

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências Instituto de Matemática e Estatística

Juliana de Almeida Silva

Modelagem matemático-computacional para análise de dados espectrofluorimétricos e localização de sítios de ligação em albumina sérica

Rio de Janeiro

Juliana de Almeida Silva

Modelagem matemático-computacional para análise de dados espectrofluorimétricos e localização de sítios de ligação em albumina sérica

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

> Rio de Janeiro 2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

S586	 Silva, Juliana de Almeida. Modelagem matemático-computacional para análise de dados espectrofluorimétricos e localização de sítios de ligação em albumina sérica/ Juliana de Almeida Silva – 2019. 62 f. : il.
	Orientadores: Célia Martins Cortez Silva e Dilson Silva. Dissertação (Mestrado em Ciências Computacionais) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Matemática e Estatística.
	1. Albumina - Teses. 2. Modelos matemáticos - Teses. 3. Espectrofluorimetria - Teses. 4. Espectroscopia de fluorescência – Teses. I. Silva, Célia Martins Cortez. II. Silva, Dilson. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Matemática e Estatística. IV. Título.
	CDU 576.851

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

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

Assinatura

Juliana de Almeida Silva

Modelagem matemático-computacional para análise de dados espectrofluorimétricos e localização de sítios de ligação em albumina sérica

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

Aprovada em 25 de fevereiro de 2019. Banca Examinadora:

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

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

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

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que sempre esteve presente na realização dos meus sonhos. Um alicerce constante na construção dos meus objetivos. Base de grandes ensinamentos e inspirações. Por todos os momentos de carinho incentivador e por me conduzir para grandes conquistas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por esta conquista. Por me permitir e conceder alcançar esse objetivo;

Aos meus pais, Jurandir e Ledicelma, por todo o amor e zelo a mim dedicados. Por me ensinarem os passos que devo seguir e, principalmente por caminharem comigo;

Ao meu irmão pelo incentivo, pelas palavras e pelo carinho a todo instante. Por trilhar um caminho ao meu lado com alegria e conquistas de sonhos;

Aos professores e mestres, por todo conhecimento compartilhado. Pela dedicação em transformar dúvidas em compreensão e aprendizados.

Aos professores Celia Martins Cortez Silva e Dilson Silva, pelo empenho em me orientar na elaboração deste trabalho. Por toda dedicação, atenção e conhecimentos transmitidos ao longo de todo projeto. Por transformarem ideias em palavras;

Ao meu namorado Felipe por todo incentivo e momentos dispensados em me ajudar na conquista desse objetivo. Por todos os dias de caminhada juntos;

Neste momento os agradecimentos são inúmeros. A todos que direta ou indiretamente permearam o percurso de alegrias, vitórias e conquistas e que fazem parte dessa trajetória.

Nossa vida individual não encontra seu sentido nela mesma, assim como o conjunto dos números inteiros só encontra seu significado num conjunto maior de números fracionários; e estes, nos números reais, chegando assim a conjuntos cada vez mais abrangentes. Só conseguiremos explicação para nossa vida quando nos inserimos em outras vidas e em sua totalidade: Deus. E se não priorizarmos o sentido da vida, todo o resto que deveria ser acréscimo – mas que consideramos objeto principal de nossa procura – nos será negado, porque jamais satisfará nossa voracidade e nossos desejos.

São Tomás de Aquino

RESUMO

SILVA, Juliana de Almeida. *Modelagem matemático-computacional para análise de dados espectrofluorimétricos e localização de sítios de ligação em albumina sérica*. 2019. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Computacionais) – Instituto de Matemática e Estatística, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O objetivo deste trabalho foi elaborar um modelo matemático computacional para analisar dados oriundos de experimentos espectrofluorimétricos, visando, especialmente, à localização de sítios de ligação para ligantes em albuminas humana (HSA) e bovina (BSA). O modelo foi baseado na geometria referente ao posicionamento do sítio em relação aos resíduos de triptofano presentes na molécula protéica, além de considerar as semelhanças/diferenças estruturais entre essas duas proteínas. Para testar o modelo, usamos dados obtidos em experimentos de supressão da fluorescência de três fármacos antipsicóticos: risperidona, clorpromazina e haloperidol, e duas substâncias pesticidas: metilparation e glifosato. De acordo com o nosso modelo, os valores encontrados para as distâncias médias entre o resíduo triptofano 212 e os sítios de ligação para as cinco substancias testadas foram, respectivamente: $2.59(\pm 0.92)$ nm, $2.65(\pm 1.06)$ nm, $2.52(\pm 0.97)$ nm, $2.89(\pm 1.49)$ nm, $3.15(\pm 2.00)$ nm. Para as distâncias médias do resíduo de triptofano 134 aos mesmos sítios foram: 2,25(±0,80) nm, 2,37(±0,94) nm, 2,74(±1,05) nm, 3,01(±1,55) nm, 3,02(±1,97) nm respectivamente. Esses valores estão compatíveis com as dimensões dos domínios proteicos e com isso o projeto desenvolvido apresenta resultados eficazes neste avanço da pesquisa de localização de sítios de ligação primários na interação de fármacos às proteínas em estudo.

Palavras-chave: Modelagem matemático-computacional. Sítios de ligação. Espectrofluorimetria. Albuminas, antipsicóticos, pesticidas.

ABSTRACT

SILVA, Juliana de Almeida. *Mathematical-computational modeling for spectrofluorimetic data analysis and localization of binding sites in serum albumin.* 2019. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Computacionais) – Instituto de Matemática e Estatística, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The aim of this work was to elaborate a computational mathematician model to analyze data from spectrofluorimetric experiments, directing, in particular, for the localization of binding sites for human (HSA) and bovine (BSA) albumins. The model was based on the geometry related to the positioning of the site in relation to the residues of tryptophan present in the protein molecule, besides considering the similarities/structural differences between these two proteins. To test the model, we used data obtained from fluorescence quenching experiments of three antipsychotic drugs: risperidone, chlorpromazine and haloperidol, and two pesticides: methyl parathion and glyphosate. According to our model, the values found for mean distances between the tryptophan 212 residue and the binding sites for the five substances tested were: 2.59 (± 0.92) nm, 2.65 (± 1.06) nm, 2.52 (± 0.97) nm, 2.89 (± 1.49) nm, 3.15 (± 2.00) nm. For the average distances of the tryptophan 134 residue at the same sites were: 2.25 (± 0.80) nm, 2.37 (± 0.94) nm, 2.74 (± 1.05) nm, 3.01 (± 1.55) nm, $3.02 (\pm 1.97)$ nm respectively. These values are compatible with the dimensions of the protein domains and thus the project developed presents effective results in this advance of the search of location of primary binding sites in the interaction of drugs to the proteins under study.

Keywords: Mathematic-computational modeling. Binding sites. Espectrofluorimetry. Albumins, antipsychotic drugs, pesticides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	1 - Relação entre farmacocinética e farmacodinâmica	17
Figura	2 - Representação do arcabouço proteico da albumina sérica humana	19
Figura	3 - Representação do arcabouço proteico da albumina sérica bovina	21
Figura	4 - Diagrama de Jablonski	25
Figura	5 - Diagrama de Jablonski modificado	26
Figura	6 - Estruturas químicas dos três aminoácidos fluorescentes	27
Figura	7 - Exemplos de não linearidade do gráfico de Stern-Volmer	32
Figura	8 - Diagrama completo das atividades na modelagem matemática	34
Figura	9 - Representação esquemática do registro da fluorescência da BSA	36
Figura	10 - Sítio de ligação do supressor (Q) e os resíduos de TRP, T_1 e T_2	39
Figura	11 - Representação de possíveis posições para o sítio de ligação do supressor	
	(Q) em relação aos triptofanos	41
Figura	12 - Visão geral do software desenvolvido executando análise	44
Figura	13 - Distâncias r_1 e r_2 em função do ângulo θ , para valores arbitrários $\ldots \ldots$	45
Figura	14 - Distâncias r_1 e r_2 em função do ângulo θ , para a interação do fármaco ris-	
	peridona com a BSA, a 25 ºC	47
Figura	15 - Distâncias r_1 e r_2 em função do ângulo θ , para a interação do fármaco clor-	
	promazina com a BSA, a 25 ºC	48
Figura	16 - Distâncias r_1 e r_2 em função do ângulo θ , para a interação do fármaco ha-	
	loperidol com a BSA, a 25 °C	48
Figura	17 - Distâncias r_1 e r_2 em função do ângulo θ , para a interação do pesticida	
	metilparation com a BSA, a 25 °C	49
Figura	18 - Distâncias r_1 e r_2 em função do ângulo θ , para a interação do pesticida	
	glifosato com a BSA, a 25 ºC	49

LISTA DE TABELAS

Tabela	1 - Estrutura primária das albuminas séricas bovina (BSA) e humana (HSA)	20
Tabela	2 - Constantes de ligação de substâncias endógenas à albumina sérica humana	23
Tabela	3 - Valores médios da razão $\frac{r_1}{r_2}$	46
Tabela	4 - Valores médios de r_1 e r_2 e as médias das diferenças $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Bovine Serum Albumin (albumina sérica bovina)
IC	Conversão Interna
ISC	Cruzamento intersistemas
Cys	Cisteína
HSA	Human Serum Albumin (albumina sérica humana)
kDa	Quilodalton
pН	Potencial Hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
VR	Relaxação Vibracional
Trp	Triptofano
Trps	Triptofanos
Tyr	Tirosina
Alb	Albumina
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

μM	Micromolar
nm	Nanômetro
mg	Miligrama
Å	Ångström
^o C	Grau Celsius
Μ	Molar
\$	Segundo
<i>S</i> ₀	Estado singleto fundamental
S_1	Estado singleto primeiro
S_2	Estado singleto segundo
T_1	Estado tripleto primeiro
S_n	Estado excitado de singleto
T_n	Estado excitado de tripleto
$[F^*]$	Concentração do estado excitado
t	Tempo
γ	Taxa de decaimento do fluoróforo na ausência de supressor
k_q	Constante de velocidade biomolecular de supressão
[Q]	Concentração de supressor
$k_q[Q]$	Taxa de decaimento adicional
$ au_0$	Tempo de vida médio das biomoléculas na ausência de supressor
τ	Tempo de vida médio das biomoléculas na presença de supressor
F_0	Intensidade de fluorescência na ausência de supressor
F	Intensidade de fluorescência na presença de supressor
Γ	Taxa radioativa
<i>k</i> _{nr}	Taxa de decaimento não-radioativo
K_S	Constante de Stern-Volmer
r	Distância do sítio de ligação do supressor na albumina ao triptofano
R_0	Distância de Föster em transferência de energia de ressonância
$ au_D$	Tempo de difusão em espectroscopia de correlação de fluorescência
f(t)	Função de excitação constante
F_{Alb}	Fluorescência total emitida pela albumina
F_{T_i}	Fluorescência emitida pelo resíduo de triptofano i
F_{BSA}	Fluorescência emitida pela albumina sérica bovina
F_B	Fluorescência emitida pela albumina sérica bovina
F_{B_0}	Fluorescência emitida pela albumina sérica bovina na ausência de supressor
F_{HSA}	Fluorescência emitida pela albumina sérica humana

F_H	Fluorescência emitida pela albumina sérica humana
F_{H_0}	Fluorescência emitida pela albumina sérica humana na ausência de supressor
$F_{Alb} Q$	Fluorescência remanescente após adição de supressor a concentração Q
x_i	Taxa de supressão de fluorescência do triptofano i
K_B	Constante de Stern-Volmer para a albumina sérica bovina
K_H	Constante de Stern-Volmer para a albumina sérica humana
D	Distância entre os resíduos de triptofano
$ heta_j$	Possíveis ângulos entre os segmentos $r_1 eD$
heta	Ângulo entre os segmentos $r_1 eD$

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	O ESTUDO DAS ALBUMINAS	16
1.1	Albumina sérica humana (Human Serum Albumin - HSA) 🛛	18
1.2	Albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin - BSA)	19
1.3	Sítios de ligação nas albuminas	22
2	FENÔMENO DE FLUORESCÊNCIA MOLECULAR	24
2.1	Espectroscopia de fluorescência e fluorescência das proteínas	26
2.2	Supressão de fluorescência	28
2.2.1	Equação de Stern-Volmer e a constante de Stern-Volmer (constante bimolecular)	_ 29
3	MODELAGEM MATEMÁTICO-COMPUTACIONAL E A DESCRIÇÃO DO MO-	
	DELO	33
3.1	A espectroscopia	35
3.1.1	Distâncias dos resíduos de TRP ao sítio de ligação	38
4	DESENVOLVIMENTO DA IMPLEMENTAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO .	42
5	RESULTADOS	45
6	DISCUSSÃO	50
	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICE – Algoritmos	58

INTRODUÇÃO

A pesquisa na área da Biomatemática, assim como em diversos setores da interdisciplinaridade, encontra-se em desenvolvimento, à medida que proporciona avanços nos estudos relacionados a uma área específica, relacionando suas particularidades visando a um objetivo específico. Ao abranger diversos domínios, essa inter-relação da Biologia com a Matemática se mostra como um trajeto para os objetivos do estudo desejado, não retirando suas singularidades, mas contribuindo, desenvolvendo ferramentas durante toda a evolução da pesquisa (MELNIK, 2015; INGALLS, 2012).

Assim, os sistemas biológicos têm encontrado na modelagem matemático-computacional um caminho para elucidar muitos dos seus fenômenos impossíveis de entendimento e previsões através de outros meios (MORAIS E COURA et al., 2016; CARQUEJA; CORTEZ, 2014; CORTEZ; BISCH, 1995; SANCHES; JAFELICE, 2004; DINIZ; SANTOS, 1997).

A atual complexidade e grande importância da localização dos sítios de ligação das albuminas séricas humana e bovina para as pesquisas em farmacologia, no que diz respeito ao transporte de substâncias pelo organismo mostra-se como fator motivacional da escrita que tem como objetivo desenvolver um ambiente computacional capaz de representar o modelo de Stern-Volmer visando a localização dos sítios de ligação primários através do estudo de um modelo geométrico integrado ao fenômeno de supressão de fluorescência na albumina.

Neste projeto, foram trabalhados dados advindos da Farmacologia e Toxicologia, campos biológicos que pesquisam os processos de substâncias químicas. A Farmacologia pode ser definida como o estudo de substâncias que interagem com sistemas vivos por meio de processos químicos, principalmente por ligação a moléculas reguladoras e ativação e inibição de processos corporais normais. A toxicologia é o ramo da farmacologia que lida com os efeitos indesejáveis de produtos químicos sobre sistemas vivos, desde células individuais de seres humanos até ecossistemas complexos (MOREAU; DE SIQUEIRA, 2016; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2011). No primeiro capítulo desse trabalho encontram-se mais descrições acerca desse assunto, assim como o estudo das albuminas.

No capítulo 2 falaremos sobre a supressão de fluorescência, técnica de fluorimetria foco da nossa modelagem. O fenômeno observado através dos espectros obtidos com essa técnica pode ser representado pela equação de Stern-Volmer (LAKOWICZ, 2006), a qual é usada em nossa modelagem matemática como um passo para alcançar o objetivo do presente estudo: localização de sítios de ligação para ligantes em albuminas séricas humana (HSA) e bovina (BSA).

Já o capítulo 3 discorre sobre a modelagem matemática aqui desenvolvida e que objetiva à análise de dados oriundos de experimentos que tem como base medidas de alterações na fluorescência emitida por proteínas séricas, quando estas interagem com algum ligante (endógenos e exógenos). Com a fluorimetria é possível gerar espectros de luminescência gerados por substâncias biológicas em seu estado excitado, devido à presença de um ou mais fluoróforos (componentes fluorescentes da molécula) em sua estrutura (LAKOWICZ, 2006). Esse fenômeno físico é representado pelo gráfico de Jablonski, também apresentado neste capítulo, juntamente a descrição do modelo, que objetiva a fundamentação para abordagem biológica do nosso estudo (LAKOWICZ, 2006).

Os passos da implementação do modelo matemático construído neste projeto são descritos no quarto capítulo, além de mostrar o software desenvolvido para atender a esse modelo, bem como suas ferramentas e formas de utilização.

Ao final, são contemplados nos capítulos 5 e 6, respectivamente, os resultados e discussões abordados nessa pesquisa. O primeiro mostrando dados encontrados após os testes realizados no software implementado e, o segundo, relatando como esses dados legitimam o que foi desenvolvido durante a pesquisa.

Na composição das albuminas podem ser encontrados três amoniácidos fluoróforos; o triptofano (Trp), a tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe), cujos picos de emissão de fluorescência ocorrem em diferentes faixas de comprimento de onda. O fluoróforo de importância no estudo da supressão da fluorescência é o Trp, que emite fluorescência natural em comprimentos de onda entre 290 e 295 nm, já que as albuminas apresentam um número reduzido de resíduos deste aminoácido (um, dois...) (LAKOWICZ, 2006). A HSA apresenta apenas um resíduo de Trp, na posição 214 da seqüência de aminoácidos (no subdomínio IIA), enquanto na BSA são encontrados dois resíduos, nas posições 134 (no subdomínio IB) e 212 (no subdomínio IIA) (KRAGH-HANSEN, 1981; RANG et al., 2004). Essa diferença entre as duas albuminas tem sido usada como um parâmetro para a análise das características de sítios de ligação de um ligante à albumina (SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a; SILVA et al., 2004b; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010).

No presente trabalho é possível observar um exemplo de Modelagem Matemática e Computacional, instrumentalizando a interdisciplinaridade entre Biologia, Computação e Matemática e auxiliando na manipulação das informações para as análises correntes, formando uma base para a discussão de resultados e tirar conclusões sobre o fenômeno estudado.

1 O ESTUDO DAS ALBUMINAS

Neste capítulo, discorre-se fundamentalmente sobre revisões de pesquisas, as quais relatam com mais ênfase a parte biológica abordada nesse trabalho. O estudo das albuminas, assim como as primeiras publicações referentes a esse estudo, data do final do século XIX, aumentando volumosamente no século XX com dezenas de trabalhos a cada ano. Nesse percurso diversas descobertas relacionadas a sua estrutura e atuação são apresentadas, podendo citar a similaridade nas estruturas das albuminas humana e bovina (GONCHAROV et al., 2017).

Em animais superiores, as proteínas são os compostos orgânicos mais abundantes, representam cerca de 50 % do peso seco dos tecidos. Do ponto de vista funcional, seu papel é fundamental, não existindo processo biológico que não dependa da presença ou da atividade deste tipo de biomolécula. As proteínas desempenham inúmeras funções distintas, como por exemplo: enzimas, hormônios, proteínas transportadoras, anticorpos e receptores de muitas células (GÓES FILHO; LOURO, 2005).

As proteínas são formadas através de ligações peptídicas entre os diversos tipos de aminoácidos podendo ser classificadas em: globulares (as cadeias de aminoácidos se voltam sobre elas mesmas) e fibrosas (as cadeias de aminoácidos se ordenam paralelamente) (GÓES FILHO; LOURO, 2005).

A proteína albumina sérica humana (HSA) é um dos componentes mais abundante no plasma sanguíneo humano, possuindo volume médio em torno de 500 – 700 μ M. É sintetizada no fígado, pelos hepatócitos, a uma taxa de cerca de 0,7 mg por hora (isto é, 10-15 mg por dia); a meia-vida da HSA é de 19 a 20 dias (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2011).

Uma importante propriedade da albumina é sua capacidade de ligar-se reversivelmente a uma grande variedade de ligantes. A organização estrutural globular da HSA dá a possibilidade de se ligar com várias substâncias em múltiplos sítios da molécula. Desempenha importante função de transporte de substâncias no sangue, como hormônios, sais, vitaminas, lipídios e etc. As propriedades ligantes da albumina, como proteína de transporte, incluem afinidades por ácidos graxos, metais e íons, hormônios endógenos e substâncias exógenas ao plasma sanguíneo (FANALI et al., 2009; FASANO et al., 2005; PETERS, 1996; KRAGH-HANSEN, 1981).

As proteínas também auxiliam em torno de 80 % na manutenção da pressão osmótica dos tecidos e do balanço ácido-básico (pH do sangue), além de representarem uma fonte de reserva energética para todos os tecidos, na ausência de ingestão adequada (KRAGH-HANSEN, 1981). Outra importante função fisiológica da albumina é manter a pressão osmótica coloidal do sangue (pressão osmótica exercida pelas proteínas plasmáticas, sendo a pressão osmótica caracterizada pela passagem de um líquido por uma membrana semipermeável do lado mais diluído para o mais concentrado). Conforme mencionado, a alta concentração plasmática de albumina contribui para transporte, distribuição e armazenamento de várias substâncias endógenas (produzidas dentro do organismo) e exógenas (produzidas fora do organismo) de baixa solubilidade em água, tendo 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 seus efeitos adversos e toxicidade (FANALI et al., 2009; FASANO et al., 2005).

A ligação da HSA também afeta a farmacocinética e a eficácia de muitas drogas. Ao ligar drogas e substâncias tóxicas, a albumina determina em grande parte sua farmacocinética e toxicocinética, através do transporte para tecidos alvos ou locais de sua biotransformação. A Figura 1 mostra um esquema sintetizando a relação farmacocinética e farmacodinâmica, representando as etapas da biodistribuição dos fármacos nos tecidos e as respostas clínicas possíveis. O estudo da farmacologia e toxicologia aqui associados, proporciona a observação desses efeitos baseados nas duas áreas da farmacologia: farmacocinética e farmacodinâmica. Na farmacocinética acompanha-se a administração, entrada, distribuição e eliminação do fármaco no organismo observando as interações das concentrações durante todo o processo. Já na farmacodinâmica, tem-se as ações dos fármacos no organismo, isto é, os efeitos dessa(s) concentração(ões) ao longo da metabolização (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2011).



Figura 1 - Relação entre farmacocinética e farmacodinâmica

Fonte: Katzung, Masters e Trevor, 2011.

1.1 Albumina sérica humana (Human Serum Albumin - 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 kDa. A albumina humana é uma proteína versátil. Cada molécula dessa proteína pode carregar sete moléculas de ácidos graxos, que se ligam a fendas profundas na proteína (KRAGH-HANSEN, 1981).

A albumina é composta de vários segmentos em alfa hélice. 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 da albumina é conservadora em todos os mamíferos. A molécula consiste em três domínios homólogos (I, II e III), com padrão helicoidal similar, que são arranjados em formato de um triângulo equilátero. Cada domínio contém 10 hélices, sendo dividido em seis hélices antiparalelas e dois subdomínios (A e B), ligados por pontes dissulfeto (TA-VIRANI 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 2 (BER-TUCCI; DOMENICI, 2002; FASANO et al., 2005; FANALI et al., 2009; PETERS, 1996; PETITPAS et al., 2001). Três pares idênticos destes subdomínios se unem para formar a albumina.

A Figura 2, na página 19, mostra um modelo representativo da estrutura molecular da HSA, onde podem ser identificados os três domínios e seu único TRP, assinalado 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 dois quais uma grande variedade de compostos pode ser acomodada (PETERS, 1996).

A albumina sérica humana contém 585 resíduos de aminoácidos possuindo características específicas que são importantes para a estrutura e função da albumina. Apresenta 18 resíduos de tirosina, 6 resíduos de metiolina, 59 resíduos de lisina, 35 resíduos de cisteína e um grupo sulfidrila livre na cisteína da posição 34 (Cys 34) e um resíduo de Trp, ao longo da cadeia, na posição 214 (Trp 214) no subdomínio IIA. O grupo sulfidrila livre não participa da ligação com nenhum ligante externo. Todos os outros resíduos de cisteína formam 17 pontes dissulfídricas, 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 gera domínios e subdomínios em três α -hélices contíguas em paralelo, que confere às albuminas as características típicas das suas estruturas



Figura 2 – Representação do arcabouço proteico da albumina sérica humana

Legenda: Destaque da localização do resíduo de triptofano na albumina humana (HSA). Fonte: Motta et al., 2017.

secundária e terciária (WU et al., 2011).

1.2 Albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin - BSA)

Das albuminas disponíveis no mundo, a do soro bovino – Albumina Sérica Bovina (BSA), do inglês *bovine serum albumin* – tem sido utilizada em larga escala nos estudos biomiméticos quando se necessita de uma proteína genérica. Sua estabilidade, disponibilidade, baixo custo e semelhança estrutural com a HSA são fatores que contribuem enfaticamente para o aumento de seu uso em pesquisas para complementar estudos da albumina sérica humana.

Em nível estrutural, conforme pode ser visto na Tabela 1, comparativamente a BSA possui uma cisteína livre e dois resíduos de triptofano, enquanto a HSA possui a cisteína livre na mesma posição da cadeia que a BSA, mas com apenas um resíduo de triptofano. Nesse sentido, a proteína bovina apresenta uma sequência homóloga de 80% e similaridade

Aminoácido	BSA	HSA
Cisteina	35	35
Acido aspártico	41	36
Acido glutâmico	59	62
Alanina	46	62
Arginina	23	24
Asparagina	13	17
Fenilalanina	27	31
Glicina	16	12
Glutamina	20	20
Histidina	17	16
lsoleucina	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
Total	582	585
Nº de átomos de Nitrogênio	779	786

Tabela 1 – Estrutura primária das albuminas

séricas bovina (BSA) e humana (HSA)

Fonte: Motta et al., 2017.

da estrutura terciária de 76% quando comparada à humana (KRAGH-HANSEN, 1981).



Figura 3 – Representação do arcabouço proteico da albumina sérica bovina

Legenda: Destaque da localização dos resíduos de triptofano na albumina bovina (BSA). Fonte: Motta et al., 2017.

Conforme Silva et al. (2010a) 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. Conforme pode ser observado nas Figuras 2 e 3, enquanto 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 – assunto objeto do trabalho.

1.3 Sítios de ligação nas albuminas

Os sítios de ligação são um dos mais importantes campos da biologia no que se refere às pesquisas sobre a interação entre as macromoléculas. Dentro da farmacocinética, é de notável importância a localização e determinação de sítios de ligação na HSA, tendo em vista a maior eficiência e eficácia no transporte de fármacos (FRAGOSO et al., 2012; FRA-GOSO et al., 2016; CORTEZ et al., 2012; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a). Os fármacos se ligam em diferentes proporções às proteínas plasmáticas e desses sítios proveem informações relevantes sobre o transporte e o metabolismo das moléculas no corpo. Essa ligação é uma medida de afinidade do fármaco pelas proteínas do plasma, especialmente pela albumina.

É proveniente dessa abordagem o embasamento para pesquisas relacionadas ao grau de afinidade de qualquer ligante exógeno, sendo que a maior parte desses ligantes se fixam primariamente a uns poucos sítios com alta afinidade (sítios primários de ligação) – podendo existir mais de um desses sítios para um determinado ligante (MORAIS E COURA et al., 2016; FRAGOSO et al., 2012; CORTEZ et al., 2012; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a) e a um número maior de sítios de baixa afinidade, esses podendo surgir após a ocupação do(s) primário(s) (LAKOWICZ, 2006).

Um dos fatores mais importantes que afetam a distribuição e a concentração ativa de muitas drogas no organismo é a afinidade pela HSA. Um grau de afinidade pela albumina é desejável para ajudar a solubilizar substâncias que de outra forma poderiam agregar-se e ser pobremente distribuídas. Para se ligar, a albumina pode exibir afinidade muito alta, mas também pode mostrar alta taxa de dissociação sob certas condições (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2011).

Estudos mostram que duas regiões da HSA contém sítios de ligação de alta afinidade, responsáveis pelas ligações das várias substâncias à albumina. De acordo com Sudlow, Birkett e Wade (1976), compostos aromáticos e heterocíclicos com pequeno volume limitam-se aos subdomínios II e III, preferencialmente no sítio conhecido como Sudlow I (localizado no subdomínio IIA) (HE; CARTER, 1992; PETERS, 1996). Já os compostos carboxilados aromáticos apresenta maior afinidade no sítio conhecido como Sudlow II (localizado no subdomínio IIIA) (FANALI et al., 2009; WU et al., 2011).

Observa-se também que nessas regiões de ligação pode haver um deslocamento de um ligante A por um ligante B indicando ligação na mesma região, por competição, ocasionando bloqueio competitivo de sítios idênticos e de sítios superpostos quando a proteína é exposta a mais de um ligante. Esses resultados fornecem fortes evidências da existência de mais regiões de ligação na molécula de albumina.

A Tabela 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.

				Constante de equilíbrio
Ligante	\mathbf{n}_{1}^{*}	pН	Temp. (°C)	da ligação (M ⁻¹)
Bilirrubina	1	7,40	37	5,5 X 10 ⁷
Cortisol	2	7,40	37	5,0 X 10 ³
Hemina	1	7,50	23	5,0 X 10 ⁷
Palmitato	2	7,45	23	6,0 X 10 ⁷
Oleato	2	7,45	23	1,1 X 10 ⁸
Progesterona	1	7,40	4	$3,6 \ge 10^5$

Tabela 2 – Constantes de ligação de substâncias endógenas à albumina sérica humana

* n_1 é o número de sítios primários (VERBEECK et al., 1983) Fonte: Motta et al., 2017.

2 FENÔMENO DE FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

A fluorescência é um fenômeno físico de luminescência (emissão de luz por alguma substância ocorrendo a partir de estados eletrônicos excitados) num sistema que absorve energia eletromagnética e a reemite sob a forma de energia luminosa, no intervalo de tempo muito curto, com modificação do comprimento de onda, que lhe é característico da radiação luminosa (na maioria dos casos um comprimento de onda maior). É perceptível quando a luz incidente está na faixa do ultravioleta (invisível ao olho humano) e a luz emitida no espectro visível (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981).

Formalmente, a luminescência molecular é dividida em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. A fluorescência é a capacidade de uma substância de emitir luz se exposta a radiações específicas: ultravioleta (UV), raios X ou raios catódicos (LAKOWICZ, 2006). Segundo 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 que a radiação incidente, que é a excitante, e a fluorescência pode ocorrer dentro da faixa de luz visível aos olhos humanos ou na faixa invisível, do ultravioleta.

A emissão de luz na fluorescência ocorre a partir de um estado excitado singleto, onde o elétron excitado não muda a orientação do *spin*, sendo permitido então o retorno ao estado fundamental. Já na fosforescência essa emissão de luz ocorre a partir de um estado excitado tripleto, onde o elétron excitado muda a orientação do spin, portanto, não é possível o retorno ao estado fundamental. Esse processo ocorre com as taxas de emissão compreendidas na faixa de $10^{-3} - 10^{0}$ s, mais lentas que na fluorescência envolve as transições de estado, ilustradas simplificadamente pelo modelo proposto pelo professor Aleksander Jablonski (1898 – 1980) na década de 1930 representadas no Diagrama de Jablonski (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981).

Esses diagramas, conhecidos também como Diagramas de Perrin-Jablonski, desempenham papéis importantes como instrumentos no estudo e descrição de processos de absorção e emissão de luz tais como absorção de fóton, conversão interna, cruzamento intersistema, fosforescência, transições tripleto-tripleto e fluorescência. É uma ferramenta que ajuda na melhor visualização nas interações de supressão, energia de transferência e interação com o solvente (LAKOWICZ, 2006; KRAGH-HANSEN, 1981).

Na Figura 4, as linhas verticais descrevem as transições entre os estados eletrônicos para ilustrar sua natureza instantânea da absorção da luz, da ordem de 10⁻¹⁵ segundos. Devido a incidência e absorção de luz, a substância luminescente fica excitada e passa a vibrar Figura 4 – Diagrama de Jablonski



Fonte: Lakowicz, 2006.

em níveis energéticos mais altos. Observa-se no diagrama da Figura 4, os estados eletrônicos singletos – fundamental (S_0), primeiro (S_1) e segundo (S_2). Em cada um desses níveis energéticos eletrônicos pode existir um conjunto de níveis energéticos vibracionais, denotados por 0, 1, 2, ... (GÓES FILHO; LOURO, 2005).

Conforme já explicitado e com a ilustração do diagrama da Figura 4 é possível reforçar que na fluorescência, os elétrons nos estados singleto (S_1) retornam rapidamente para o S_0 através da emissão de um fóton, com tempo de vida fluorescente de 10^{-8} segundos (EIS-BERG; RESNICK, 1985). Já na fosforescência, ocorre uma conversão interna na molécula do estado S_1 para o primeiro estado de *spin* tripleto 1 (T_1) seguindo um decaimento para o estado singleto fundamental. Esta transição envolve taxas de emissão pequenas e os tempos de vida são longos, da ordem de milissegundos a segundos, enquanto na fluorescência são da ordem de nanossegundos (LAKOWICZ, 2006).

Na Figura 5, apresentada na página 26 ,é feito um destaque dos estados singleto e tripleto dentro do Diagrama de Jablonski já observado anteriormente.

Um ponto que também pode ser observado no diagrama de Jablonski é que a energia de emissão é maior que a energia de absorção caracterizando o que já foi citado antes sobre o fenômeno da fluorescência o qual ocorre em energias menores ou comprimentos de onda maiores.

Vale ressaltar que a fluorescência, quando se encontra na faixa invisível aos olhos humanos, pode ser evidenciada através de técnicas específicas, usando equipamentos de fluorimetria (técnica de registro direto) ou técnicas especiais de captação de fluorescência.

De acordo com Lakowicz (1999) a fluorimetria engloba um conjunto de técnicas ana-



Figura 5 – Diagrama de Jablonski modificado



líticas baseadas na detecção dos fótons emitidos por moléculas excitadas enquanto 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.

2.1 Espectroscopia de fluorescência e fluorescência das proteínas

Numa análise espectroscópica ou espectrofluorimétrica, o espectro de emissão independe do comprimento de onda da excitação. A diferença entre os comprimentos de onda da fosforescência e da fluorescência é uma medida da diferença de energia entre os estados singleto e tripleto. Um espectro de emissão é uma curva de intensidade de fluorescência versus comprimento de onda, ilustrada no Diagrama de Jablonski (VALEUR, 2001).

A espectroscopia de fluorescência constitui um método poderoso para investigação das propriedades dinâmicas de interesse biológico (MORAIS E COURA et al., 2016; CORTEZ et al., 2012; SILVA et al., 2010a; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a). A fluorescência apresenta grandes vantagens quando comparada a outros métodos de espectroscopia, pois é muito sensível a vizinhança do fluoróforo, tem um amplo espectro de análise e o erro inerente à medição é praticamente constante em todo o intervalo de resposta. Quando comparado a métodos colorimétricos baseados na absorbância, técnicas fluorimétricas são muito mais sensíveis e seletivas.

Os fluoróforos emitem luz geralmente na faixa de comprimento de onda do espectro visível, ou seja, entre o infravermelho e o ultravioleta. Os fluoróforos são divididos em duas grandes classes: os intrínsecos e os extrínsecos. Fluoróforos intrínsecos são aqueles que emitem luz naturalmente. Já os extrínsecos são aqueles adicionados à amostra para desempenharem a função sonda (GÓES FILHO; LOURO, 2005).

Pode-se citar como as características mais importantes dos fluoróforos o tempo de vida de fluorescência e o rendimento quântico. Este, é a razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. A fluoresceína é um tipo de substância que apresenta uma emissão visivelmente brilhante devido ao grande rendimento quântico que ela possui. O tempo de vida de um fluoróforo determina o tempo disponível para este interagir com ou difundir-se no meio disponibilizando a informação de sua emissão (GÓES FILHO; LOURO, 2005).

Uma variedade de moléculas biológicas apresenta fluorescência intrínseca devido a presença de fluoróforo(s) em sua constituição. Em compostos orgânicos, o fenômeno da fluorescência ocorre tipicamente em estruturas aromáticas. A fluorescência natural das proteínas se deve a presença de resíduos de aminoácidos aromáticos fluorescentes, na sua estrutura primária. Dos vinte aminoácidos que podem compor as proteínas, apenas três possuem essa propriedade: triptofano, tirosina e fenilalanina. Esses três aminoácidos possuem estruturas com cadeia laterais aromáticas como mostrado na Figura 6.



Figura 6 - Estruturas químicas dos três aminoácidos fluorescentes

Legenda: Compostos orgânicos dos aminoácidos Triptofano, Tirosina e Fenilalanina. Nas cadeias aromáticas ocorre o fenômeno da fluorescência. Fonte: Motta et al., 2017. O triptofano é o aminoácido de maior fluorescência, sendo os resíduos deste aminoácido responsáveis por cerca de 90% da fluorescência total das proteínas e portanto é o resíduo mais usado como fluoróforo, já que apresenta maior rendimento quântico (maior relação entre a quantidade de energia emitida e a absorvida) quando interligados nas cadeias proteicas. A tirosina emite radiação fluorescente de alta intensidade quando pura em solução, mas a emissão dos seus resíduos nas proteínas é bem mais fraca que a do triptofano, além de acontecer muito próxima, em comprimento de onda, a da fenilalanina. Outro fator importante a citar é pautado na quantidade desses aminoácidos nas moléculas de albumina, já que se apresentam em maiores quantidades que o triptofano, fazendo com que este apresente maior eficácia como sonda natural. (SOUZA et al., 2000; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a; LAKOWICZ, 2006).

A supressão de fluorescência é uma técnica de espectroscopia que consiste no resultado do encontro difusivo entre fluoróforo e supressor durante o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo ocasionando a diminuição da intensidade de fluorescência (GÓES FILHO; LOURO, 2005). Na próxima sessão é abordado este assunto mais detalhadamente.

2.2 Supressão de fluorescência

A supressão de fluorescência é uma técnica da espectroscopia de fluorescência. Muito utilizada nas áreas Biológicas e Biomédicas, esta técnica se baseia na supressão ou diminuição de intensidade da fluorescência emitida na interação de uma substância fluorescente a uma outra substância adicionada dentro de uma mesma solução (GÓES FILHO; LOURO, 2005).

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 pode ser determinada, entre elas: a constante de supressão e associação, a formação de complexo, a competição por sítio de ligação e natureza e o número de sítios primários de ligação (MOTTA et al., 2017; SIMMONS et al., 2011; ARNOLD et al., 2012; CORTEZ et al., 2012; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010; SILVA; COR-TEZ; LOURO, 2004a; SILVA et al., 2004b), que contribuem para a formação do perfil farmacocinético da substância em estudo.

A supressão pode ocorrer por diferentes mecanismos. Dentre os vários processos moleculares capazes de gerar supressão da fluorescência pode-se citar: reações de estados excitados, transferência de energia, formação de complexo e a supressão por colisão (LA-KOWICZ, 2006). E, de uma forma geral, podem ser divididos em supressão dinâmica e supressão estática. A primeira é o resultado da colisão dos fluoróforos em estado excitado e o supressor, o qual desativa o fluoróforo, sendo a perda de energia devido a própria colisão. Já

na supressão estática há a formação de um complexo no estado fundamental, o que reduz a intensidade da emissão de fluorescência do fluoróforo.

Para diferenciar e distinguir qual supressão ocorreu num determinado processo é necessário analisar o espectro de absorção do fluoróforo. Na supressão colisional ou dinâmica só são afetados os estados excitados das substâncias fluorescentes e, contudo, nenhuma mudança será observada no espectro de absorção dessa supressão. Já na supressão estática, a formação do complexo resulta em perturbação do espectro de absorção do fluoróforo (LA-KOWICZ, 2006), alterando, portanto, os dados fluorimétricos.

Uma série de informações referentes a essa interação molecular pode ser determinada, entre elas: a constante de supressão e associação, a formação de complexo, a competição por sítio de ligação e natureza e o número de sítios primários de ligação (CARQUEJA; CORTEZ, 2014; SIMMONS et al., 2011; ARNOLD et al., 2012; CORTEZ et al., 2012; SILVA et al., 2010a; SILVA et al., 2010; SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a; SILVA et al., 2004b).

Conforme já mencionado, a temperatura influencia nas características das substâncias fluorescentes. Havendo um aumento de temperatura, os coeficientes de difusão das substâncias aumentam e dentre essas substâncias, o supressor, e, consequentemente aumenta a taxa de supressão dinâmica. Entretanto, esse aumento da temperatura leva à redução da estabilidade dos complexos, diminuindo a taxa de supressão do tipo estática.

A teoria da supressão da fluorescência por colisão é descrita pela equação de Stern-Volmer. Desta equação pode ser calculada a constante de Stern-Volmer ou de supressão (BHATTACHARYYA; CHAUDHURI; PODDAR, 1990), assunto abordado na próxima sessão.

2.2.1 Equação de Stern-Volmer e a constante de Stern-Volmer (constante bimolecular)

Sabe-se que a intensidade da fluorescência é proporcional à sua concentração no estado excitado [F*]. Então pode-se admitir que, sob iluminação contínua, a variação no tempo da população de fluoróforo será nula, isto é, $\frac{d[F^*]}{dt} = 0$, já na ausência e presença de um supressor, as equações diferenciais que descrevem a variação de [F*] no tempo são, respectivamente:

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - \gamma [F^*]_0 = 0, \tag{1}$$

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - (\gamma + k_q[Q])[F^*] = 0,$$
(2)

onde f(t) é a função de excitação constante e γ é a taxa de decaimento do fluoróforo na ausência do supressor. Na presença de um supressor, há 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.

A supressão por colisão é um processo proporcional ao esvaziamento dos estados excitados e, então o tempo de vida do fluoróforo na ausência (τ_0) e na presença (τ) do supressor podem ser descritos por:

$$\tau_0 = \gamma^{-1},\tag{3}$$

$$\tau = (\gamma + k_q[Q])^{-1},\tag{4}$$

sendo, então,

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0[Q]. \tag{5}$$

Na Equação 5 uma importante característica da supressão por colisão é ilustrada um decréscimo equivalente na intensidade da fluorescência e no tempo de vida. Essa diminuição do tempo de vida ocorre devido ao decréscimo da população do estado excitado ocasionado pela colisão. A supressão estática não reduz esse tempo porque somente as moléculas fluorescentes são observadas. Nesse tipo de supressão, remove-se uma fração da fluorescência composta pelos fluoróforos que estão envolvidos na formação do complexo não fluorescente onde este absorve luz e retorna imediatamente ao estado fundamental sem emissão de fóton, sendo

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau}.$$
(6)

A medida dos tempos de meia-vida de fluorescência é o método mais adequado para a definição do tipo de supressão (MOTTA et al., 2017).

Considerando que γ é o inverso do seu tempo de meia vida (τ_0), isto é, $\gamma = (\tau_0)^{-1}$. Na ausência de supressão, a população de estados excitados decai com uma taxa de $\gamma = \Gamma + k_{nr}$, onde Γ é a taxa radioativa e k_{nr} a taxa de decaimento não-radioativo. Sendo k_q a divisão da Equação 2 pela Equação 1, obtem-se:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\gamma + k_q[Q]}{\gamma} = 1 + \frac{k_q}{\gamma}[Q],\tag{7}$$

onde F_0 e F são as intensidades da fluorescência emitida, respectivamente, na ausência e presença do supressor e k_q é a constante bimolecular de supressão.

A Equação 7 é a equação de Stern-Volmer, que pode ser obtida considerando a fração de fluoróforos excitados que decaem por emissão em relação ao total. Portanto, a fração $\frac{F_0}{F}$ é obtida pela razão entre a taxa de decaimento na presença do supressor ($\gamma = k_q[Q]$) e a taxa de decaimento na ausência do supressor (γ).

Considerando $\gamma = (\tau_0)^{-1}$, a equação de Ster-Volmer pode ser escrita na forma:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0[Q] = 1 + K_S[Q],$$
(8)

ou ainda:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0[Q], \tag{9}$$

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q].$$
(10)

E K_S pode ser chamada, de uma forma geral, de constante de Stern-Volmer. A equação 10 é uma equação linear e, portanto, K_S corresponde ao coeficiente angular do gráfico linear de Stern-Volmer.

As medidas de supressão são geralmente representadas em um gráfico de $\frac{F_0}{F}$ versus [Q] e espera-se que $\frac{F_0}{F}$ seja linearmente dependente da concentração do supressor. Um ajuste linear é indicado quando existe uma classe única de fluoróforos, estando todos acessíveis ao supressor (SILVA; CORTEZ; LOURO, 2004a; SILVA et al., 2004b).

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. A Figura 7 exemplifica casos de não linearidade do gráfico de Stern-Volmer. Na Figura 7a mostra-se o gráfico de Stern-Volmer para supressão da lisozima, quando suprimida pela trifluoroacetamida, que, devido a acessibilidade fracionada a duas populações de fluoróforos, exibe uma curvatura para baixo (LA-KOWICZ, 2006).

Outra situação em que a linearidade não é presente é mostrado na Figura 7b, quando há ocorrência de supressão combinada, isto é, colisional (colidindo com o supressor) e estática (formando complexos) ao mesmo tempo. Neste caso, a equação de Stern-Volmer é modificada possuindo então, um termo não linear, de segunda ordem em [Q]. Portanto, o gráfico gerado apresenta uma concavidade positiva na curva.



Figura 7 – Exemplos de não linearidade do gráfico de Stern-Volmer

Legenda: (a) – Exemplo de acessibilidade fracionada na supressão lisozima pela trifluoroacetamida, apresentando uma curvatura para baixo e (b) – gráfico da concentração de supressor [Q] pela razão de variação de fluorescência F_0/F em caso de uma supressão combinada, ou seja, supressão dinâmica e estática ocorrendo em um mesmo grupo fluoróforo, apresentando concavidade para cima.

Fonte: Lakowicz, 2006.

3 MODELAGEM MATEMÁTICO-COMPUTACIONAL E A DESCRIÇÃO DO MODELO

A modelagem matemático-computacional é uma ferramenta multidisciplinar de notório crescimento e grande abrangência de aplicação nos estudos da fenomenologia de áreas como Humanas, Engenharias, Economia, Ciências Ambientais, Ciências Exatas e Biológicas. Ao simular soluções para problemas científicos, desenvolve modelos matemáticos que, após análise de adequação, pode ser descrito em linguagem computacional com o objetivo de trazer validação a um processo de modelagem. A modelação é a essência da ciência, visando a compreensão do mundo em que vivemos (MELNIK, 2015).

A complexidade dos problemas integrados em diversas linhas de pesquisa exige a obtenção de soluções mais detalhadas e com a menor possibilidade de erros possível, isto é, respostas mais detalhadas e cada vez mais refinadas e precisas. Alia-se a esse fato o aumento do volume de dados trabalhados, assim como a especificidade dos assuntos abordados e a necessidade de entrega de resultados em tempo mais hábil, o que muitas vezes é sinônimo de tempo menor. A modelagem matemático-computacional mostra-se uma ferramenta em potencial para esse cenário.

Segundo Bassanezi (2004),

Modelagem Matemática é um processo dinâmico utilizado para a obtenção e validação de modelos matemáticos. É uma forma de abstração e generalização com a finalidade de previsão de tendências. A modelagem consiste, essencialmente, na arte de transformar situações da realidade em problemas matemáticos cujas soluções devem ser interpretadas na linguagem usual (BASSANEZI, 2004).

Através da modelagem matemática diversos modelos podem ser descritos e ganham contornos conforme se adequam aos dados envolvidos dentro de uma determinada área de conhecimento. A matemática é uma linguagem que ajuda à descrição e compreensão do mundo e a Modelagem Matemática permite expressar o mundo real, discutir os seus fenômenos à luz da Matemática (MELNIK, 2015; VECCHIA; MALTEMPI, 2012; CARREJO; MARSHALL, 2007; HILLEL, 2001).

Na Figura 8 está ilustrado o passo a passo de uma modelagem matemática e computacional. Esse processo inicia-se no desafio de um problema apresentado o qual se moldará num modelo mais simplificado e que, acrescido de ferramentas selecionadas consideradas úteis para resolução, se transformará num modelo matemático. Este sendo suficiente, calculará e apresentará soluções. Caso contrário, programa-se uma implementação a qual será apresentada num modelo computacional. Este, através de simulações mostrará conclusões. Essas conclusões, em ambos os casos, serão interpretadas a fim de comprovar a eficácia do modelo proposto e sua validação.

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 e/ou computacional, com as simplificações do problema em



Figura 8 – Diagrama completo das atividades na modelagem matemática

foco (MELNIK, 2015). A Figura 8 mostra um diagrama completo das atividades na modelagem matemática, segundo MAKI e THOMPSON (2014). Neste observa-se a simplificação do problema do mundo real representado por um modelo real, vindo em seguida a elaboração de um modelo matemático, que pode ser usado para cálculos ou programação de um modelo computacional para simulação, que podem permitir tirar conclusões e interpretar o comportamento do sistema real em estudo.

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 comparação dos resultados obtidos com os dados reais para validação; e envolve a resolução do modelo matemático e computacional proposto.

Ao final desta etapa, obtém-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; MARSHALL, 2007).

Fonte: MAKI e THOMPSON, 2014.

3.1 Aespectroscopia

Nos capítulos anteriores, dissertamos sobre a interdisciplinaridade da biomatemática e da modelagem matemática computacional como campo e ferramenta para a pesquisa em estudo. Através da modelagem é possível trabalhar as especifidades de um dado sistema e embasar estudos mais abrangentes ou mais detalhados do mesmo.

Nessa seção, é descrito o modelo matemático que representa a interação de ligantes com BSA e HSA – proteínas já descritas no Capítulo 1. O modelo foi elaborado com base nos fenômenos de supressão da fluorescência natural emitida por essas albuminas em presença de um mesmo ligante, e considerando as semelhanças e diferenças estruturais conhecidas dessas duas albuminas.

Note na Figura 9 uma representação simplificada da emissão de fluorescência (indicado pelas setas verdes) dos dois resíduos de triptofano (T1 = TRP-212 e T2 = TRP-134) da BSA que atravessa a fenda do espectrofluorímetro. Os resíduos distam entre si de uma distância D (linha azul), e a fenda do fluorímetro é representada por duas linhas marrons paralelas ao eixo Y.



Figura 9 - Representação esquemática do registro da fluorescência da BSA

Legenda: Os dois triptofanos, T1 e T2, emitem radiação fluorescente cuja parte que atravessa a fenda é detectada pelo fluorímetro. Fonte: Motta et al., 2017.

Sabendo que a emissão de fluorescência tem sua origem, especialmente, devido a presença dos resíduos de TRP, pode-se considerar que a parcela com a fluorescência emitida por cada um dos TRP compõem o total de fluorescência emitida pela BSA.

$$F_{Alb} = \sum_{i=1}^{n} F_{T_i},\tag{11}$$

onde F_{Alb} é a fluorescência total emitida pela albumina e F_{T_i} é a fluorescência emitida pelo resíduo de TRPi presente na proteína. Levando em consideração também o caso do tripto-fano do HSA (TRP-214), tem-se então

$$F_{BSA} = F_{T_{212}} + F_{T_{134}} \tag{12}$$

(13)

$$F_{HSA} = F_{T_{214}}.$$

Adicionando-se um supressor nesse sistema, em uma dada concentração Q, é possível registrar a fluorescência remanescente $(F_{Alb}|Q)$ como

$$F_{Alb}|Q = F_{Alb} - \sum_{i=1}^{n} x_i F_{T_i},$$
(14)

onde x_i é a taxa de supressão de fluorescência do triptofano *i*. A variação dessa taxa ocorre apenas através da distância entre supressor e fluoróforo, já que está sendo considerado apenas o trp como fluoróforo.

Tomando a divisão da Equação 14 pela fluorescência da albumina pura obtém-se:

$$\frac{F_{Alb}|Q}{F_{Alb}} = 1 - \frac{1}{F_{Alb}} \sum_{i=1}^{n} x_i F_{T_i},$$
(15)

e para a BSA e a HSA, a equação fica:

$$\frac{F_B}{F_{B_0}} = 1 - \frac{1}{F_{B_0}} (x_1 F_{T1} + x_2 F_{T2})$$
(16)

$$\frac{F_H}{F_{H_0}} = 1 - \frac{1}{F_{H_0}} (x_3 F_{T1}).$$
(17)

Nessa interação albumina-supressor, os fatores x_1 , x_2 e x_3 se referem as taxas suprimidas da fluorescência emitida por cada triptofano. Cada um desses fatores está relacionado à distância (r_i) de um triptofano até o sítio de ligação primário.

De acordo com Motta et al. (2017), seguindo processos algébricos e de simplificação, sabendo-se que K_B e K_H representam as constantes de Stern-Volmer para a BSA e a HSA, respectivamente, tem-se

$$\frac{x_2 F_{T_2}}{x_1 F_{T_1}} = \frac{K_B F_B}{K_H F_H} - 1.$$
(18)

3.1.1 Distâncias dos resíduos de TRP ao sítio de ligação

Inicialmente, é observado o primeiro momento da pesquisa em que se busca a razão entre as distâncias dos TRP ao sítio de ligação do supressor. A equação descrita nos próximos passos advém da relação entre a supressão de fluorescência com a distância desse sítio (ocupados pelas moléculas do supressor) ao resíduo de TRP. Portanto, há uma relação entre a intensidade da fluorescência medida com a distância percorrida pela radiação desde o fluoróforo até o ligante (supressor).

Numa abordagem quântica semi-clássica, Förster (1948) 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 através da expressão (MOTTA et al., 2017):

$$x_i = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r}\right)^6, \ para \ i = 1, 2.$$
 (19)

Substituindo a equação 19 na equação 18 tem-se:

$$\frac{\frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r_2}\right)^6 F_{T_2}}{\frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r_1 r}\right)^6 F_{T_1}} = \left(\frac{F_{B_0} - F_B}{F_{H_0} - F_H}\right) - 1.$$
(20)

Como estamos tratando de um único tipo de fluoróforo, o TRP, então $F_{T_1} = F_{T_2}$, e assim

$$\frac{r_1^6}{r_2^6} = \left(\frac{F_{B_0} - F_B}{F_{H_0} - F_H}\right) -1.$$
(21)

Logo,

$$\frac{r_1}{r_2} = \sqrt[6]{\left(\frac{F_{B_0} - F_B}{F_{H_0} - F_H}\right) - 1},$$
(22)

onde r_1 e r_2 são respectivamente as distâncias do sítio de ligação do supressor na albumina aos resíduos de TRP-134 e TRP-212 da BSA (TRP-214 da HSA). Pode-se escrever essa equação na seguinte forma

$$\frac{r_1}{r_2} = \sqrt[6]{\frac{\Delta F_B}{\Delta F_H} - 1},\tag{23}$$



Figura 10 – Sítio de ligação do supressor (Q) e os resíduos de TRP, T_1 e T_2



ou utilizando a constante de Stern-Volmer (Equação 10), teremos:

$$\frac{r_1}{r_2} = \sqrt[6]{\frac{K_B F_B}{K_H F_H} - 1},$$
(24)

sendo necessário que:

$$\frac{K_B F_B}{K_H F_H} - 1 \ge 0.$$
⁽²⁵⁾

Dando continuidade à pesquisa realizada por Motta et al. (2017), buscando mais precisão na análise dos resultados da espectrofluorimetria para a localização dos sítios de ligação entre a albumina e o supressor, aplicamos recursos da Geometria, já que a conexão entre o sítio de ligação e os resíduos de TRP dão origem a triângulos, como mostra a Figura 10. Nessa pode-se ver a representação de uma posição possível para o sítio de ligação do supressor (Q) em relação aos resíduos de TRP, T_1 e T_2 , sendo D a distância entre esses dois resíduos, r_1 a distância do sítio de ligação Q ao triptofano T_1 e r_2 a distância de Q ao triptofano T_2 .

A Figura 11 exemplifica três dos diversos triângulos que podem ser formados pela

conexão dos dois resíduos de TRP ao sítio de ligação para o ligante.

Geometricamente, os possíveis sítios para Q presentes na BSA formam com T_1 e T_2 triângulos quaisquer de altura: $h_1, h_2, h_3, ..., h_n$, e, portanto, para calcular r_1 e r_2 podemos usar a equação:

$$r_2^2 = r_1^2 + D^2 - 2r_1 . D. cos(\theta_j),$$
(26)

onde θ é o ângulo que pode ser encontrado entre os segmentos r_2 e D (Figura 11).

Da Equação 24 podemos escrever

$$r_1 = \left(\sqrt[6]{\frac{K_B F_B}{K_H F_H} - 1}\right) r_2.$$
(27)

Substituindo r_1 (Equação 27) na Equação 26 e evidenciando r_2 , obtém-se que

$$\left(1 - \left(\sqrt[6]{\frac{K_B F_B}{K_H F_H}} - 1\right)^2\right) r_2^2 = D \left(D - 2.r_2 \cdot \sqrt[6]{\frac{K_B F_B}{K_H F_H}} - 1 \cdot \cos(\Theta_j)\right).$$
(28)

e finalmente, temos a seguinte expressão, que relaciona a razão $\frac{r_1}{r_2}$ com r_2 :

$$\left(1 - \left(\frac{r_1}{r_2}\right)^2\right) r_2^2 = D\left(D - 2.r_2.\frac{r_1}{r_2} \cdot \cos(\Theta_j)\right).$$
(29)

Conhecendo r_1/r_2 e D pode-se dar valores para r_2 e cos(θ) para resolver a equação numericamente por extrapolação, encontrando valores possíveis para r_1 e r_2 , e assim, os possíveis sítios de ligação. Para tanto deve-se considerar as seguintes condições de contorno:

- 1. para $\theta = 0$: h = 0 e $r_1 + r_2 = D$, podendo ser $r_1 = r_2$, ou seja, o sítio encontra-se ao longo do eixo D, entre os dois resíduos ($r_1 + r_2 = D$).
- 2. para $r_1 = r_2 e \theta \neq 0$, $h \neq 0$, sendo que $r_1 e r_2$ formam um triângulo isósceles com D.
- 3. para $r_1 < r_2$, o sítio encontra-se em algum ponto do lado esquerdo do círculo da Figura 11, e no lado direito, quando $r_1 > r_2$.



Figura 11 – Representação de possíveis posições para o sítio de ligação do supressor (Q) em relação aos triptofanos

Legenda: $T_1 \in T_2$. D é distância entre $T_1 \in T_2$; r_i (i=1,2) é a distância entre o sítio aos resíduos de triptofano; h altura do triângulo formado pelos lados r_1 , $r_2 \in D$, e θ é o ângulo entre $r_2 \in D$.

Fonte: O autor, 2019.

4 DESENVOLVIMENTO DA IMPLEMENTAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO

Para realizar a implementação foi proposto o desenvolvimento de um software próprio denominado provisoriamente como "Ambiente de Localização de Sítios de Ligação", utilizando a linguagem Java 8, com interface gráfica JavaFX, no ambiente de desenvolvimento Netbeans 8.2, utilizando um sistema tipo Git como controle de versão e repositório remoto no GitLab. A proposta de utilização dessa linguagem foi realizada visando a explorar as características inerentes a orientação a objeto, no que diz respeito a modularização do código, a facilidade de codificação e a legibilidade do modelo proposto, bem como das rotinas executadas para análise matemática dos dados do modelo em estudo. As opções de repositório local e remoto deve-se a facilidade de utilização dos mesmos para processos de controle de alterações no que se refere a otimização para o desenvolvimento do código.

Esse software teve grande motivação em sua construção, tanto pela importância observada na localização de sítios de ligação, quanto pela inexistência, em literaturas lidas, de ferramentas semelhantes, o que pode, então representar uma contribuição para essa área, já que pretende-se tornar-lo uma ferramenta de domínio público. Ele apresenta-se como um software implementado através de um modelo matemático, numa abordagem de cálculos efetuados a partir das equações em estudo. Conforme é detalhadamente explicado mais adiante neste capítulo, ele produz e salva tabelas e gráficos relacionados aos resultados, sendo um facilitador para as conclusões inerentes ao modelo proposto.

Em um escopo geral, a aplicação apoia-se fundamentalmente em duas classes próprias para modelagem proposta, as classes experimento e modelo. A classe de experimento representam essencialmente uma transcrição computacional dos valores de intensidade de fluorescência e da constante de Stern-Volmer, seja para um experimento com BSA ou com HSA. A classe modelo contém os métodos matemáticos de tratamento do modelo, de acordo com a teoria objeto deste trabalho.

Tratando-se da interface gráfica, apresentada na Figura 12, após a inicialização do programa, o mesmo apresenta na sua parte superior os espaços correspondentes para entrada de dados: substância em estudo, constantes de Stern-Volmer, intensidade de fluorescência, valor da razão $\frac{r_1}{r_2}$ e a distância D. Na parte inferior são apresentados os resultados obtidos após a execução do algoritmo do modelo, na tabela a esquerda os valores de r_1 e r_2 relacionados a cada valor de ângulo θ e a esquerda um gráfico exibindo a distribuição dessas distâncias em função do ângulo do θ . Finalmente, é possível salvar esta tabela como um arquivo *csv* e o gráfico como uma imagem.

O usuário, de posse do executável do software, ao iniciar sua manipulação pode utilizálo de três formas distintas, devendo realizar os seguintes procedimentos para cada um deles:

1. Determinação da razão $\frac{r_1}{r_2}$ ($r_1 \in r_2$ são as distâncias entre o supressor e os triptofanos 1 e 2, respectivamente);

- Informar a constante de Stern-Volmer e fluorescência referente a albumina sérica bovina;
- Informar a constante de Stern-Volmer e fluorescência referente a albumina sérica humana;
- Informar a distância entre os triptofanos (D); e
- Pressionar o botão de determinação de $\frac{r_1}{r_2}$.
- 2. Determinação da razão $\frac{r_1}{r_2}$ e dos valores de r_1 e r_2 em função de θ ;
 - Informar a constante de Stern-Volmer e fluorescência referente a albumina sérica bovina;
 - Informar a constante de Stern-Volmer e fluorescência referente a albumina sérica humana;
 - Informar a distância entre os triptofanos (D); e
 - Pressionar o botão "Executar"
- 3. Determinação dos valores de r_1 e r_2 em função de θ diretamente.
 - Informar o valor da razão $\frac{r_1}{r_2}$;
 - Informar a distância entre os triptofanos (D); e
 - Pressionar o botão "Executar Modelo"

É importante ressaltar que esses dados se referem as informações já explicitadas nos capítulos anteriores.

Descrevendo-se a operação de determinação da razão $\frac{r_1}{r_2}$, é realizado, primeiramente uma verificação sobre a validade dos dados fornecidos para as constantes e fluorescências de acordo com a equação 25, e em caso positivo, é determinado o valor dessa razão através da equação 24. No caso de uso 2, existindo essa razão, segue-se para a determinação dos valores de r_1 e r_2 em função de θ , utiliza-se a Equação 28. Sendo essa resolvida pelo algoritmo, em função da variação do ângulo θ , através da resolução equação do segundo grau correspondente (em r_2):

$$\left(1 - \left(\frac{r_1}{r_2}\right)^2\right) r_2^2 + \left(2\frac{r_1}{r_2}\cos(\theta)D\right) r_2 - D^2 = 0.$$
(30)

Assim, determinam-se, sob um domínio de ângulos θ , entre o segmento de comprimento de D e, genericamente o segmento de distância r_1 , pares de possíveis valores para r_1 e r_2 , que então delimitam as possíveis localizações do sítio de ligação do supressor à albumina. Esses resultados são exibidos através da tabela e do gráfico na parte inferior da aplicação.



Figura 12 - Visão geral do software desenvolvido executando análise

Fonte: O autor, 2019.

Nota-se que no caso da terceira forma de utilização, tendo em vista que já possui-se os valores de D e de $\frac{r_1}{r_2}$, a obtenção dos resultados é realizada diretamente a resolução da Equação 30.

5 RESULTADOS

Para testar o modelo, visando validar os cálculos realizados pelo algoritmo desenvolvido, foram utilizados os seguintes valores arbitrários: D=1, $K_B = 5$, $K_H = 1$, $F_B = 1$, $F_H = 1$. Aplicando esses valores na Equação 28 e usando o método da extrapolação, procuramos os valores de r_2 e θ que anulam esta equação, ou seja, que igualam o seu lado direito com o esquerdo. A Figura 13 mostra o gráfico obtido para r_1 e r_2 encontrados para θ variando de 0° a 180°. Observe que nestes gráficos há região de descontinuidade, entre 53° e 128°.

Considerando o valor da distância entre os dois resíduos de TRP encontrado na literatura, D= 3,5 nm (PETERS, 1996), e aplicando na equação 29 os valores de r_1/r_2 fornecidos por (MOTTA et al., 2017), que são apresentados na Tabela 3 (na página 46), juntamente com os valores máximos e mínimos de r_1 e r_2 , e respectivos valores de θ , foi possível calcular valores para r_1 e r_2 na interação ligante-BSA para as cinco substâncias estudadas por Motta.

Figura 13 – Distâncias r_1 e r_2 em função do ângulo θ , para valores arbitrários



Legenda: $D = 1, K_B = 5, K_H = 1, F_B = 1 \ e \ F_H = 1$. Fonte: O autor, 2019.

Substância	$\overline{r_1/r_2} \leq 1$	Variância / n	t-student
Risperidona	1,15(±0,04)	0,0018 / 16	11,37
Clorpromazina	1,12(±0,04)	0,0017 / 22	17,50
Haloperidol	0,92(±0,04)	0,0017 / 10	-2,75
Metiparation	0,96(±0,03)	0,001 / 14	-3,83
Glifosato	1,04(±0,05)	0,002 / 13	2,88

Tabela 3 – Valores médios da razão $\frac{r_1}{r_2}$

Fonte: Motta et al., 2017.

Aqui também extrapolou-se valores para $r_2 \in \theta$ em busca da solução da Equação 29.

As Figuras 14, 15 e 16 mostram os valores de r_1 e r_2 calculados para cada θ , no caso da interação dos fármacos risperidona, clorpromazina e haloperidol, que são três fármacos de ação antipsicótica, com a BSA a 25 °C.

A Figura 14a mostra que uma descontinuidade nos gráficos de r_1 e r_2 para 60° $\leq \theta \leq$ 120°, para a risperidona. Os valores de r_1 e r_2 crescem com θ até o ponto de descontinuidade (0° a 90°). Os pontos à esquerda da descontinuidade correspondem a sítios localizados na região esquerda do círculo mostrado na Figura 11. Os pontos à direita da descontinuidade referem-se a sítios que estariam localizados na região à direita do circulo (90° a 180°) da Figura 10. Para a risperidona, o valor médio calculado para r_1 foi 2,59(±0,92) nm e para r_2 foi 2,25(±0,80) nm (ver Tabela 4). A média das diferenças entre estas duas distâncias foi 0,86(±0,13) nm. Na Figura 14a, também observa-se descontinuidade nos gráficos entre 63° e 117°.

Para a clorpromazina (Figura 15) o valor médio de r_1 foi 2,65(±1,06) nm, de r_2 foi 2,37(±0,94) nm (Tabela 4) e a média das diferenças entre estas duas distâncias foi 0,28(±0,11) nm.

Entretanto, para o haloperidol (Figura 16), os gráficos de r_1 e r_2 mostrados na Figura 16a não apresentam descontinuidade. A Figura 16b mostra região inicial do gráfico 16a. Para este fármaco, o valor médio de r_1 foi 2,52(±0,97) nm, de r_2 foi 2,74(±1,05) nm e a média das diferenças entre estas duas distâncias foi 0,21(±0,08) nm.

A Tabela 4 mostra os valores das médias de r_1 e r_2 e a média das diferenças para as cinco substâncias usadas para testar o modelo.

Figura 14 – Distâncias r_1 e r_2 em função do ângulo θ , para a interação do fármaco risperidona com a BSA, a 25 °C



Legenda: (a) – θ variando de 0 a 180° e (b) – região em que r_1 e r_2 são positivos. Razão $\frac{r_1}{r_2}$ é mostrado na Tabela 3.

Fonte: O autor, 2019.

Tabela 4 –	Valores	médios	de r_1	e <i>r</i> ₂	e as	médias	das	diference	ças
			_	_					,

Substância			θ =	0 °	θ =	60 º	A - 0 a
Substancia	1	12	<i>r</i> ₁ (nm)	<i>r</i> ₂ (nm)	<i>r</i> ₁ (nm)	<i>r</i> ₂ (nm)	0 = 0 *
Risperidona	$2,59(\pm 0,92)$	$2,25(\pm 0,80)$	1,87	1,63	6,05	5,26	0,86(±0,13)
Clorpromazina	$2,65(\pm 1,06)$	$2,37(\pm 0,94)$	1,84	1,65	4,87	4,35	0,28(±0,11)
Haloperidol	$2,52(\pm 0,97)$	$2,74(\pm 1,05)$	1,67	1,82	3,02	3,28	0,21(±0,08)
Metilparation	$2,89(\pm 1,49)$	$3,01(\pm 1,55)$	1,71	1,78	3,36	3,5	0,12(±0,06)
Glifosato	$3,15(\pm 2,00)$	3,02(±1,97)	1,78	1,71	3,64	3,5	$0,12(\pm 0,08)$

Fonte: O autor, 2019.

As Figuras 17 e 18 mostram os valores de r_1 e r_2 encontrados para cada θ no caso da interação dos pesticidas metilparation e glifosato com a BSA a 25 °C.

Semelhante ao haloperidol (Figura 16), os gráficos de r_1 e r_2 para o pesticida metilparation, mostrados na Figura 17a, não apresentam descontinuidade. A Figura 17b mostra região inicial do gráfico 17a. Para esta substância, o valor médio de r_1 foi 2,89(±1,49) nm, de r_2 foi 3,01(±1,55) nm e a média das diferenças entre estas duas distâncias foi 0,12(±0,06) nm (Tabela 4).

Já os gráficos encontrados para o glifosato, mostrados na Figura 18 também apresentam descontinuidade, tal como observado com os fármacos risperidona e clorpromazina. Neste caso, os valores médio de r_1 e r_2 foram, respectivamente, 3,15(±2,00) nm e 3,02(±1,97) nm e a média das diferenças entre estas duas distâncias foi 0,12(±0,08) nm (Tabela 4).



Figura 15 – Distâncias r_1 e r_2 em função do ângulo θ , para a interação do fármaco clorpromazina com a BSA, a 25 °C



Fonte: O autor, 2019.

Figura 16 – Distâncias r_1 e r_2 em função do ângulo θ , para a interação do fármaco haloperidol com a BSA, a 25 °C



Legenda: (a) – θ variando de 0 a 180º e (b) – região em que r_1 e r_2 são positivos. Razão $\frac{r_1}{r_2}$ é mostrado na Tabela 3.

Fonte: O autor, 2019.



TRP 2

180

140 160

θ (°)

Figura 17 – Distâncias r_1 e r_2 em função do ângulo θ , para a interação do pesticida metilparation com a BSA, a 25 °C



(b)

0.

ò

20

40

θ (°)

60

80

Fonte: O autor, 2019.

0

(a)

ò 20 40 60 80 100 120

Figura 18 – Distâncias r_1 e r_2 em função do ângulo θ , para a interação do pesticida glifosato com a BSA, a 25 °C



Legenda: (a) – θ variando de 0 a 180º e (b) – região em que r_1 e r_2 são positivos. Razão $\frac{r_1}{r_2}$ é mostrado na Tabela 3.

Fonte: O autor, 2019.

6 DISCUSSÃO

A análise dos valores de r_1 e r_2 encontrados pela aplicação dos valores de r_1/r_2 , apresentados na Tabela 3 (MOTTA et al., 2017), na Equação 29, mostra que os sítios para as cinco substâncias estudadas, risperidona, clorpromazina, haloperidol, metilparation e glifosato, localizam-se em pontos entre os dois resíduos de TRP. Observou-se que para o ângulo $\theta = 0$, os valores de r_1 e r_2 foram maiores que a unidade, mais precisamente, $r_1, r_2 > 1,5$ nm, e $r_1 + r_2 = 3,5$ nm, que é a distância entre os dois resíduos de TRP (PETERS, 1996). Esta última observação confirma a localização dos sítios entre os dois resíduos, pois de acordo com a condição de contorno I, para $\theta = 0 : h = 0$ e podemos ter $r_1 + r_2 = D$, ou seja, o sítio se encontra ao longo do eixo de D.

De acordo com o nosso modelo, as distâncias médias entre o resíduo TRP1 ($\overline{r_1}$) e os respectivos sítios de ligação para os fármacos risperidona, clorpromazina e haloperidol, e para os pesticidas metilparation e glifosato (Tabela 3), foram: 2.59(±0,92) nm, 2,65(±1,06) nm, 2,52(±0,97) nm, 2,89(±1,49) nm, 3,15(±2,00) nm. Os valores das distâncias médias do resíduo de TRP2 aos mesmos sítios ($\overline{r_2}$) foram: 2,25(±0,80) nm, 2,37(±0,94) nm, 2,74(±1,05) nm, 3,01(±1,55) nm, 3,02(±1,97) nm. Importante ressaltar que essas médias foram calculadas para a região esquerda dos gráficos das Figuras 14-18, onde $r_1, r_2 > 0$, que corresponde ao primeiro quadrante do círculo da Figura 11. Esses valores estão bem próximos entre si, sendo a média da distância dos sítios ao resíduo TRP1 igual a 2,76(±0,26) nm e ao resíduo TRP2, 2,68(±0,35) nm, com valores de desvio padrão bem reduzidos, da ordem de 1 nm.

Entretanto, pode-se observar que, embora próximos em valores, $r_1 > r_2$ para a risperidona, clorpromazina e o glifosato, enquanto que $r_1 < r_2$ para as outras duas substâncias, haloperidol e metilparation. Os sítios de ligação para os três primeiros estão mais próximos do TRP2, enquanto os sítios para os outros dois estão mais próximos do TR1.

Nos gráficos das Figuras 16a e 17a, os quais correspondem a razões $r_1 < r_2$, notamos a ausência da descontinuidade observada nos outros três casos, Figuras 14a, 15a e 18a. Como os valores de r_1 e r_2 para $\theta > 65^{\circ}$ nas Figuras 16a e 17a alcançaram níveis muito acima das dimensões dos domínios presentes na molécula da BSA (PETERS, 1996)(HANH et al., 2015), consideramos para o cálculo dessas distâncias a mesma região adotada para as outras três substâncias, cujos gráficos apresentaram descontinuidade. A seguir comentamos sobre as dimensões desses domínios moleculares.

Sabe-se que a BSA e a HSA são proteínas globulares, constituídas por 582 e 585 aminoácidos, respectivamente, tendo formas elipsoidais, de dimensões 4 nm x 4 nm x 14 nm. Essas moléculas apresentam três domínios homólogos (I, II e III) e dois subdomínios (A e B) para cada domínio (Figuras 2 e 3). Cada domínio contém 10 hélices, sendo dividido em seis hélices antiparalelas e os dois subdomínios 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(BERTUCCI; DOMENICI, 2002; FASANO et al., 2005; FANALI et al., 2009; PETERS, 1996; PETITPAS et al., 2001; SAKURAI et al., 2004; SUGIO et al., 1999).

Não há na literatura atual informação sobre a dimensão de cada um dos domínios dessas albuminas, mas podemos, para efeito de modelagem, considerar que cada um deles ocupe 1/3 da molécula, sendo então suas dimensões em torno de 1,3 nm x 1,3 nm x 4,6 nm. Dessa forma, podemos analisar os valores encontrados com base nessas dimensões, lembrando que o resíduo TRP1 (triptofano na posição 212 da cadeia protéica) se encontra no domínio II da molécula (Figura 3), mais precisamente no subdomínio IIA, que forma uma cavidade altamente hidrofóbica; e que o TRP2 (triptofano na posição 134) se encontra no subdomínio IB (KRAGH-HANSEN, 1981; TAVIRANI et al., 2006). O TRP2 se localiza em uma cavidade hidrofóbica da BSA, sendo, porém, mais exposto ao ambiente hidrofílico das soluções, enquanto que TRP1 é localizado em uma região hidrofóbica mais interna da proteína (HONGWEI et al., 2006).

Os valores médios de r_1 e r_2 calculados são maiores do que os diâmetros menores considerados para cada um dos domínios (1,3 nm), porém são menores do que o diâmetro maior. Mesmo os valores para θ =0, em que o sítio se encontra no mesmo eixo, entre os dois resíduos de TRP, os valores são maiores do que 1,3 nm. Mas, esses resultados são consistentes, visto que os triptofanos estão em diferentes domínios. Assim, é possível que os sítios para essas substâncias na BSA, e HSA, estejam próximos. A visão das moléculas apresentadas nas Figuras 2 e 3 permite uma noção de como esses sítios poderiam se dispor, com os respectivos valores de r_1 e r_2 entre os subdomínios IIa e IB, entre os dois resíduos de TRP.

A semelhança no formato dos gráficos nas Figuras 14a, 15a e 18a é visível, e os valores das distâncias para os ângulos $\theta = 0^\circ$ e $\theta = 60^\circ$ (Tabela 4) são próximos entre si, especialmente no caso dos dois fármacos. Na Tabela 4 pode-se observar que para o fármaco risperidona, a variação de r_1 e r_2 com o aumento do θ de 0° a 60° (4,18 nm e 3,62 nm, respectivamente) foi ligeiramente maior do que no caso das outras duas substâncias. Para a clorpromazina, $r_1(60^\circ)$ - $r_1(0^\circ)$ = 3,03 nm e $r_2(60^\circ)$ - $r_2(0^\circ)$ = 2,70 nm. Para o glifosato, os incrementos em r_1 e r_2 foram de apenas 1,35 nm e 1,43 nm, respectivamente, ou seja \approx 1 nm. Dessa forma, de acordo com esses resultados, pode-se pensar na risperidona como uma substância com maior disponibilidade de sítios na BSA e HSA do que a clorpromazina e glifosato. Seguindo o mesmo raciocínio, este pesticida seria a substância com menor número de sítios disponíveis entre as três. Maior número de sítios disponíveis representa maior reserva plasmática (em concentração) para a substância (STAHL, 1998).

A organização estrutural das albuminas permite a existência de vários sítios de ligação para fármacos como a risperidona. As duas cavidades hidrofóbicas localizadas nos sub-domínios IIA e IIIA da HSA e BSA (Figuras 2 e 3) são apontadas como sendo os principais regiões de sítios de ligação, de alta afinidade, para a maioria dos fármacos. Compostos aniônicos grandes e heterocíclicos ligam-se especialmente ao sítio Sudlow I, localizado no sub-domínio IIA (ver Figuras 2 e 3). Para concentrações terapêuticas, o sítio II (localizado no subdomínio IIIA) apresenta maior afinidade com compostos carboxílicos aromáticos, mas para maior concentração, menores sítios de afinidade e seletividade podem surgir (WATA-NABE et al., 2001; FANALI et al., 2009).

A risperidona é uma substância com importante teor hidrofóbico; apesar dos seus diferentes graus de hidrofilicidade, segundo os nossos resultados, os sítios de alta afinidade, ou sítios primários, para as cinco substâncias aqui estudadas podem estar na mesma região da estrutura da albumina, mais próximo do subdomínio IIA ou para o subdomínio IB, ou mesmo no subdomínio IIIA. Como mencionado acima, nesses subdomínios estão, localizados os sítios I e II de Sudlow, que têm sido apontados como locais de ligação (WANG et al., 2008).

CONCLUSÃO

De acordo com o nosso modelo, as distâncias médias entre o resíduo TRP1 ($\overline{r_1}$) e os respectivos sítios de ligação para os fármacos risperidona, clorpromazina e haloperidol, e para os pesticidas metilparation e glifosato, são: 2.59(±0,92) nm, 2,65(±1,06) nm, 2,52(±0,97) nm, 2,89(±1,49) nm, 3,15(±2,00) nm. Para as distâncias médias do resíduo de TRP2 aos mesmos sítios ($\overline{r_2}$) são: 2,25(±0,80) nm, 2,37(±0,94) nm, 2,74(±1,05) nm, 3,01(±1,55) nm, 3,02(±1,97) nm.

Esses valores estão bem próximos um do outros, sendo a média da distância dos sítios ao resíduo TRP1 igual a 2,76(±0,26) nm e ao resíduo TRP2, 2,68(±0,35).

Embora os valores médios de r_1 e r_2 encontrados sejam maiores do que os diâmetros menores considerados para cada um dos domínios (1,3 nm), eles são menores do que o diâmetro maior. Esses resultados são consistentes, visto que os triptofanos estão em diferentes domínios.

Para o fármaco risperidona, a variação de r_1 e r_2 com o aumento do θ de 0° a 60°(4,18 nm e 3,62 nm, respectivamente) foi ligeiramente maior do que no caso da clorpromazina e o glifosato. Para a clorpromazina, $r_1(60^\circ)-r_1(0^\circ)=3,03$ nm e $r_2(60^\circ)-r_2(0^\circ)=2,70$ nm. Para o glifosato, os incrementos em r_1 e r_2 foram de apenas 1,35 nm e 1,43 nm, respectivamente, ou seja ≈1 nm. De acordo com esses resultados, pode-se pensar na risperidona como uma substância com maior disponibilidade de sítios na BSA e HSA do que a clorpromazina e o glifosato.

REFERÊNCIAS

ARNOLD, R.; KATAEV, E.; RÜFFER, T.; LANG, H. Fluorescence detection of adenosine triphosphate in an aqueous solution using a combination of copper(ii) complexes. *Inorganic chemistry*, v. 51, n. 15, p. 7948–5000, 2012.

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

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

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

CARQUEJA, M.; CORTEZ, C. M. Applying a mathematical model to estimate the fractional accessibility to quenching of serum albumin by risperidone. *AIP Conference Proceedings*, v. 1618, n. 1, p. 609–611, 2014.

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

CARTER, D. C.; HE, X. M.; MUNSON, S. H.; TWIGG, P. D.; GERNERT, K. M.; BROOM, M. B.; MILLER, T. Y. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science (New York, N.Y.)*, v. 244, n. 4909, p. 1195–1198, 1989.

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

CORTEZ, C. M.; SILVA, D.; SILVA, C. M.; MISSAILIDIS, S. Interactions of aptamers with sera albumins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 95, p. 270 – 275, 2012. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142512004052>.

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

EISBERG, R. M.; RESNICK, R. *Quantum Physics of Atoms, Molecules, Solids, Nuclei and Particules.* 2. ed. John Wiley & Sons, 1985. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=5tBlPgAACAAJ.

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

FASANO, M.; 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*, v. 57, n. 12, p. 787–796, 2005. Disponível em: https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1080/15216540500404093.

FÖRSTER, T. W. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. v. 2, p. 55–74, 1948.

FRAGOSO, V. M.; SILVA, D.; CRUZ, F. A. d. O.; CORTEZ, C. M. Risperidone interacts with serum albumin forming complex. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 33, n. 2, p. 26–266, 2012.

FRAGOSO, V. M. da S.; COURA, C. P. de M.; HOPPE, L. Y.; SOARES, M. A. G.; SILVA, D.; CORTEZ, C. M. Binding of sulpiride to seric albumins. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 1, p. 69, 2016. Disponível em: http://www.mdpi.com/1422-0067/17/1/59>.

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

GONCHAROV, N. V.; BELINSKAIA, D. A.; SHMURAK, V. I.; TERPILOWSKI, M. A.; JENKINS, R. O.; AVDONIN, P. V. Serum albumin binding and esterase activity: Mechanistic interactions with organophosphates. *Molecules*, v. 22, n. 7, 2017. Disponível em: http://www.mdpi.com/1420-3049/22/7/1201.

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

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

HONGWEI, Z.; GE, M.; ZHANG, Z.; WANG, W.; WU, G. Spectroscopic studies on the interaction between riboflavin and albumins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 65, n. 3–4, p. 811–817, 2006.

INGALLS, B. P. *Mathematical Modelling in Systems Biology: An Introduction*. [S.l.]: MIT Press, 2012. 396 p. (Mathematical Modeling in Systems Biology).

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S.; TREVOR, A. J. *Basic and Clinical Pharmacology*. 12. ed. [S.l.]: Mc Graw Hill, 2011. (LANGE).

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

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

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 4. ed. [S.l.]: Plenum Press, 2006.

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

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

MORAIS E COURA, C. P. d.; PAULINO, E. T.; CORTEZ, C. M.; FRAGOSO, V. M. da S. Serum albumin and the haloperidol pharmacokinectics. a study using a computational model. *AIP Conference Proceedings*, v. 1790, n. 1, p. 100009, 2016.

MOREAU, R. L. M.; DE SIQUEIRA, M. E. P. B. *Ciências Farmacêuticas - Toxicologia Analítica*. 2. ed. [S.l.]: GUANABARA Koogan-Gen, 2016.

MOTTA, A. A. E. d. A.; GRASSINI, M. C. V.; CORTEZ, C. M.; SILVA, D. A model to estimate the relative position of sites for ligands in serum albumins. *AIP Conference Proceedings*, v. 1906, n. 1, p. 130005, 2017.

PETERS, T. J. *All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications.* 1. ed. [S.l.]: Academic Press, 1996. 432 p.

PETITPAS, I.; GRÜNE, T.; BHATTACHARYA, A. A.; CURRY, S. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *Journal of Molecular Biology*, v. 314, n. 5, p. 955 – 960, 2001. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600952082>.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. *Fármacos ansiolíticos e hipinóticos In: Farmacologia.* 5. ed. [S.l.]: Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

SAKURAI, Y.; MA, S.-F.; WATANABE, H.; YAMAOTSU, N.; HIRONO, S.; KURONO, Y.; KRAGH-HANSEN, U.; OTAGIRI, M. Esterase-like activity of serum albumin: characterization of its structural chemistry using p-nitrophenyl esters as substrates. *Pharmaceutical research*, v. 21, n. 2, p. 285–92, 2004.

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

SILVA, D.; CORTEZ, C. M.; CUNHA-BASTOS, J.; LOURO, S. R. Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin. *Toxicology Letters*, v. 147, n. 1, p. 53 – 61, 2004b. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427403004004>.

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

SILVA, D.; CORTEZ-MOREIRA, M.; BASTOS, V. L. F. C.; BASTOS, J. C.; CORTEZ, C. M. Spectrofluorimetric study of the interaction of methyl-parathion with fish serum albumin. *Fish physiology and biochemistry*, v. 36, n. 3, p. 427–33, 2010.

SILVA, D.; CORTEZ-MOREIRA, M.; BASTOS, V. L. F. C.; BASTOS, J. C.; CORTEZ, C. M. The interaction of methyl-parathion with serum and albumin of the neo-tropical fish piaractus mesopotamicus. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 73, n. 1, p. 32–7, 2010a.

SIMMONS, S. O.; FAN, C.-Y.; YEOMAN, K.; WAKEFIELD, J.; RAMABHADRAN, R. Nrf2 oxidative stress induced by heavy metals is cell type dependent. *Current chemical genomics*, v. 5, p. 1–12, 2011.

SOUZA, E. S. de; HIRATA, I. Y.; JULIANO, L.; ITO, A. S. End-to-end distance distribution in bradykinin observed by förster resonance energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1474, n. 2, p. 251 – 261, 2000. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416500000040>.

STAHL, S. M. *Psicofarmacologia: bases neurocientífica e aplicações clínicas*. [S.l.]: MEDI Ed., 1998.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular pharmacology*, v. 12, n. 6, p. 1052–61, 1976.

SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 åresolution. *Protein Engineering*, Oxford Univ Press, v. 12, n. 6, p. 439–446, 1999.

TAVIRANI, M. R.; MOGHADDAMNIA, S. H.; RANJBAR, B.; AMANI, M.; MARASHI, S. A. Conformational study of human serum albumin in pre-denaturation temperatures by differential scanning calorimetry, circular dichroism and uv spectroscopy. *Journal of biochemistry and molecular biology*, v. 39, n. 5, p. 530–6, 2006.

VALEUR, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. [S.l.]: Wiley-VCH Verlag, 2001.

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

VERBEECK, R. K.; CARDINAL, J. A.; HILL, A. G.; MIDHA, K. K. Binding of phenothiazine neuroleptics to plasma proteins. *Biochemical pharmacology*, v. 32, n. 17, p. 2565–70, 1983.

WANG, T.; XIANG, B.; WANG, Y.; CHEN, C.; DONG, Y.; FANG, H.; WANG, M. Spectroscopic investigation on the binding of bioactive pyridazinone derivative to human serum albumin and molecular modeling. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 65, n. 1, p. 113 – 119, 2008. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776508001227>.

WATANABE, H.; KRAGH-HANSEN, U.; TANASE, S.; NAKAJOU, K.; MITARAI, M.; IWAO, Y.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants. *The Biochemical journal*, v. 357 Pt 1, 2001.

WU, X.; LIU, J.; WANG, Q.; XUE, W.; YAO, X.; ZHANG, Y.; JIN, J. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain iia. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 79, n. 5, p. 1202 – 1209, 2011. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142511002903>.

Classes próprias

```
Algoritmo A.1 – Classe experimento
```

```
1 package com.juliana.sitiodeligacao2;
 2
3 import javafx.beans.property.DoubleProperty;
 4 import javafx.beans.property.SimpleDoubleProperty;
 5
 6 /**
 7
   * @author Ju–eLeo
8
9 */
10 public class Experimento {
11
12
       private final String tipo;
       private DoubleProperty constanteSV = new SimpleDoubleProperty();
13
       private DoubleProperty fluorecencia = new SimpleDoubleProperty();
14
15
       public Experimento(String tipo) {
16
17
           this.tipo = tipo;
18
       }
19
20
       public Experimento(String tipo, double constanteSV, double fluorecencia) {
21
           this(tipo);
22
           this.constanteSV.set(constanteSV);
23
           this.fluorecencia.set(fluorecencia);
24
       }
25
26
       public String getTipo() {
27
           return tipo;
28
       }
29
       public double getConstanteSV() {
30
           return constanteSV.get();
31
32
       }
33
       public double getFluorecencia() {
34
           return fluorecencia.get();
35
36
       }
37
       public void setConstanteSV(double constanteSV) {
38
           this.constanteSV.set(constanteSV);
39
```

```
40
41
42
       public void setFluorecencia(double fluorecencia) {
43
           this.fluorecencia.set(fluorecencia);
44
       }
45
       public DoubleProperty constanteSVProperty() {
46
           return constanteSV;
47
48
       }
49
       public DoubleProperty fluorescenciaProperty() {
50
           return fluorecencia;
51
52
       }
53
54 }
```

```
Algoritmo A.2 - Classe modelo
```

```
1 package com.juliana.sitiodeligacao2;
 2
3 import java.util.ArrayList;
4 import java.util.List;
5 import javafx.beans.property.DoubleProperty;
6 import javafx.beans.property.SimpleDoubleProperty;
 7 import javafx.collections.FXCollections;
 8 import javafx.collections.ObservableMap;
9 import javafx.util.Pair;
10
11 /**
12
   *
13 * @author Ju–eLeo
14 */
15 public class Modelo {
16
       private DoubleProperty razaoR1R2 = new SimpleDoubleProperty();
17
       private DoubleProperty D = new SimpleDoubleProperty();
18
19
       private List <Experimento> experimentos = new ArrayList <>();
       private final ObservableMap<Double, Pair<Double, Double>> mapaR1R2 = FXCollections
20
       .observableHashMap();
21
22
       public Modelo() {
23
       }
24
       public List <Experimento> getExperimentos() {
25
           return experimentos;
26
27
       ł
28
       public Experimento getExperimentoBovino() {
29
```

```
30
           return experimentos.stream()
31
                    . filter (e -> e.getTipo().contentEquals("BSA"))
                    .findAny()
32
33
                    .orElse(null);
       }
34
35
       public Experimento getExperimentoHumano() {
36
37
           return experimentos.stream()
                    . filter (e -> e.getTipo().contentEquals("HSA"))
38
39
                    . findAny()
                    .orElse(null);
40
       }
41
42
       public boolean possuiCondi oesValidas() {
43
           double Kb = getExperimentoBovino().constanteSVProperty().get();
44
           double Kh = getExperimentoHumano().constanteSVProperty().get();
45
           double Fb = getExperimentoBovino().fluorescenciaProperty().get();
46
           double Fh = getExperimentoHumano().fluorescenciaProperty().get();
47
48
49
           return ((Kb * Fb) / (Kh * Fh)) - 1 >= 0;
50
       }
51
       public double getRazaoR1R2() {
52
           return razaoR1R2.get();
53
54
       }
55
56
       public DoubleProperty razaoR1R2Property() {
57
           return razaoR1R2;
58
       }
59
60
       public double getD() {
           return D.get();
61
62
       }
63
       public DoubleProperty DProperty() {
64
           return D;
65
66
       }
67
       public void setD(double D) {
68
           this.D.set(D);
69
70
       }
71
72
       public double determinarRazao() {
           double Kb = getExperimentoBovino().constanteSVProperty().get();
73
74
           double Kh = getExperimentoHumano().constanteSVProperty().get();
75
           double Fb = getExperimentoBovino().fluorescenciaProperty().get();
           double Fh = getExperimentoHumano().fluorescenciaProperty().get();
76
```

```
77
78
            razaoR1R2.set(Math.pow(((Kb * Fb) / (Kh * Fh)) - 1, 1.0 / 6.0));
79
            return razaoR1R2.get();
80
       }
81
82
       public void construirResultados() {
            for (double theta = 0; theta < Math.toRadians(180); theta += Math.toRadians(1)
83
       ) {
                Pair<Double, Double> r1R2 = determinarR2(theta);
84
85
                mapaR1R2.put(theta, r1R2);
                //System.out.println("Theta: " + Math.toDegrees(theta) + " rl: " +
86
       mapaR1R2.get(theta).getKey() + " r2: " + mapaR1R2.get(theta).getValue());
87
           }
88
       }
89
       public void construirResultadosAlternativo() {
90
            for (double theta = 0; theta < Math.toRadians(180); theta += Math.toRadians(1)
91
       ) {
                Pair<Double, Double> r1R2 = determinarR2Alternativo(theta);
92
93
                mapaR1R2.put(theta, r1R2);
                //System.out.println("Theta: " + Math.toDegrees(theta) + " rl: " +
94
       mapaR1R2.get(theta).getKey() + " r2: " + mapaR1R2.get(theta).getValue());
95
            }
96
       }
97
98
       public void extrapolacao() {
99
            determinarRazao();
100
            construirResultados();
101
       }
102
103
        private Pair<Double, Double> determinarR2(double angulo) {
104
            double r1 = 0, r2 = 0;
            if (angulo != 0.0) {
105
106
                double a = 1 - Math.pow(razaoR1R2.get(), 2);
                double b = 2 * D.get() * razaoR1R2.get() * Math.cos(angulo);
107
                double c = -Math.pow(D.get(), 2);
108
                double delta = Math.pow(b, 2) - (4 * a * c);
109
110
                if (delta >= 0) {
111
                    r2 = (-(b) + Math.sqrt(delta)) / (2 * a);
112
113
114
                    if (r2 < 0) {
115
                        r2 = (-(b) - Math.sqrt(delta)) / (2 * a);
116
                    }
117
                }
            } else {
118
119
                r2 = D.get() / (1 + razaoR1R2.get());
```

```
120
            }
            r1 = razaoR1R2.get() * r2;
121
122
            return new Pair<>(r1 != 0 ? r1 : null, r2 != 0 ? r2 : null);
123
124
        }
125
        private Pair<Double, Double> determinarR2Alternativo(double angulo) {
126
127
            double r1 = 0, r2 = 0;
            double a = Math.pow(razaoR1R2.get(), 2) + 1 - (2 * razaoR1R2.get() * Math.cos()
128
       angulo));
            double b = 0.0;
129
            double c = -Math.pow(D.get(), 2);
130
            double delta = Math.pow(b, 2) - (4 * a * c);
131
132
            if (delta >= 0) {
133
                r2 = (-(b) + Math.sqrt(delta)) / (2 * a);
134
135
                if (r2 < 0) {
136
                    r2 = (-(b) - Math.sqrt(delta)) / (2 * a);
137
138
                }
139
            }
140
            r1 = razaoR1R2.get() * r2;
141
142
            return new Pair <> (r1 != 0 ? r1 : null, r2 != 0 ? r2 : null);
143
        }
144
        public ObservableMap<Double, Pair<Double, Double>> getMapaR1R2() {
145
146
            return mapaR1R2;
147
        }
148 }
```