODDAR, R.K. Evidence for cooperative binding of chlorpromazine with hemoglobin: equilibrium dialysis, fluorescence quenching and oxygen release study. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, India, 1990; 167:1146-1153.
- BROWN, K. F.; CROOKS, M.J. Displacement of tolbutamide, glibenclamide and chlorpropamide from serum albumin by anionic drugs. *Biochem. Pharmacol, Austrália*, 1976; 25:1175–1178.
- CARDOSO, F.R.G.; CRUZ, F.A.O.; SILVA, D.; CORTEZ, C.M. Computational modeling of synchronization process of the circadian timing system of mammals. *Biol. Cybern.* 2009; 100:385-393.
- CARREJO, D. J.; MARSHALL, J. What is Mathematical Modelling? Exploring Prospective Teachers' Use of Experiments to Connect Mathematics to the Study of Motion. *Mathem. Educ. Res. J.*, 2007; 19: 45-76.

- CARTER, D. C.; *et al.* Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science*, 1989; 244:1195–1198.
- CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 1994; 45:153-20394.
- CHEN L., CHEN X. Results of molecular docking as descriptors to predict human serum albumin binding affinity. *J. Mol. Graph Model.* 2012; 33:35-43.
- CORTEZ, C.M.; BISCH, P.M. Effect of Ionic Strength and Outer Surface Charge on the Mechanical Stability of Erythrocyte Membrane. *J Theor Biol.* 1995; 176:325-339.
- CORTEZ, C.M; SILVA, D.; SILVA, C. M. C.; Missailidis, S. Interactions of aptamers with sera albumins. *Spectrochim Acta. Part A, Mol. Biomol. Spectros*, 2012; 95: 270 - 275.
- DECANIO S.J. Descriptive or Conceptual Models? Contributions of Economics to the Climate Policy Debate. *International Environmental Agreements: Politics, Law and Economics*, 2005: 5:415–427
- EISBERG, R; RESNICK, R., *Quantum Physics of Atoms, Molecules, Solids, Nuclei and Particles.* John Wiley & Sons. 1985.
- EKINS, S. Systems-ADME/Tox: resources and network approaches. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2006; 53: 38–66.
- EKINS, S.; BOULANGER, B.; SWAAN, P.W.; HUPCEY, M.A.Z. Towards a new age of virtual ADME/TOX and multidimensional drug discovery. *J Comput Aided Mol Des* 2002; 16: 381–401.
- EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Brit J. Pharm.* 2007; 152, 9–20.
- ESCOBAR, M.A.C.; BASTOS NETO J.C.; SILVA, D. Relatório FAPERJ, bolsa de iniciação científica, 2016.
- FANALI, G. *et al.* Allosteric and binding properties of Asp1–Glu382 truncated recombinant human serum albumin – an optical and NMR spectroscopic investigation. *The FEBS J.* 2009; 276: 2241–2250.
- FASANO, M. *et al.* The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB. Lif. (Italy)* 2005; 57:787–796.
- FASANO, M.; CURRY, S.; TERRENO E.; GALLIANO M.; FANALI G.; NARCISO P.; NOTARI S.; ASCENZI P. The Extraordinary Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin. *IUBMB Life*, 2005; 57: 787-796.

- FRAGOSO, V.M.S.; MORAIS e COURA, C. P. M. E.; HOPPE, L. Y.; SOARES, M. A. G.; SILVA, D.; CORTEZ, C.M. Binding of Sulpiride to Seric Albumins. *Int. J. Mol. Sci.(Online)*. 2016; 17:59 - 69.
- FRAGOSO, V.M.S.; SILVA, D.; CRUZ, F.A.O.; CORTEZ, C.M. Risperidone Interacts with Serum Albumin Forming Complex. *Environ. Toxicol Pharm.* 2012; 33: .26-266.
- FUCHS P.; MOREAU G.; GUITTON P. *Virtual Reality: Concepts and Technologies* London: CRC Press 2011; pp345-346.
- GERHARD, A.C.; DA ROCHA FILHO, J.B. The knowledge fragmentation of scientific school education on the view of high school teachers. *Investigações em Ensino de Ciências*. 2012; 17: 125-145.
- GOTOH, Y.; SHIBANOKI, S.; ISHIKAWA, K. Simultaneous determination of the pharmacodynamics of chlorpromazine in the brain of mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, 1986; 40:231-237.
- INGALLS, B. *Mathematical Modelling in Systems Biology: An Introduction*. [consulta 12/02/2016]. <https://www.math.uwaterloo.ca/~bingalls/MMSB/Notes.pdf>
- KAMISARA, K. *et al.* Competitive binding of bilirubin, sulfobromophthalein, indocyanine green and other organic anions to human and bovine serum albumin. *Bioch. Biophys. Act.* 1974; 365:169-180.
- KATZUNG, B; MASTERS, S.; TREVOR A. *Basic and Clinical Pharmacology*. 12th ed. 2011. Mc Graw Hill. Lange.
- KOCH, G. *Modeling of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics with Application to Cancer and Arthritis*. Thesis. Universität Konstans, 2012.
- KRAGH-HANSEN, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol. Rev.*, 1981; 33:17-53.
- KRAGH-HANSEN, U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin.. *Dan Med Bull* 1990; 37, 57-84. .
- LAKOWICZ, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer Science: Philadelphia, PA, USA, 2006; pp. 278–327.
- LAMMERS I. *Chiral discrimination by phosphorescence*. Ed. Vrije Universiteit, 2011.
- LAW, A. *Simulation Modeling and Analysis*, Fourth ed. New York, NY, USA: McGraw Hill, 2007.

- LIN, M.H.; TSA, J.F.; YU, C.S. Ming-Hua A Review of Deterministic Optimization Methods in Engineering and Management. Math Prob Eng 2012; 2012: ID 756023, 15 pages.
- MAKI, D.; THOMPSON, M. The Mathematical Modeling Cycle. Stepping Stones to Mathematical Modeling 2014. <http://www.indiana.edu/~hmathmod/modelmodel.html>
- MELNIK, R. Mathematical and Computational Modeling: With Applications in Natural and Social Sciences, Engineering, and the Arts. Willey, 2015.
- MORAIS e COURA C.P.; TEX, E.P.; CRUZ, F.A.O.; CORTEZ, C.M. Serum Albumin and the Haloperidol Pharmacokinetics. Study using a computational model. AIP Conf. Proc., em publicação, 2016.
- MORRIS, M.K.; MELAS, I.; SAEZ-RODRIGUEZ, J. Construction of cell type-specific logic models of signaling networks using CellNOpt. Methods Mol Biol 2013; 930:179-214.
- NAMBU, B.; NAGAI, T. Binding of phenothiazines to bovine serum albumin and related phenomena. Chem. Pharm. Bull. 1972; 20: 2463-2470.
- PETERS Jr., T. All about albumin, biochemistry, genetics, and medical applications. Academic Press, New York, 1996.
- PETITPAS, I.; GRÜNE, T.; BHATTACHARYA, A.A.; CURRY, S. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. J. Mol. Biol. 2001; 314:955-960.
- PETITPAS, I.; ANANYO A. BHATTACHARYA, A.A.; TWINE, S.; EAST, M.; CURRY, S. Crystal Structure Analysis of Warfarin Binding to Human Serum Albumin. J. Biol. Chem. 2001; 276: 22804–22809.
- PINTO, T.M.; WEDEMANN, R. S.; CORTEZ, C.M. Modeling the Electric Potential across Neuronal Membranes: The effect of fixed charges on spinal ganglion neurons and neuroblastoma cells. Plos One 2014; 9:e96194 - 7.
- PLUM A, JENSEN B.L., KRISTENSEN J.B. *In vitro* protein binding of liraglutide in human plasma determined by reiterated stepwise equilibrium dialysis. J. Pharm Sci. 2013; 102: 2882–2888.
- SAKURAI, Y. *et al.* Esterase-like activity of serum albumin: characterization of its structural chemistry using p-nitrophenyl esters as substrates. Pharm. Res. 2004; 21: 285–292.
- SANCHES, C. F. M.; JAFELICE, R. S. M. Modelagem matemática para o crescimento de peixes. FAMAT 2004; 3:13-25.

- SCHULMAN SG. Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications: Part 1. New York: WileyInterscience, 1977.
- SHARPLES, D. The binding of chlorpromazine to human serum albumin. J. Pharm. Pharmac., 1974; 26: 641-642.
- SILVA, D.; CORTEZ, C.M.; LOURO, S.R.W. Chlorpromazine Interactions to Sera Albumins. A study by the quenching of fluorescence. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 2004a; 60, 1215–1223.
- SILVA, D.; CORTEZ, C.M.; LOURO, S.R.W.; Cunha Bastos, J. Methyl Parathion Interaction with Human and Bovine Serum Albumin. Toxic. Letters 2004b;147: 53-61.
- SILVA, D.; CORTEZ, C.M.; LOURO, S.R.W. Quenching of the Intrinsic Fluorescence of Albumin by Chlorpromazine and Hemin. Braz. J. Medic. Biol. Res. 2004c; 37: 963-968.
- SIMMONS SO, FAN CY, YEOMAN K, WAKEFIELD J, RAMABHADHAN R. Nrf2 oxidative stress induced by heavy metals is cell type dependent. CurrChem Genomics. 2011;5:1–12.
- SOUZA, E.S.; *et al.* End-to-end distance distribution in bradykinin observed by Forster resonance energy transfer. BiochimBiophysActa. 2000; 1474: 251-261.
- STEINHARDT, J., LEIDY, J.G., MOONEY, J.P. Effects of *n*-alkyl ligands on the difference spectra of bovine and human serum albumin. Biochemistry 1972; 11, 1809–1817.
- STRYER, L. In Fluorescence Assay in Biology and Medicine. Vol. 11 p.272. Editor: Udenfriend, S New York: Academic Press, 1969.
- SUDLOW, G.; BIRKETT, D.J.; WADE, D.N. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. Mol. Pharmacol. 1975; 11: 824-832.
- SUDLOW, G.; BIRKETT, D.J.; WADW, N. Further Characterization of Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. Mol Pharm 1975; 12: 1052-1061.
- SUGIO, S. *et al.* Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å / resolution. Protein Eng., Japan, v.12, p. 439-446,1999.
- TIAN J, ZHAO Y, LIU X, ZHAO S. A steady-state and time-resolved fluorescence, circular dichroism study on the binding of myricetin to bovine serum albumin. Luminescence 2009; 24:386-93. doi: 10.1002/bio.1124.

- TONEATTO, J.; ARGUELLO, G.A. New advances in the study on the interaction of [Cr(phen)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>3+</sup> complex with biological models; association to transporting proteins. *J. Inorg. Bioch.*, Argentina, 2011; 105:645–651.
- Velarde M. G., NEKORKIN V. I., KAZANTSEV V. B., MAKARENKO V. I., LLINÁS R. Modeling inferior olive neuron dynamics. *Neural Net.* 2002; 15, 5–10
- WATANABE, H. *et al.* Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants. *Biochem. J. (Japan)*, 2001; 357:269-274,.
- WU, X. *et al.* Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain IIA. *Spectrochim. Acta, Part A*, 2011; 79:1202– 1209,
- WYMORE, A.W. 1993. *Model-Based Systems Engineering*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Inc.
- ZHAO Z. Parametric and nonparametric models and methods in financial econometrics. *Statistics Surveys* 2008; 2: 1–42.