

ADRIANA TEIXEIRA

**DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS DA
REAÇÃO DE DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA
POR UM MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO HÍBRIDO UTILIZANDO
DADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS EM
*STOPPED FLOW MIXER 4000/S***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto

Coorientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Teixeira, Adriana

DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS DA REAÇÃO DE DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA POR UM MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO HÍBRIDO UTILIZANDO DADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS EM STOPPED FLOW MIXER 4000/S / Adriana Teixeira ; orientador, Leonel Teixeira Pinto ; coorientador, Ariovaldo Bolzan. - Florianópolis, SC, 2016.

197 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Reação de desoxigenação da oxihemoglobina. 3. Método de mistura rápida com fluxo interrompido. 4. Stopped Flow Mixer 4000/S. 5. Método de otimização híbrido (combinação dos métodos de algoritmo genético e busca unidirecional). I. Teixeira Pinto, Leonel. II. Bolzan, Ariovaldo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

ADRIANA TEIXEIRA

**DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS DA
REAÇÃO DE DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA
POR UM MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO HÍBRIDO UTILIZANDO
DADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS EM
*STOPPED FLOW MIXER 4000/S***

Este (a) Dissertação/Tese foi julgado(a) adequado(a) para obtenção do Título de “...”, e aprovad(o)a em sua forma final pelo Programa ...

Local, x de xxxxx de xxxx.

Prof.^a Dr.^a Cíntia Soares
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr.
Orientador
Universidade xxxx

Prof. Dr.
Corientador
Universidade xxxx

Prof. xxxx, Dr.

AGRADECIMENTOS

Dedico esta tese a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha história, ajudando-me encerrar mais um capítulo deste novo percurso da minha vida, onde muitos planos futuros ainda serão realizados. Nessa caminhada tive mais alegrias do que tristezas e para aumentar minha energia e determinação nasceu em 2012 o meu maior sonho, expectativa e felicidade para uma nova fase que se iniciou...aprender a ser mãe.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus dois grandes amores, meu marido Manoel O. Mello Jr e ao meu filho Henrique Teixeira Mello pela imensurável paciência aos meus ataques de estresse e cansaço. Pois, nas horas que eu mais precisava sempre podia contar com seu amor, carinho, colo, compreensão e preocupação incondicional que me ajudou muito nos estudos e amadurecer profissionalmente, MEUS MELHORES AMORES DESSE MUNDO...

Agradeço a Deus por ter me amparado nos momentos de desespero. Pois, a fé nos torna forte para enfrentar os obstáculos que a vida nos ensina, porque sempre depois da tempestade o sol volta a brilhar.

Ao meu pai Walter R. Teixeira e ao meu filho Pedro Teixeira Mello que espiritualmente de uma certa forma me acompanharam e sua lembrança era contínua no decorrer desses anos. Pois, creio que quando perdemos entes queridos em momentos que jamais esperamos, essa dor faz florescer em nosso coração a certeza que devemos seguir em frente porque a caminhada continua cercada por outras pessoas queridas ou anjos que aparecem para nos guiar.

Agradeço o apoio da minha mãe Rosita dos Santos Linheira e dos meus irmãos Walter R. Teixeira Jr, Herlon Teixeira e Anna Maria Teixeira Ramella por acompanharem a minha vida acadêmica e me proporcionarem alegria nas horas necessárias fazendo-me sentir capaz e encorajada para terminar o doutorado.

Aos meus cunhados Robert Kennedy Ramella e Sergio Truchinski, minhas cunhadas Karina Franzoni Teixeira, Cristiane Mello Truchinski e Cláudia Mello Truchinski, juntamente com todos os meus sobrinhos e sobrinhas (Roberta, João Pedro, Thiago, Maria Fernanda e Maria Clara) meus sinceros agradecimentos pelos momentos de descontração.

Quero agradecer de uma forma especial ao meu orientador Dr. Leonel Teixeira Pinto pela sua orientação, compreensão, paciência e por acreditar que apesar de todas as dificuldades e desafios por não ser da área de engenharia chegaríamos até o final.

Ao meu coorientador Dr. Ariovaldo Bolzan pelo sincero auxílio e apoio nas horas necessárias.

Ao professor Dr. Luismar Marques Porto do Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab) por ter possibilitado o avanço da prática experimental viabilizando a utilização dos equipamentos em seu laboratório, permitindo a melhoria dos resultados do presente trabalho. Também agradeço a colaboração de seus doutorandos Karina Cesca e Guilherme Colla pela sua incessante contribuição no manuseio e dúvidas sobre os equipamentos e outros questionamentos afins.

Ao professor Dr. Marco Di Luccio pela doação da membrana de diálise.

Ao professor Dr. Bruno Szpoganicz do Laboratório de Bioinorgânica e Equilíbrio juntamente com o seu aluno de mestrado Anderson Bastos Pires que me auxiliaram no processo de purificação.

Ao professor Dr. Ademir Neves juntamente com o seu aluno de doutorado Marcos Paulo da Silva que dispuseram seu laboratório para a análise comparativa do nosso modelo experimental.

Quero honrosamente agradecer aos professores Doutores Cíntia Soares, Luismar Marques Porto, Bruno Augusto Mattar Carciofi, Adriana Elaine da Costa e Renata Souza Agostinho Costa por terem aceitado analisar este trabalho e fazer parte da minha banca de defesa.

À Thais Appelt Peres pela sua amizade, força, estímulo, críticas, paciência e por ter disponibilizado seu tempo para transmitir seus conhecimentos de engenharia química ao longo desses anos.

Ao Márcio Paiano de Souza pela sua grande amizade, confiança, por todas as gargalhadas, preocupação com os experimentos, ajuda para fazer o equipamento funcionar e apoio nas horas necessárias, foi fantástico sua dedicação para transformar nossas ideias em realidade.

À Juliana Teixeira Quinaud pela sua compreensão, grande amizade, simpatia, compreensão, pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos para desvendar as barreiras da termodinâmica e cinética química.

Aos meus colegas Thiago Pereira e Brayan M. Paredes pela constante paciência e auxílio para sanar todas as minhas dúvidas sobre programação. Desculpas as chateações e perturbações.

Ao casal Afrânio e Caroline Almeida pelo apoio, carisma, paciência e risadas.

À Amanda Felipe Reitenbach pelos bons momentos de risadas e descontração.

À Elis Zanata pela ajuda e disponibilidade para ensinar manusear o equipamento *SFM 4000/S*.

Quero agradecer especialmente as doutoras Adriana Elaine da Costa e Janaína Andreazza que fizeram parte da inicialização e direção do rumo de meu trabalho, pelo apoio, generosidade e por confiar na minha capacidade intelectual.

Ao meu amigo Ricardo Rezende por introduzir os primeiros ensinamentos de termodinâmica e engenharia química, me incentivando a não desistir e fazendo-me acreditar que tudo parecia muito fácil, quando a realidade se mostrava bem diferente.

Ao Edevilson Silva por todo apoio, simpatia e dedicação.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSC pelas excelentes condições e qualidade de estudo.

Meu muito obrigado a todos os familiares e amigos do Laboratório de Neuroengenharia Computacional (Neurolab) da UFSC, pela agradável convivência e pelo incentivo no desenvolvimento deste trabalho, estando sempre presentes no meu dia-dia ao longo destes anos. Finalizo me desculpando pela falta de memória se por acaso esqueci-me de agradecer alguém em especial.

RESUMO

A reação química que ocorre entre a hemoglobina e o oxigênio é essencial para a manutenção da homeostase do organismo e sobrevivência das células. Essa reação ocorre em quatro etapas reversíveis e consecutivas, onde o ferro de cada grupo heme que compõe a hemoglobina, reage sequencialmente com quatro moléculas de oxigênio de modo cooperativo. A hemoglobina é uma proteína de extrema importância em processos biológicos vitais, cuja função é transportar gases (oxigênio e dióxido de carbono). No presente trabalho, a oxi-hemoglobina foi obtida a partir da redução da meta-hemoglobina, utilizando o agente redutor ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Esse procedimento foi realizado no “Laboratório de Neuroengenharia Computacional” (Neurolab/UFSC) em uma coluna cromatográfica composta pela resina Sephadex G-25, por meio do método de cromatografia líquida de filtração em gel de exclusão molecular. A quantificação da oxi-hemoglobina foi verificada pelo método de Drabkin e a reação de desoxigenação foi avaliada no equipamento *Stopped Flow Mixer 4000/S (SFM 4000/S)* pelo método de mistura rápida com fluxo interrompido. Os resultados experimentais obtidos foram utilizados para determinar as constantes cinéticas de um modelo matemático para a reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina por um método de otimização híbrido. Comparou-se os resultados com os do modelo de pseudo primeira ordem e constatou-se que o modelo do presente trabalho não só apresenta um resultado com menor erro com relação ao experimental, quanto possibilita uma análise aprofundada da dinâmica dos compostos intermediários da reação. Foi possível constatar também que não é aceitável a definição de um conjunto de constantes cinéticas absolutos, mas pode-se falar em uma região viável, cujo critério é o ordenamento dos seus valores em ordem crescente ($k_{-4} < k_{-3} < k_{-2} < k_{-1}$) e k_{-4} dentro de um intervalo entre 40 a 60 s^{-1} .

Palavras-chave: Hemoglobina. Oxigênio. Constantes Cinéticas.

ABSTRACT

The chemical reaction involving hemoglobin and oxygen is essential for the maintenance of homeostasis and cell survival. This reaction occurs in four reversible and consecutive steps, where the iron of each group composing the heme group of the hemoglobin reacts sequentially and cooperatively with four oxygen molecules. Hemoglobin is a protein of extreme importance in vital biological processes, whose function is to transport gases (oxygen and carbon dioxide). In this study, the oxyhemoglobin was obtained from the reduction of the methemoglobin using the agent reducing sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). This procedure was performed in the "Computational Neuroengineering Laboratory" (Neurolab/UFSC) in a chromatographic column composed of the resin Sephadex G-25, using the exclusion molecular liquid chromatography method. The quantification of oxyhemoglobin was verified by the Drabkin method and the deoxygenation reaction was evaluated in the equipment *Stopped Flow Mixer 4000/S (SFM 4000/S)* by rapid mixing method with stopped flow. The experimental results obtained were used to determine the kinetic constants of a mathematical model for deoxygenation reaction of the oxyhemoglobin using a hybrid optimization method. We compared the results with the model of pseudo first order and it is found that the model of the present work not only presents a result with smaller error comparing with the experimental one, as well allows a thorough analysis of the dynamics of the intermediates of the reaction. It was possible observe also that it is not acceptable the definition of a set of kinetic absolute constants, but can think in a feasible region, whose criterion is the ordering of the values in crescent order ($k_{-4} < k_{-3} < k_{-2} < k_{-1}$) and k_{-4} within a range of 40 a 60 s^{-1} .

Keywords: Hemoglobin. Oxygen. Kinetic constants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da hemoglobina mostrando suas quatro cadeias globínicas dispostas em alfa e beta e os quatro grupos prostéticos heme.	32
Figura 2 - Molécula de hemoglobina	32
Figura 3 - Representação do grupo prostético heme (Ferro-protoporfirina IX) ligado ao íon ferroso (Fe^{2+})	33
Figura 4 - Denomina-se de hematose a troca gasosa entre o O_2 e o CO_2 nos pulmões.....	35
Figura 5 - Redução da meta-hemoglobina em oxi-hemoglobina pela ação da enzima meta-hemoglobina redutase.....	37
Figura 6 - Transição da hemoglobina do estado desoxigenado (T) para o completamente oxigenado (R)	38
Figura 7 - Diferença entre a estrutura molecular da desoxi-hemoglobina e da oxi-hemoglobina.....	39
Figura 8 - Gráfico de saturação da hemoglobina com oxigênio (%) em função da pressão parcial de oxigênio (pO_2).....	40
Figura 9 - Estrutura e síntese do 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG). O 2,3-BPG é um produto exclusivo do metabolismo dos eritrócitos.....	41
Figura 10 - Representação da ligação do 2,3-BPG na molécula de desoxi-hemoglobina.....	42
Figura 11 - Curva de dissociação do oxigênio com a hemoglobina humana adulta, demonstrando as alterações de pH.....	43
Figura 12 - Etapas consecutivas e reversíveis da reação entre a hemoglobina e o oxigênio, que ocorre no organismo.....	46
Figura 13 - A escala de tempo de várias técnicas cinéticas.....	50
Figura 14 - Representação do método de mistura rápida com fluxo contínuo. ...	52
Figura 15 - Funcionamento do método de mistura rápida com fluxo interrompido.	53
Figura 16 - Representação da cinética das reações entre hemoproteínas e pequenos ligantes para a aplicação de fotólise por pulso de laser.....	56
Figura 17 - Ilustração do esquema de funcionamento do equipamento de fotólise por pulso de laser.....	57
Figura 18 - Fluxograma do funcionamento de um algoritmo genético (AG) tradicional.....	61

Figura 19 - Fluxograma de todas as metodologias utilizadas para a realização do procedimento experimental.	65
Figura 20 - Cromatografia líquida de filtração em gel de exclusão molecular realizada na coluna cromatográfica composta pela resina Sephadex G-25.....	67
Figura 21 - Método de diálise.....	68
Figura 22 - Quantificação da oxi-hemoglobina pelo método de Drabkin utilizando um padrão de concentração conhecida de 10 g/dL.	70
Figura 23 - Diferentes espectros de absorção das formas estruturais da molécula de hemoglobina, representando a região da banda de <i>Soret</i> (pico maior) e da banda <i>Q</i> (pico menor).	71
Figura 24 - Equipamento <i>Stopped Flow Mixer 4000/S (SFM 4000/S)</i> e seus componentes.....	73
Figura 25 - Sistema óptico <i>MOS/200</i>	74
Figura 26 - Demonstração da configuração do tempo total de observação da reação (4 s).....	74
Figura 27 - Padronização da sequência de mistura da oxi-hemoglobina com ditionito de sódio.....	75
Figura 28 - Desenho do <i>SFM 4000/S</i> aberto para demonstrar a localização de todos os misturadores M1, M2 e M3 do tipo <i>Berger Ball</i>	77
Figura 29 - Representação da ordem de distribuição das seringas S1, S2, S3 e S4 no <i>SFM 4000/S</i> com seus respectivos reagentes.....	79
Figura 30 - Ilustração da restrição imposta para determinar os coeficientes das curvas de calibração.....	82
Figura 31 - Fluxograma do programa computacional de algoritmo genético....	84
Figura 32 - Ilustração da forma de construção dos pontos do espaço de fase....	88
Figura 33 - Determinação do espectro de absorção da meta-hemoglobina (linha contínua) e da oxi-hemoglobina (linha tracejada).....	89
Figura 34 - Diferença das curvas do espectro de absorção da oxi-hemoglobina (linha contínua) e da desoxi-hemoglobina (linha tracejada).....	90
Figura 35 - Curva de calibração da absorbância (D.O.) em função da concentração de oxi-hemoglobina (μM).....	92
Figura 36 - Curva de calibração da absorbância (D.O.) em função da concentração de desoxi-hemoglobina (μM).....	93

Figura 37 - Gráfico da desoxigenação de todas as concentrações de oxi-hemoglobina (10; 20; 30; 40 e 50 μM) analisadas por 4 s no <i>SFM 4000/S</i> utilizando o comprimento de onda em 415 nm (região da banda de <i>Soret</i>).	94
Figura 38 - Gráfico ampliado da desoxigenação de todas as concentrações de oxi-hemoglobina para 0,2 s, demonstrando o tempo morto para cada uma das concentrações de oxi-hemoglobina analisadas (pelas flechas).....	95
Figura 39 - Valores gerados aleatoriamente para a constante cinética k_{-4}	96
Figura 40 - Valores gerados aleatoriamente para a constante cinética k_{-3}	96
Figura 41 - Valores gerados aleatoriamente para a constante cinética k_{-2}	97
Figura 42 - Valores gerados aleatoriamente para a constante cinética k_{-1}	97
Figura 43 - Valores gerados aleatoriamente para o coeficiente intermediário da curva de calibração do modelo a_1 , mostrado em diferentes escalas.	98
Figura 44 - Valores gerados aleatoriamente para o coeficiente intermediário da curva de calibração do modelo a_2 , mostrado em diferentes escalas.	99
Figura 45 - Valores gerados aleatoriamente para o coeficiente intermediário da curva de calibração do modelo a_3 , mostrado em diferentes escalas.	100
Figura 46 - Valor da constante cinética k_{-4} para erro igual ou abaixo de 2,5. 102	
Figura 47 - Valor da constante cinética k_{-4} para erro igual ou abaixo de 1,0. 102	
Figura 48 - Valor da constante cinética k_{-4} para erro igual ou abaixo de 0,5. 103	
Figura 49 - Valor da constante cinética k_{-4} para erro igual ou abaixo de 0,1. 103	
Figura 50 - Valor da constante cinética k_{-3} para erro igual ou abaixo de 2,5. 104	
Figura 51 - Valor da constante cinética k_{-3} para erro igual ou abaixo de 1,0. 104	
Figura 52 - Valor da constante cinética k_{-3} para erro igual ou abaixo de 0,5. 105	
Figura 53 - Valor da constante cinética k_{-3} para erro igual ou abaixo de 0,1. 105	
Figura 54 - Valor da constante cinética k_{-2} para erro igual ou abaixo 2,5.	106
Figura 55 - Valor da constante cinética k_{-2} para erro igual ou abaixo 1,0.	106
Figura 56 - Valor da constante cinética k_{-2} para erro igual ou abaixo 0,5.	107
Figura 57 - Valor da constante cinética k_{-2} para erro igual ou abaixo 0,1.	107
Figura 58 - Valor da constante cinética k_{-1} para erro igual ou abaixo 2,5.	108
Figura 59 - Valor da constante cinética k_{-1} para erro igual ou abaixo 1,0.	108
Figura 60 - Valor da constante cinética k_{-1} para erro igual ou abaixo 0,5.	109

Figura 61 - Valor da constante cinética k_{-1} para erro igual ou abaixo 0,1.....	109
Figura 62 - Espaço de fase para valor com erro abaixo de 2,5.	110
Figura 63 - Espaço de fase para valor com erro abaixo de 1,0.	111
Figura 64 - Espaço de fase para valor com erro abaixo 0,5.	111
Figura 65 - Espaço de fase para valor com erro abaixo de 0,1.	112
Figura 66 - Espaço de fase em escala ampliada para valores de erro igual ou abaixo de 0,5.....	112
Figura 67 - Espaço de fase em escala ampliada para valores de erro igual ou abaixo de 0,1.....	113
Figura 68 - Valores das constantes cinéticas após a execução da busca unidirecional: a) todas as constantes cinéticas com valores até 20.000 e b) todas as constantes cinéticas com valores inferiores a 500.	114
Figura 69 - Valores dos coeficientes intermediários das curvas de calibração após a execução da busca unidirecional: a) todos os coeficientes angulares da curva de calibração com valores até 0,01 e b) mesmo gráfico ampliado.	116
Figura 70 - Espaço de fase de todos os pontos gerados na busca unidirecional.	117
Figura 71 - Espaço de fase dos pontos cujo valor de k_{-4} está entre 46,5 e 55,8.	117
Figura 72 - Erro antes (a) e após (b) a realização da busca unidirecional.....	118
Figura 73 - Valores de a) k_{-1} e do b) erro após a realização da busca unidirecional.	119
Figura 74 - Valores de k_{-4} antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração.	121
Figura 75 - Valores de k_{-3} antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração.	122
Figura 76 - Valores de k_{-2} antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração.	123
Figura 77 - Valores de k_{-1} antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração.	124
Figura 78 - Valores de a_1 antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração.	125
Figura 79 - Valores de a_2 antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes das curvas de calibração.	126

Figura 80 - Valores de a_3 antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes das curvas de calibração.	127
Figura 81 - Valores das constantes cinéticas após a realização da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes das curvas de calibração.	128
Figura 82 - Valores dos coeficientes intermediários das curvas de calibração após a realização da busca unidirecional sem restrição.	130
Figura 83 - Erro após a busca unidirecional para o caso: a) com restrição e b) sem restrição.	131
Figura 84 - Erro do melhor conjunto até o 20º teste para 10 execuções do programa.	132
Figura 85- Erro do melhor conjunto desde o 20º teste até o 100º para 10 execuções do programa.	133
Figura 86 - Valores das constantes cinéticas após a execução do método de algoritmo genético: a) k_{-4} ; b) k_{-3}	134
Figura 87 - Valores das constantes cinéticas após a execução do método de algoritmo genético: a) k_{-2} e b) k_{-1}	135
Figura 88 - Coeficientes intermediários das curvas de calibração obtidos pelo método de algoritmo genético.	136
Figura 89 - Valores de k_{-4} para diferentes probabilidades de mutação.	137
Figura 90 - Valores de k_{-3} para diferentes probabilidades de mutação.	137
Figura 91 - Valores de k_{-2} para diferentes probabilidades de mutação.	138
Figura 92 - Valores de k_{-1} para diferentes probabilidades de mutação.	138
Figura 93 - Valores de erro para diferentes probabilidades de mutação.	139
Figura 94 - Valores de k_{-4} obtidos após usar o método de otimização híbrido.	140
Figura 95 - Valores de k_{-3} obtidos após usar o método de otimização híbrido.	140
Figura 96 - Valores de k_{-2} obtidos após usar o método de otimização híbrido.	141
Figura 97 - Valores de k_{-1} obtidos após usar o método de otimização híbrido.	141
Figura 98 - Valores das constantes cinéticas obtidas após a utilização do método de otimização híbrido.	142

Figura 99 - Valores dos erros obtidos após a utilização do método de otimização híbrido.	143
Figura 100 - Espaço de fase obtido pelos métodos: a) algoritmo genético e b) híbrido.	144
Figura 101 - Espaço de fase obtido a partir do método híbrido considerando apenas os conjuntos que tem ordenamento das constantes cinéticas e valor de k_{-4} entre 40 e 60 s^{-1}	145
Figura 102 - Curvas de calibração da $Hb(O_2)_1$	146
Figura 103 - Curvas de calibração da $Hb(O_2)_2$	146
Figura 104 - Curvas de calibração da $Hb(O_2)_3$	147
Figura 105 - Comparação entre o resultado experimental e o modelo do presente trabalho para concentração de 10 μM (método de otimização híbrido).....	148
Figura 106 - Comparação entre o resultado experimental e o modelo do presente trabalho para concentração de 20 μM (método de otimização híbrido).....	148
Figura 107 - Comparação entre o resultado experimental e o modelo do presente trabalho para concentração de 30 μM (método de otimização híbrido).....	149
Figura 108 - Comparação entre o resultado experimental e o modelo do presente trabalho para concentração de 40 μM (método de otimização híbrido).....	149
Figura 109 - Comparação entre o resultado experimental e o modelo do presente trabalho para concentração de 50 μM	150
Figura 110 - Comparação entre o resultado experimental, o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem para concentração de 10 μM . 151	151
Figura 111 - Comparação entre o resultado experimental, o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem para concentração de 20 μM . 151	151
Figura 112 - Comparação entre o resultado experimental, o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem para concentração de 30 μM . 152	152
Figura 113 - Comparação entre o resultado experimental, o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem para concentração 40 μM	152
Figura 114 - Comparação entre o resultado experimental, o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem para concentração de 50 μM . 153	153
Figura 115 - Concentração da $Hb(O_2)_0$ em função do tempo.	154
Figura 116 - Concentração da $Hb(O_2)_1$ em função do tempo.	154
Figura 117 - Concentração da $Hb(O_2)_2$ em função do tempo.	155
Figura 118 - Concentração da $Hb(O_2)_3$ em função do tempo.	155

Figura 119 - Concentração da $Hb(O_2)_4$ em função do tempo.	156
Figura 120 - Comparação entre as concentrações de oxi-Hb [$Hb(O_2)_4$] utilizando o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem.	157
Figura 121 - Comparação entre as concentrações de desoxi-Hb [$Hb(O_2)_0$] utilizando o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem.	157
Figura 122 - Curva característica do presente trabalho.	158
Figura 123 - Concentração da $Hb(O_2)_0$ em função do tempo para todos os conjuntos viáveis obtidos pelo método híbrido.	159
Figura 124 - Concentração da $Hb(O_2)_1$ em função do tempo para todos os conjuntos viáveis obtidos pelo método híbrido.	159
Figura 125 - Concentração da $Hb(O_2)_2$ em função do tempo para todos os conjuntos viáveis obtidos pelo método híbrido.	160
Figura 126 - Concentração da $Hb(O_2)_3$ em função do tempo para todos os conjuntos viáveis obtidos pelo método híbrido.	160
Figura 127 - Concentração da $Hb(O_2)_4$ em função do tempo para todos os conjuntos viáveis obtidos pelo método híbrido.	161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores referenciais da hemoglobina humana.....	34
Tabela 2 - Parâmetros utilizados na busca unidirecional.	83
Tabela 3 - Representação do acasalamento dos pais obtendo como resultado 10 filhos.	86
Tabela 4 - Parâmetros utilizados no algoritmo genético.	87
Tabela 5 - Quantidade de conjuntos que resultam em erros abaixo de determinados valores.....	101
Tabela 6 - Médias calculadas para as duas regiões (Região 1 e Região 2) de todas as constantes cinéticas.....	129
Tabela 7 - Comparação entre os valores médios obtidos para os parâmetros do modelo do presente trabalho comparados com as constantes cinéticas obtidas por Gibson (1970).	162
Tabela 8 - Representação dos valores do tempo morto utilizado na literatura em comparação com o presente trabalho.	162

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Algoritmo genético
a_i	Coefficiente angular intermediário da curva de calibração
aac	Aminoácido
2,3-BPG	Ácido 2,3-difosfonoxipropanóico
BU	Busca unidirecional
CA	Enzima anidrase carbônica
Desoxi-Hb	Desoxi-hemoglobina
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	Ditionito de sódio ou hidrossulfito de sódio
Fe^{2+}	Estado ferroso
Fe^{3+}	Estado férrico
Hb	Hemoglobina
H_2CO_3	Ácido carbônico
HCO_3^-	Bicarbonato
Hepes	Hepes sódico-ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1 sal sódico
His E7	Histidina distal
His F8	Histidina proximal
Meta-Hb	Meta-hemoglobina
$k_{i\text{ou}-i}$	Constante cinética de associação ou de dissociação
NaOH	Hidróxido de sódio
Oxi-Hb	Oxi-hemoglobina
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Estrutura quaternária relaxada (favorável à ligação com o oxigênio)
SFM	<i>Stopped Flow Mixer</i> (equipamento de mistura rápida com fluxo interrompido)
T	Estrutura quaternária tensa (desfavorável à ligação com o oxigênio)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	27
1.1 OBJETIVOS	29
1.1.1 Objetivo Geral	29
1.1.2 Objetivos Específicos	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 HEMOGLOBINA	31
2.1.1 Estados conformacionais da hemoglobina e suas funções	34
2.2 MECANISMO DE COOPERATIVIDADE	37
2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A AFINIDADE DA HEMOGLOBINA PELO OXIGÊNIO	39
2.3.1 Ácido 2,3-difosfonoxipropanóico (2,3-BPG)	41
2.3.2 Potencial Hidrogeniônico (pH)	42
2.4 CONSEQUÊNCIAS DA BAIXA OXIGENAÇÃO CELULAR CAUSADA PELA DIMINUIÇÃO DO APORTE DE HEMOGLOBINA SANGUÍNEA	43
2.5 MODELO MATEMÁTICO PARA REAÇÃO ENTRE HEMOGLOBINA E OXIGÊNIO	44
2.6 MÉTODOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS PARA A ANÁLISE DE DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA	50
2.6.1 Método de mistura rápida com fluxo contínuo	51
2.6.2 Método de mistura rápida com fluxo interrompido	52
2.6.3 Método de fotólise por pulso de laser (mistura rápida por <i>flash</i> -fotólise)	55
2.7 MÉTODOS DE OTIMIZAÇÃO	57
2.7.1 Busca unidirecional	58
2.7.2 Algoritmo genético	59
2.8 MÉTODOS DE OTIMIZAÇÃO HÍBRIDOS	62
3 MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.1 MATERIAIS	63
3.1.1 Reagentes	63
3.1.2 Equipamentos e utensílios	64

3.2 MÉTODOS	64
3.2.1 Redução da meta-hemoglobina pelo método de cromatografia líquida por gel de exclusão molecular (SephadexG-25)	65
3.2.2 Purificação da oxi-hemoglobina pelo método de diálise	68
3.2.4 Determinação do espectro de absorção da molécula de hemoglobina	70
3.2.5 <i>Stopped Flow Mixer 4000/S</i> e método de mistura rápida com fluxo interrompido	72
3.2.5.1 Processo de desoxigenação da oxi-hemoglobina no SFM 4000/S utilizando como agente redutor o ditionito de sódio	77
3.2.5.2 Curvas de calibração	79
3.2.6 Otimização das constantes cinéticas	80
3.2.6.1 Função objetivo (FO)	80
3.2.6.2 Busca unidirecional	81
3.2.6.3 Algoritmo genético	83
3.2.6.4 Construção do espaço de fase	87
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	89
4.1 REDUÇÃO DA META-HEMOGLOBINA E QUANTIFICAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA	89
4.2 CONFIRMAÇÃO DA DESOXIGENAÇÃO COMPLETA DA OXI-HEMOGLOBINA UTILIZANDO O DITIONITO DE SÓDIO.....	90
4.3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	91
4.4 EXPERIMENTOS DE DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA NO SFM 4000/S.....	93
4.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO MODELO	95
5 CONCLUSÃO	163
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	165
REFERÊNCIAS.....	167
APÊNDICE A – Procedimento experimental.....	179
APÊNDICE B – Programa computacional.....	183

INTRODUÇÃO

A reação química que ocorre entre a hemoglobina (Hb) e o oxigênio (O_2) permite que o mesmo seja distribuído pelo sangue, mantendo a homeostase e a sobrevivência celular. O princípio básico para uma adequada oxigenação tecidual é o fornecimento de uma taxa suficiente de O_2 para o suprimento da necessidade metabólica, minimizando, assim, o desencadeamento de doenças, tais como hemoglobinopatias, cardiopatias, acidentes vasculares cerebrais, dentre outras (BLAU; STAMATOYANNOPOULOS, 1994; BUNN; FORGET, 1986; LI *et al.*, 2016; HIGGS; ENEGEL; STAMATOYANNOPOULOS, 2012).

A hemoglobina humana foi a primeira molécula a ter sua estrutura desvendada por meio de raio-X pelos pesquisadores Max Perutz e John Cowdery Kendrew em 1959 (PERUTZ, 1960). Durante o último século recebeu grande enfoque da comunidade científica, por ser uma proteína especializada em transportar os gases O_2 e CO_2 . A hemoglobina humana transporta aproximadamente 97% do oxigênio dos pulmões para os tecidos. Além disso, pode contribuir como um importante tampão celular, removendo os íons hidrogênio a fim de manter o pH equilibrado e retirando o CO_2 dos tecidos para ser expelido pelos pulmões (THOMAS; LUMB, 2012). Sua estrutura molecular de 64.458 Daltons (64 kDa) é constituída por uma unidade proteica, composta por grupamentos de aminoácidos denominados globinas (α_1 , α_2 , β_1 e β_2), e por outra não proteica, formada por um grupo prostético heme ligado ao íon ferroso (Fe^{2+}) (PERUTZ, 1979; THOMAS; LUMB, 2012). O íon ferroso apresenta seis sítios de coordenações: estabelece quatro ligações com cada um dos átomos de nitrogênio do anel protoporfirínico, a quinta união ocorre com o radical imidazólico da histidina proximal e a sexta ligação pode se encontrar livre quando a hemoglobina está desoxigenada ou ocupada pelo oxigênio que se encontra unido à histidina distal, caracterizando a hemoglobina oxigenada (MOREIRA *et al.*, 2011; NAPOLITANO, 2009). A estrutura tetraédrica da hemoglobina estabelece cooperatividade entre os grupos prostéticos heme, uma vez que, após a primeira molécula de O_2 se acoplar ao átomo ferroso, há uma tendência em aumentar a afinidade dessa proteína pelo O_2 , facilitando as ligações subsequentes (THOMAS; LUMB, 2012). Devido a essa cooperatividade, existem duas formas básicas nas quais a Hb pode se apresentar: na forma tensa (T), chamada de desoxi-hemoglobina, e na forma relaxada (R), chamada de oxi-hemoglobina (REN, 2013; YONETANI; LABERGE, 2008).

Modelos matemáticos que descrevem a reação entre a hemoglobina e o oxigênio, considerando que a mesma ocorre em quatro etapas reversíveis, sucessivas e cooperativas já foram publicados. Quentin H. Gibson foi o pioneiro a estimar as oito constantes cinéticas do modelo para essa reação. Porém, seus resultados são questionáveis em função da limitação dos equipamentos utilizados na época em que foram realizados os experimentos (GIBSON, 1970). Esse questionamento se deve à rapidez com que ocorre a reação entre a hemoglobina e o oxigênio, exigindo a utilização de equipamentos que possibilitem a análise da dinâmica da reação com tempo morto inferior a 1 ms (BERGER *et al.*, 1967). Por isso, o presente trabalho destina-se à realização experimental da reação de desoxigenação da oxí-hemoglobina com o objetivo de estimar todas as constantes cinéticas de dissociação (k_{-4} , k_{-3} , k_{-2} , k_{-1}) juntamente com os coeficientes angulares intermediários da curva de calibração (a_1 , a_2 e a_3). Um dos métodos para determinar as constantes do modelo matemático que descreve esse fenômeno biológico é utilizar um método de otimização híbrido (combinação dos métodos de algoritmo genético com restrição em conjunto com o de busca unidirecional com e sem restrição) (ARORA, 2004; RAO, 2009).

Com a intenção de satisfazer as necessidades para avaliar reações extremamente rápidas, o Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) adquiriu o equipamento *Stopped Flow Mixer 4000/S* (*SFM 4000/S*) para ser utilizado em análises que necessitam ser mensuradas na ordem de grandeza de milissegundos. O *SFM 4000/S* é composto por quatro seringas independentes, onde são armazenadas as substâncias que participarão da reação química, três misturadores do tipo *Berger Ball* de elevada eficácia e uma microcubeta de observação para analisar a absorbância da amostra controlada por um software (Bio-Kine 32 versão 4.74) interligado ao próprio equipamento (BIO-LOGIC SCIENCE INSTRUMENTS, 2014).

É importante ressaltar que essa pesquisa visa contribuir, através da determinação das constantes cinéticas da reação de desoxigenação da oxí-hemoglobina, com o modelo matemático que objetiva a predição da dinâmica da oxigenação tecidual desenvolvido no “Laboratório de Neuroengenharia Computacional” (Neurolab/UFSC).

Destaca-se que as ferramentas matemáticas de um engenheiro químico são adequadas e capazes de contribuir para o estudo aqui apresentado. Todavia, os conhecimentos da área biológica são essenciais para o seu desenvolvimento, uma vez que apresenta peculiaridades distintas daquelas às quais o engenheiro químico está habituado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é realizar experimentalmente a reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina pelo método de mistura rápida com fluxo interrompido a fim de otimizar as constantes cinéticas que integram o modelo matemático para esta reação utilizando o método de otimização híbrido.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. elaborar um procedimento operacional padrão para a reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina no equipamento *Stopped Flow Mixer 4000/S (SFM 4000/S)*¹;
2. realizar os experimentos de desoxigenação da oxi-hemoglobina pelo método de mistura rápida com fluxo interrompido no *SFM 4000/S*;
3. determinar as quatro constantes cinéticas de dissociação do oxigênio com a oxi-hemoglobina e os três coeficientes angulares intermediários da curva de calibração, a partir dos dados experimentais obtidos, utilizando um método de otimização híbrido (combinação dos métodos de algoritmo genético e de busca unidirecional).

¹ O procedimento experimental da reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina foi elaborado em conjunto com Márcio Paiano de Souza e está disponível em Souza (2016).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

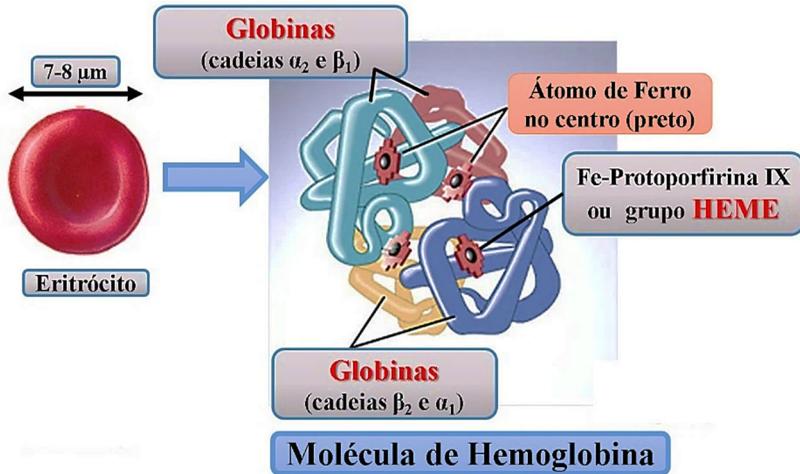
A revisão bibliográfica deste trabalho objetiva expor os seguintes tópicos: estrutura molecular, função e estado conformacional da hemoglobina; mecanismo de cooperatividade; fatores que influenciam a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio; apresentação do modelo matemático para a reação entre hemoglobina e oxigênio e descrição dos métodos utilizados que possibilitam o estudo dessa reação.

2.1 HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular, sintetizada pelos eritroblastos e reticulócitos localizada no interior dos eritrócitos. Os eritrócitos são células anucleadas com 7 a 8 μm de diâmetro e de formato oval bicôncavo (Figura 1) (NAPOLITANO, 2009). A eritropoiese acontece na medula óssea e os glóbulos vermelhos permanecem ativos na corrente sanguínea em média por 120 dias (PEÑUELA, 2005). Em um adulto saudável, estima-se que haja de 4,5 a 5 milhões de eritrócitos por milímetro cúbico e cada eritrócito possua entre 200 e 300 milhões de moléculas de Hb. De acordo com Peñuela (2005), um litro de sangue contém 150 g de Hb e cada grama de Hb carrega 1,34 mL de oxigênio. Deste modo, estima-se que a capacidade total de transporte da Hb seja de 201 mL de oxigênio por litro de sangue (THOMAS; LUMB, 2012).

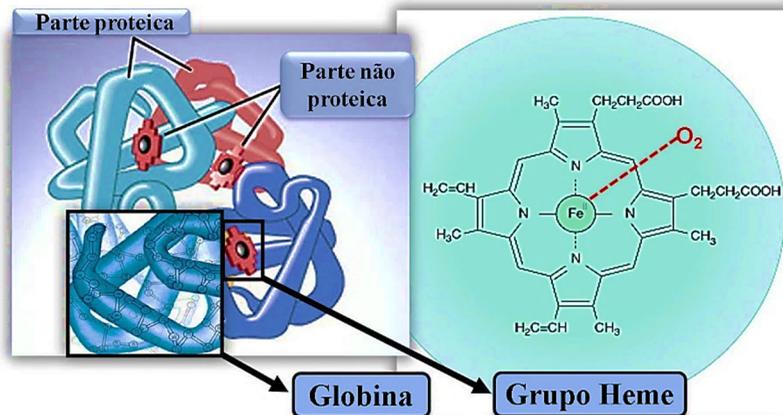
A hemoglobina é constituída por uma unidade proteica (aminoácidos unidos por ligação covalente) e outra não proteica (grupo prostético heme), as quais conferem propriedades fundamentais ao fornecimento de oxigênio (O_2) para as células. A fração proteica da hemoglobina é composta por duas cadeias de globinas do tipo α (α_1 e α_2) e duas cadeias de globinas do tipo β (β_1 e β_2) que estão arrançadas em dímeros ($\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$), como mostrado na Figura 2 (NAPOLITANO, 2009; PERUTZ *et al.*, 1998; TAKAYANAGI; KURISAKI; NAGAOKA, 2014). Cada uma das cadeias alfa (α_1 e α_2) possuem 141 aminoácidos (aac), formados pela valina como N-terminal e pela arginina como C-terminal. As cadeias beta (β_1 e β_2) são constituídas por 146 aac cada, possuindo a valina como N-terminal e a histidina como C-terminal, totalizando 574 aac para compor a parte proteica de uma molécula de Hb (MOREIRA *et al.*, 2011; THOMAS; LUMB, 2012). O grupo prostético heme consiste na unidade não proteica da Hb e é composto por quatro anéis pirrólicos que envolvem o íon ferroso (Fe^{2+}), proporcionando maior estabilidade para esse metal, de acordo com a Figura 2 (PERUTZ *et al.*, 1998; THOMAS; LUMB, 2012).

Figura 1 - Representação da hemoglobina mostrando suas quatro cadeias globínicas dispostas em alfa e beta e os quatro grupos prostéticos heme.



Fonte: Adaptado de Napolitano (2009).

Figura 2 - Molécula de hemoglobina identificando a parte proteica formada pelas globinas e a parte não proteica destacada pelo grupo prostético heme com o átomo de ferro central (Fe^{2+}), onde se acopla a molécula de oxigênio.

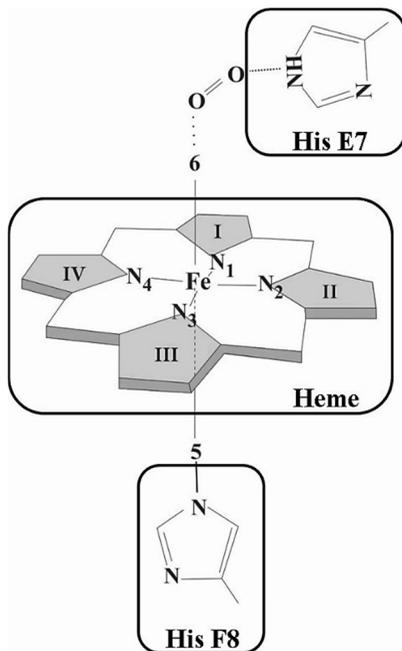


Fonte: Adaptado de Napolitano (2009).

O ferro, presente na parte central do grupo prostético heme da Hb, é fundamental à vida celular por ser capaz de se ligar não covalentemente à molécula de oxigênio (4 átomos de Fe^{2+} se ligam a 4 moléculas de O_2). Esse metal apresenta seis sítios de coordenação, conforme representado na Figura 3 (MOREIRA *et al.*, 2011; PEÑUELA, 2005; PERUTZ *et al.*, 1998):

- N_1 , N_2 , N_3 e N_4 estão ligados por pontes de metano com cada um dos átomos de nitrogênio do anel protoporfírico I, II, III e IV;
- a quinta ligação encontra-se permanentemente acoplada ao radical imidazólico da histidina proximal (His F8) da globina;
- no estado desoxigenado a sexta união permanece livre;
- na sua forma oxigenada a sexta ligação não covalente permanece ocupada pelo oxigênio, que está conectado à histidina distal (His E7) da globina.

Figura 3 - Representação do grupo prostético heme (Ferro-protoporfirina IX) ligado ao íon ferroso (Fe^{2+}).



Fonte: Adaptado de Moreira *et al.* (2011).

O grupo prostético heme está ancorado nas globinas pela His F8 na hélice F globínica para proporcionar maior equilíbrio ao grupamento funcional da Hb e pela His E7 na hélice E globínica para aumentar a estabilidade da molécula quando o oxigênio se conecta não covalentemente, essa interação contribui de uma forma significativa para a consolidação de sua estrutura tetramérica, segundo a Figura 3 (MOREIRA *et al.*, 2011).

A hemoglobina humana adulta é constituída por 97 % de HbA₁ ($\alpha_2\beta_2$), 2 % de HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) e 1% de HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Seu valor de referência no sangue de indivíduos saudáveis encontra-se entre 11 a 18 g/dL, variando conforme a idade, como indicado na Tabela 1 (LI *et al.*, 2016; THOMAS; LUMB, 2012).

Tabela 1 - Valores referenciais da hemoglobina humana.

Parâmetros da Hemoglobina	Valores de Referência
Bebê (até um ano)	11,0 a 13,0 (g/dL)
Criança (até 12 anos)	11,5 a 15,0 (g/dL)
Mulher (g/dL)	11,5 a 16,0 (g/dL)
Homem (g/dL)	13,5 a 18,0 (g/dL)

Fonte: Adaptado de Lorenzi (2006).

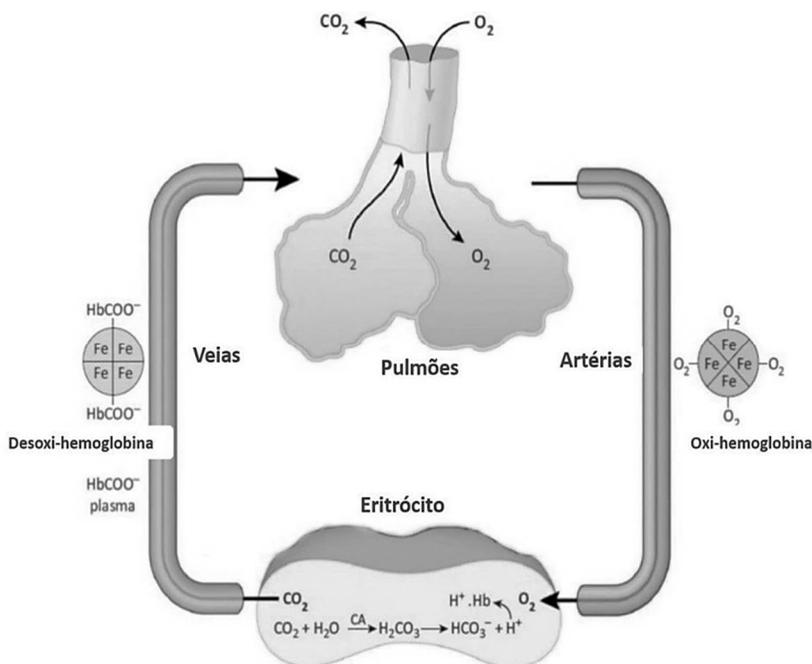
2.1.1 Estados conformacionais da hemoglobina e suas funções

A hemoglobina pode se apresentar em três estados conformacionais distintos no organismo humano:

- a) meta-hemoglobina (Hb com Fe³⁺);
- b) desoxi-hemoglobina (Hb com Fe²⁺);
- c) oxi-hemoglobina (HbO₂, HbO₄, HbO₆ e HbO₈).

A principal função da hemoglobina é transportar o oxigênio e o dióxido de carbono essencial para manter a integridade celular (CLEMENTI *et al.*, 1994; GEO *et al.*, 2015; SOWOLE; VUONG; KONERMANN, 2015). Em condições fisiológicas, a sua forma oxigenada é capaz de carregar aproximadamente 97% do O_2 dos pulmões para os tecidos periféricos (Figura 5), possibilitando o tamponamento de íons hidrogênio (H^+). Os 3% restantes de O_2 circulam livremente fora dos eritrócitos, dissolvido no plasma sanguíneo (ALAYASH, 2014; CLEMENTI *et al.*, 1994). Sua forma desoxigenada se liga ao CO_2 , permitindo sua condução dos tecidos até os pulmões, onde é expelido, como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Denomina-se de hematose a troca gasosa entre o O_2 e o CO_2 nos pulmões. O_2 é transportado dos pulmões para os tecidos pela oxi-hemoglobina e o CO_2 produzido nos tecidos é levado para os pulmões pela desoxi-hemoglobina.



Fonte: Adaptado de Alayash (2014).

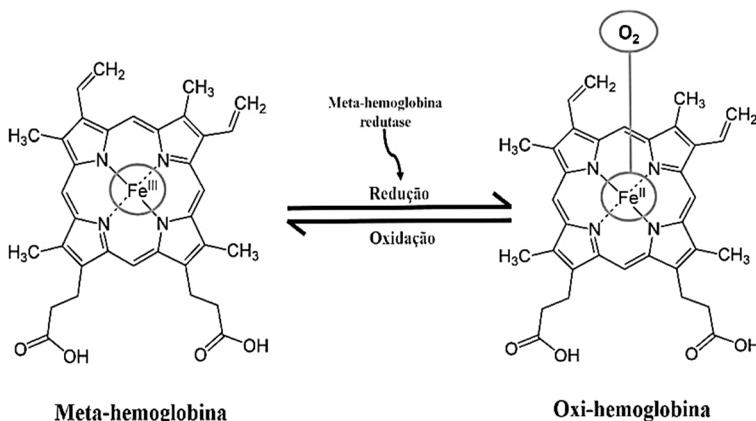
O transporte sanguíneo de CO₂ ocorre por três maneiras (ALAYASH, 2014; DASH; BASSINGTHWAIGHTE, 2006; MOREIRA *et al.*, 2011; PEÑUELA, 2005):

- 1) 25 % associado ao terminal aminico (NH₂) da hemoglobina formando o composto carbamino-hemoglobina ($Hb + CO_2 \rightleftharpoons HbCO_2$);
- 2) 70 % sob a forma de íon bicarbonato (HCO₃⁻). A reação de hidratação do CO₂ (dentro dos eritrócitos) é catalisada pela enzima anidrase carbônica (CA), originando o ácido carbônico (H₂CO₃), que se dissocia em íons H⁺ e HCO₃⁻. O HCO₃⁻ se difunde no plasma e o H⁺ é captado pela hemoglobina para evitar alteração do pH sanguíneo. Quando a hemoglobina recebe o próton, diminui sua afinidade pelo O₂ e a desoxigenação fica facilitada, ou seja, descarrega mais O₂ nos tecidos transportando esse próton até os pulmões. Nos pulmões ocorre a reação inversa para o CO₂ ser expelido (H⁺ se desprende da Hb e se liga ao HCO₃⁻ formando o H₂CO₃, que se dissocia em H₂O e CO₂);
- 3) 5 % sob a forma dissolvida no plasma.

É importante esclarecer que o íon ferro, quando acoplado à hemoglobina, pode ser encontrado sob duas formas: no estado ferroso, constituindo a ferro-hemoglobina, ou no estado férrico, caracterizando a ferri-hemoglobina ou meta-hemoglobina (meta-Hb), como explicado na Figura 5. A meta-Hb (Figura 5) é uma hemoglobina anormal, que está presente no organismo de indivíduos saudáveis em quantidade inferior ou igual a 2% em relação à hemoglobina total. Representa a forma não funcional da proteína (Hb), pois no seu estado férrico a hemoglobina não é capaz de transportar oxigênio. Em condições fisiológicas normais, a meta-Hb é produzida naturalmente de forma lenta no processo de auto-oxidação, ou seja, da oxidação espontânea do íon ferroso (Fe²⁺) a férrico (Fe³⁺) (PERCY; LAPPIN, 2008). Caso esta oxidação persista, o oxigênio fica impossibilitado de se conectar reversivelmente por ligação não covalente à ferro-hemoglobina, diminuindo o aporte de oxigenação tecidual. Quando os níveis basais da meta-Hb se encontram elevados no sangue e o sistema controlador presente no organismo não é capaz de reduzi-la, está-se diante de um quadro patológico chamado de meta-hemoglobinemia congênita ou adquirida, predominando como resultado a hipóxia tissular. A enzima meta-hemoglobina redutase ou citocromo b5 redutase é responsável por manter o ferro no seu estado funcional pela redução do Fe³⁺ a Fe²⁺ (Figura 5). Doenças congênicas podem reduzir drasticamente o nível dessa enzima, aumentando significativamente a

expressão da meta-Hb na corrente sanguínea (SOWOLE; VUONG; KONERMANN, 2015). Outra possibilidade para o desenvolvimento do quadro de meta-hemoglobinemia adquirida verifica-se quando ocorre a ingestão, inalação ou contato com substâncias exógenas como analgésicos, anestésicos locais, quimioterápicos, nitratos e nitritos, corantes anilínicos, naftaleno, nitrobenzenos, nitroglicerinas, dentre outros (BARATA-SILVA *et al.*, 2015). Seres humanos que exibem entre 10 a 20% (1,5-2,5 g/dL) de meta-Hb no sangue são visivelmente cianóticos. Concentrações acima desse patamar (4,5-10,5 g/dL) já progridem em complicações mais sérias, como confusão mental, taquicardia, palpitações, dor torácica, arritmias cardíacas, acidose e isquemia neurológica, podendo ser fatal acima de 70% (10,5 g/dL) (DIXON; MCINTOSH, 1967; WARANG *et al.*, 2015).

Figura 5 - Redução da meta-hemoglobina em oxi-hemoglobina pela ação da enzima meta-hemoglobina redutase.



Fonte: Adaptado de Moreira *et al.* (2011).

2.2 MECANISMO DE COOPERATIVIDADE

O mecanismo de cooperatividade entre o O_2 e a hemoglobina, que ocorre em quatro etapas consecutivas e reversíveis, é resultado da interação de subunidades peptídicas (α_1 , α_2 , β_1 e β_2). Segundo Perutz (1979), essa interação acontece de forma sequencial nas subunidades peptídicas da hemoglobina, produzindo uma mudança conformacional na

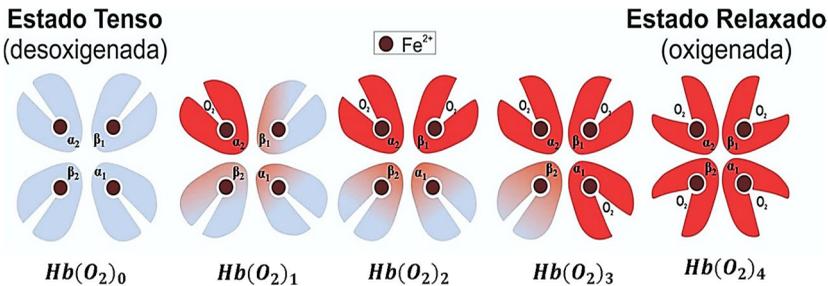
molécula. Essa mudança faz com que após a primeira ligação do O_2 ao íon ferroso, haja um aumento sucessivo na afinidade por esse ligante, facilitando as ligações seguintes, até que a hemoglobina esteja na sua forma totalmente oxigenada (quatro sítios acoplados ao O_2) (PERUTZ *et al.*, 1998; GEO *et al.*, 2015; GEVORKIAN *et al.*, 2015; REN, 2013).

O modelo estrutural da hemoglobina envolve duas conformações fundamentais com a mesma energia livre em relação ao oxigênio:

- a) estado tenso (T) é a forma desoxigenada da Hb, menos reativa e de baixa afinidade com o oxigênio;
- b) estado relaxado (R) é a forma oxigenada da Hb, mais reativa e de alta afinidade com o oxigênio.

A Figura 6 expressa a transição do estado T (Hb) para R (HbO_8), onde sucede a formação de vários intermediários oxigenados (HbO_2 / HbO_4 / HbO_6). A forma desoxigenada (T) está demonstrada pelo estreitamento da fenda, dificultando o acesso de oxigênio ao seu sítio ativo. Quando o primeiro oxigênio se acopla ao íon ferroso ocorre uma mudança no estado conformacional da molécula, facilitando a interação entre as cadeias de globinas adjacentes até sua completa oxigenação (R) (EATON *et al.*, 2007; GEO *et al.*, 2015; TAKAYANAGI; KURISAKI; NAGAOKA, 2014; YONETANI; LABERGE, 2008).

Figura 6 - Transição da hemoglobina do estado desoxigenado (T) para o completamente oxigenado (R).

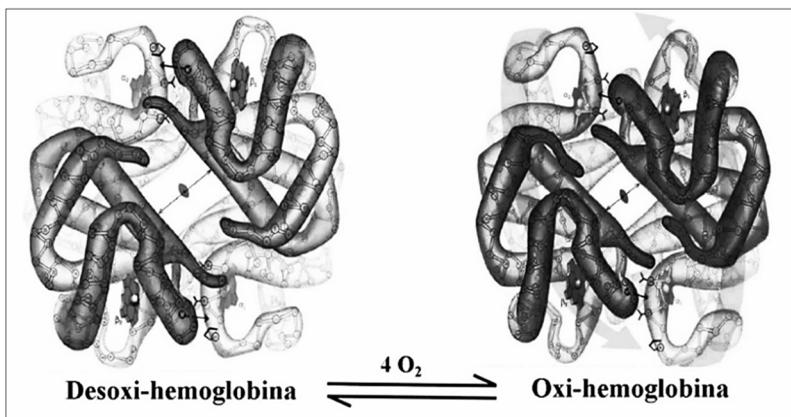


Fonte: Adaptado de Thomas e Lumb (2012).

Na oxi-hemoglobina (R) ocorre a ruptura das ligações de hidrogênio e iônicas entre os dímeros $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$, possibilitando maior liberdade de movimento das cadeias polipeptídicas, aumentando sua afinidade pelo oxigênio. Já na desoxi-hemoglobina (T), esse movimento se encontra reduzido devido às fortes ligações entre as cadeias

polipeptídicas. Na Figura 7 estão ilustradas paralelamente as duas conformações, onde pode ser evidenciado que a cavidade central entre as cadeias beta (β_1 e β_2) possuem um espaço maior na desoxi-hemoglobina e um espaço menor na oxi-hemoglobina (CLEMENTI *et al.*, 1994; GEO *et al.*, 2015; GEVORKIAN *et al.*, 2015; PERUTZ *et al.*, 1998; YONETANI; KANAORI, 2013).

Figura 7 - Diferença entre a estrutura molecular da desoxi-hemoglobina e da oxi-hemoglobina indicada pelas setas duplas mostrando o estreitamento da cavidade central entre as cadeias β .



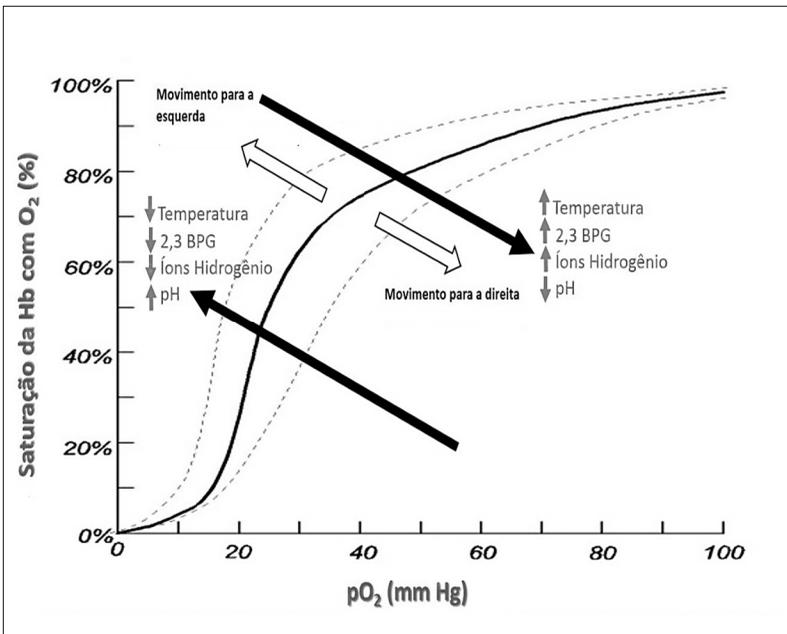
Fonte: Adaptado de Gibb (2002).

2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A AFINIDADE DA HEMOGLOBINA PELO OXIGÊNIO

A hemoglobina é considerada uma proteína alostérica por possuir um sítio ativo específico para ligação do substrato e outro sítio alostérico específico para ligação de moduladores alostéricos. Os moduladores podem atuar tanto inibindo (negativamente) quanto aumentando (positivamente) a afinidade da proteína ao substrato. Esse mecanismo de modulação pode modificar a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, deslocando para direita ou para esquerda o equilíbrio da curva sigmoidal, no gráfico de saturação da hemoglobina com oxigênio em função da pressão parcial de oxigênio (pO_2), como representado na Figura 8. O equilíbrio da curva se desloca para direita quando ocorre um aumento na concentração de 2,3-bifosfoglicerato, nos íons hidrogênios

(diminuição do pH) e na temperatura, diminuindo sua afinidade pelo oxigênio e estabilizando a hemoglobina na sua forma desoxigenada (T). Quando se movimenta para a esquerda acontece o contrário, provocando um aumento na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (Figura 8) (BOHR; HASSELBALCH; KROGH, 1904; JENSEN; STORZ; FAGO, 2016; LEOW, 2007; OKONJO, 2015; SASAGAWA; IMAI; KOBAYASHI, 2006).

Figura 8 - Gráfico de saturação da hemoglobina com oxigênio (%) em função da pressão parcial de oxigênio (pO_2) demonstrando os fatores que podem alterar o equilíbrio da curva sigmoidal.



Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

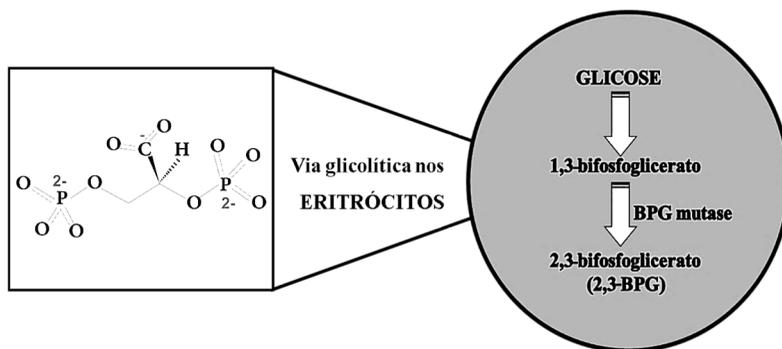
A Figura 8 também será utilizada para a explicação do Tópico 2.3.1.

2.3.1 Ácido 2,3-difosfonoxipropanóico (2,3-BPG)

O 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG ou ácido 2,3-difosfonoxipropanóico) é um fosfato orgânico sintetizado nos eritrócitos a partir de um intermediário da via glicolítica chamado 1,3-bisfosfoglicerato sob a ação de uma enzima mutase específica, como mostrado na Figura 9.

Segundo Benesch e colaboradores (1968), o 2,3-BPG exerce um papel fundamental no controle da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio por estar aproximadamente na mesma concentração dentro do eritrócito, estabilizando a hemoglobina na sua forma desoxigenada. Quando se encontra aumentado no sangue, faz com que o equilíbrio da curva de saturação da Hb desloque-se para a direita, facilitando a desoxigenação, conforme ilustrado na Figura 9 (BENESCH; BENESCH; ENOKI, 1968; CHENG *et al.*, 2001; STORZ; MORIYAMA, 2008).

Figura 9 - Estrutura e síntese do 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG). O 2,3-BPG é um produto exclusivo do metabolismo dos eritrócitos formado a partir de um dos intermediários da via glicolítica.

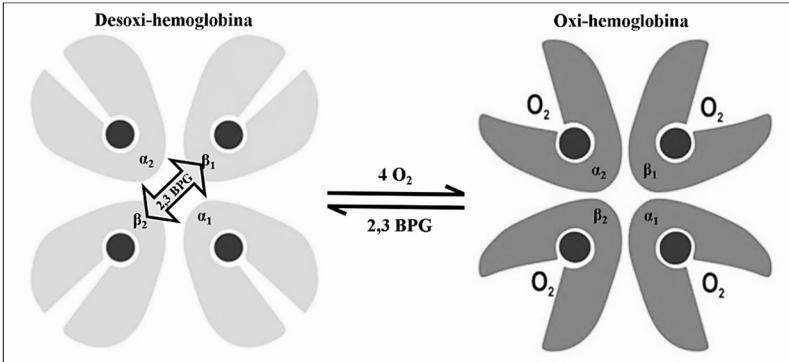


Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

Em elevadas altitudes, onde a pressão atmosférica está reduzida, acontece o aumento da concentração de 2,3-BPG sanguínea, elevando os níveis da enzima BPG mutase como mecanismo compensatório. O aumento na síntese de 2,3-BPG nos eritrócitos permite que o oxigênio permaneça mais tempo nos tecidos, mantendo a oxigenação celular normalizada (GIBB, 2002; MULQUINEY; KUCHEL, 1999; STORZ; MORIYAMA, 2008). O 2,3-BPG se conecta exatamente na cavidade central entre as cadeias beta das globinas, não permitindo que o oxigênio

se acople ao íon ferroso e, conseqüentemente, permanecendo mais tempo livre na célula, como evidenciado na Figura 10 (GIBB, 2002).

Figura 10 - Representação da ligação do 2,3-BPG na molécula de desoxi-hemoglobina.



Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

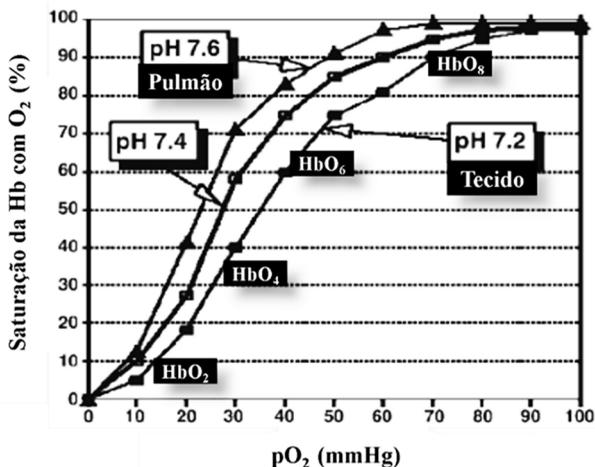
2.3.2 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Vários mecanismos alteram a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. O pH, em termos fisiológicos, possui um papel crucial nessa regulação. A modificação do potencial hidrogeniônico funciona da seguinte forma: a desoxi-Hb, ao liberar o seu oxigênio nos tecidos (pH 7,2), pode captar tanto o CO₂ como o H⁺ formado nos tecidos (pH 7,2). Uma parte do CO₂ se difunde para os eritrócitos e outra se liga diretamente ao grupo amino N-terminal da desoxi-hemoglobina (pH 7,2), formando a carbamino-hemoglobina que é transportado até os pulmões (pH 7,6). O íon hidrogênio gerado é captado pela desoxi-Hb nos tecidos (pH 7,2), que descarrega esse próton nos pulmões (pH 7,6), onde ocorre a hematose (BOHR; HASSELBALCH; KROGH, 1904; JENSEN; STORZ; FAGO, 2016; KLOTZ, 2003; OKONJO, 2015; PERUTZ, 1979 e 1990).

Nos pulmões, o aumento do pH (7,6) facilita a oxigenação, resultando no deslocamento do equilíbrio da curva sigmóide para a esquerda. Nos tecidos, por outro lado, a redução do pH para 7,2 provoca uma diminuição da afinidade da hemoglobina ao O₂, desviando o equilíbrio da curva de saturação para a direita, como indicado na

Figura 11 (BUCCI, 2009; DASH; BASSINGTHWAIGHTE, 2006; JENSEN; STORZ; FAGO, 2016; OKONJO, 2015).

Figura 11 - Curva de dissociação do oxigênio com a hemoglobina humana adulta, demonstrando as alterações de pH.



Fonte: Adaptado de Leow (2007).

2.4 CONSEQUÊNCIAS DA BAIXA OXIGENAÇÃO CELULAR CAUSADA PELA DIMINUIÇÃO DO APORTE DE HEMOGLOBINA SANGUÍNEA

A maioria dos seres vivos necessita de oxigênio para sua sobrevivência e as trocas gasosas realizadas nos alvéolos pulmonares são extremamente importantes para a manutenção da homeostase. Um exemplo da necessidade de um grande aporte de oxigênio é o alto consumo pelo cérebro. O transporte de oxigênio inadequado ou deficiente pode acarretar danos irreversíveis para o cérebro e gerar uma série de doenças. A ausência ou escassez de oxigênio nas células pode ser causada por vários fatores (ALAYASH, 2014; BLAU; STAMATOYANNOPOULOS, 1994; BUCCI, 2009; BUNN; FORGET, 1986; HIGGS; ENEGEL; STAMATOYANNOPOULOS, 2012; OKONJO, 2015; STORZ; MORIYAMA, 2008; WALTEMATH, 1970):

1) isquemia: obstrução causada por um trombo que restringe a passagem do sangue para o tecido orgânico, tornando o suprimento de oxigênio para as células prejudicado, acarretando,

com isso, isquemia por falta de glicose e de oxigenação causando hipóxia;

2) hipóxia: falta de oxigenação celular;

3) doenças cardiovasculares: diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio devido à oclusão do vaso sanguíneo, contribuindo para diminuição da quantidade de oxigênio aos tecidos;

4) hemoglobinopatias hereditárias: doenças causadas por mutações genéticas associadas à síntese da proteína hemoglobina diminuindo a oxigenação;

5) anemia: uma síndrome na qual a hemoglobina encontra-se abaixo do valor normal de referência devido à redução de eritrócitos, diminuindo a capacidade do sangue de transportar oxigênio para os tecidos;

6) hemorragia ou sangramento: a lesão no sistema circulatório ocasiona uma diminuição do aporte sanguíneo, acarretando em anemia e baixa oxigenação;

7) excesso de altitude: a insuficiência de oxigênio inspirado faz com que aumente a produção de 2,3-bisfosfoglicerato nos eritrócitos para manter a oxigenação celular normalizada;

8) envenenamento por monóxido de carbono: o monóxido de carbono impossibilita a ligação do oxigênio por se ligar irreversivelmente à hemoglobina, diminuindo a oxigenação.

2.5 MODELO MATEMÁTICO PARA REAÇÃO ENTRE HEMOGLOBINA E OXIGÊNIO

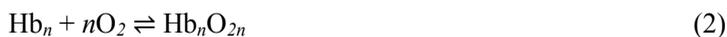
A modelagem matemática para predição da dinâmica da reação entre a hemoglobina e o oxigênio é importantíssima, pois, a partir dela, falhas no processo poderiam ser identificadas ou o seu rendimento poderia ser aumentado. Além disso, o conhecimento da cinética dessa reação é essencial para o tratamento de diversas doenças (ALAYASH, 2014; GIBSON, 2004; HIGGS; ENEGEL; STAMATOYANNOPOULOS, 2012; OKONJO, 2015).

Archibald Vivian Hill foi o primeiro a propor uma equação para descrição da velocidade da reação entre hemoglobina e o oxigênio, embora não tenha quantificado os sítios ativos dessa proteína (HILL, 1910). Por razões experimentais, Hill adaptou sua equação para o caso da hemoglobina para expressá-la em termos de pressão parcial de oxigênio (p_{O_2}), conforme pode ser observado na Equação (1):

$$Y = \frac{(p_{O_2})^n}{(p_{O_2}^{50})^n + (p_{O_2})^n} \quad (1)$$

onde Y corresponde à fração de hemoglobina que está ligada ao oxigênio, $p_{O_2}^{50}$ consiste na pressão parcial de oxigênio que resulta em uma saturação de 50%, n é o coeficiente de Hill, que está associado ao grau de cooperatividade entre substrato e ligante. Hill, em seu artigo de 1910, apresenta o resultado de $n = 1$, em que o n pode estar relacionado ao parâmetro não integral de cooperatividade entre os sítios de ligações na interação ou ao número de subunidades de cada heme da hemoglobina. Segundo Hill (1910), a grandeza n fornece uma caracterização da cooperatividade onde, quando a afinidade está aumentada, descreve uma ligação de cooperatividade positiva ($n > 1$), e quando está diminuída, indica uma reação com cooperatividade negativa ($n < 1$) (HILL, 1910; VOET; VOET; PRATT, 2014; WALTEMATH, 1970).

A hemoglobina humana desoxigenada (Hb_n) é capaz de unir-se ao oxigênio molecular (O_2) em quatro etapas cooperativas e consecutivas até que seus sítios estejam completamente ocupados, dando origem à hemoglobina totalmente oxigenada. Porém, Hill (1910) descreve que a ligação do oxigênio à hemoglobina ocorre em uma única etapa, em que a hemoglobina liga n moléculas de oxigênio, conforme representado na Equação (2) (HILL, 1910; GIBSON, 2004; LEOW, 2007; VOET; VOET; PRATT, 2014):



Ferreira e colaboradores, em seu texto original, abordam que:

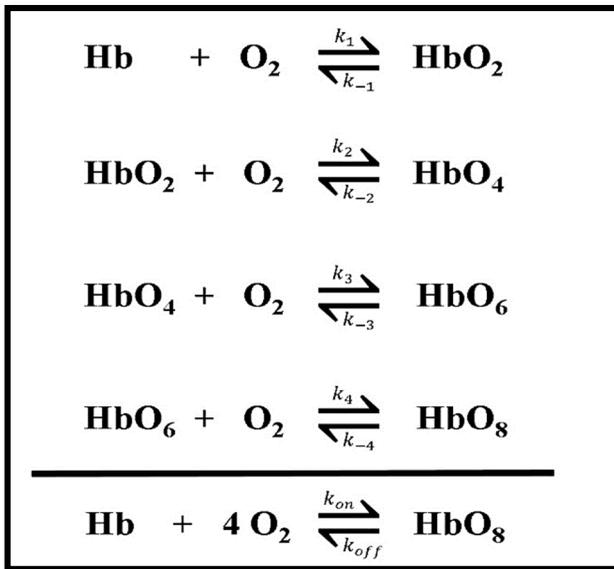
“A equação de Hill pode ser usada como uma aproximação empírica, mas há situações em que seus parâmetros possuem uma interpretação fenomenológica. Em bioquímica, por exemplo, o valor do coeficiente de Hill indica o tipo de cooperação existente entre os ligantes em uma macromolécula.” (FERREIRA; TRINCA; FERREIRA, 2014).

Posteriormente, Adair (1925) investigou que os grupos heme da molécula de Hb reagem sequencialmente com quatro moléculas de oxigênio e identificaram os quatro sítios ativos da proteína.

Os pesquisadores Max Perutz e John Cowdery Kendrew da Universidade de Cambridge, em 1959, caracterizaram a proteína hemoglobina por meio de difração de raios X, apresentando uma massa molecular de 64.458 Dalton (64 kDa) (NAPOLITANO, 2009; PERUTZ, 1960)

Segundo Waltemath (1970), uma série de compostos intermediários são formados com a associação da hemoglobina e o oxigênio, conforme visualizado na Figura 12.

Figura 12 - Etapas consecutivas e reversíveis da reação entre a hemoglobina e o oxigênio, que ocorre no organismo.

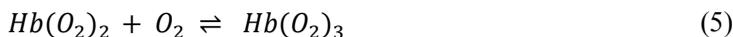


Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

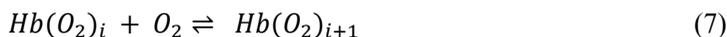
Gibson (1970) foi o pioneiro em propor um mecanismo de reação que ocorre no organismo entre a hemoglobina humana e o oxigênio, caracterizada por quatro etapas consecutivas e reversíveis. As quatro etapas da reação estão expostas na Figura 12, onde as constantes de associação ou de ligação do oxigênio com a hemoglobina aparecem representadas por k_1 , k_2 , k_3 e k_4 e as constantes de dissociação ou de liberação por k_{-4} , k_{-3} , k_{-2} , k_{-1} . A reação global é apresentada ao final das quatro etapas, indicando a constante global de ligação ou associação representada por k_{on} , e a de liberação ou dissociação denominada k_{off} .

Em 1977, Sawicki, juntamente com Gibson, relataram que a velocidade da reação ocorre rapidamente no início, diminuindo sua velocidade ao longo do tempo.

A fim de facilitar as próximas discussões, empregou-se uma notação diferenciada que será referenciada dessa forma para os resultados, demonstrada nas Equações (3) a (6), para os compostos envolvidos na reação de oxigenação e desoxigenação:



Generalizando as Equações (3) a (6), pode se escrever a Equação (7), cujo coeficiente “*i*” varia de 0 a 3:



O modelo matemático obtido a partir do balanço de massa que descreve a dinâmica de cada um dos compostos envolvidos na reação está expresso pelo conjunto das Equações (8) a (12):

$$\frac{d C_{Hb(O_2)_0}}{dt} = -k_1 C_{Hb(O_2)_0} C_{O_2} + k_{-1} C_{Hb(O_2)_1} \quad (8)$$

$$\frac{d C_{Hb(O_2)_1}}{dt} = -k_2 C_{Hb(O_2)_1} C_{O_2} + k_{-2} C_{Hb(O_2)_2} + k_1 C_{Hb(O_2)_0} C_{O_2} - k_{-1} C_{Hb(O_2)_1} \quad (9)$$

$$\frac{d C_{Hb(O_2)_2}}{dt} = -k_3 C_{Hb(O_2)_2} C_{O_2} + k_{-3} C_{Hb(O_2)_3} + k_2 C_{Hb(O_2)_1} C_{O_2} - k_{-2} C_{Hb(O_2)_2} \quad (10)$$

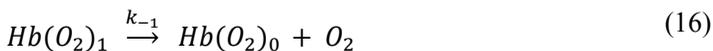
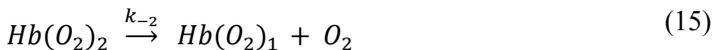
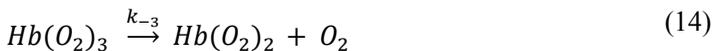
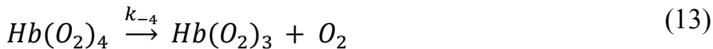
$$\frac{d C_{Hb(O_2)_3}}{dt} = -k_4 C_{Hb(O_2)_3} C_{O_2} + k_{-4} C_{Hb(O_2)_4} + k_3 C_{Hb(O_2)_2} C_{O_2} - k_{-3} C_{Hb(O_2)_3} \quad (11)$$

$$\frac{d C_{Hb(O_2)_4}}{dt} = +k_4 C_{Hb(O_2)_3} C_{O_2} - k_{-4} C_{Hb(O_2)_4} \quad (12)$$

O valor das constantes cinéticas do modelo matemático obtido a partir do balanço de massa apresentado é de difícil obtenção, em função da velocidade de reação que ocorre em intervalos de tempo na ordem de milissegundos (ms) (GIBSON, 1970). O único pesquisador que calculou os valores das oito constantes cinéticas foi Gibson (1970), obtendo os seguintes resultados experimentais: $k_1 = 17,7 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_2 = 33,2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_3 = 4,89 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_4 = 33,0 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{-1} = 1900 \text{ s}^{-1}$; $k_{-2} = 158,0 \text{ s}^{-1}$; $k_{-3} = 539,0 \text{ s}^{-1}$ e $k_{-4} = 50,0 \text{ s}^{-1}$ (GIBSON, 1970). A metodologia utilizada por Gibson para a determinação das constantes cinéticas de hemoglobinas humanas foi a de mistura rápida com fluxo interrompido, onde foram mantidos constantes o pH 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) e a temperatura de 21,5 °C.

A reprodução experimental da reação que ocorre no corpo humano é um grande desafio. A fim de facilitar a pesquisa experimental dessa reação, geralmente se estudam os processos de oxigenação e desoxigenação separadamente. Para a desoxigenação, que é o objetivo do presente trabalho, é usual a utilização do agente redutor ditionito de sódio, também conhecido como hidrossulfito de sódio.

O ditionito de sódio é um reagente muito versátil e potente redutor frequentemente utilizado por exibir uma capacidade de remover completamente o oxigênio de heme proteínas e aparentemente não afetar sua estrutura (JORGE *et al.*, 2012; LAMBETH; PALMERS, 1973; WIREKO; ABRAHAM, 1992). A reação com a utilização do agente redutor ditionito de sódio é irreversível por um certo intervalo de tempo, o que a diferencia biologicamente quanto ao seu mecanismo de ação (JORGE *et al.*, 2012). Sendo assim, as equações cinéticas determinadas pelo ditionito de sódio passam a ser descritas conforme demonstrado nas Equações (13) a (16):



O modelo matemático obtido a partir do balanço de massa que descreve a dinâmica dos compostos proteicos envolvidos na reação de desoxigenação da oxí-hemoglobina com o ditionito de sódio está apresentado no conjunto das Equações (17) a (21):

$$\frac{d C_{Hb(O_2)_4}}{dt} = -k_{-4} C_{Hb(O_2)_4} \quad (17)$$

$$\frac{d C_{Hb(O_2)_3}}{dt} = -k_{-3} C_{Hb(O_2)_3} + k_{-4} C_{Hb(O_2)_4} \quad (18)$$

$$\frac{d C_{Hb(O_2)_2}}{dt} = -k_{-2} C_{Hb(O_2)_2} + k_{-3} C_{Hb(O_2)_3} \quad (19)$$

$$\frac{d C_{Hb(O_2)_1}}{dt} = -k_{-1} C_{Hb(O_2)_1} + k_{-2} C_{Hb(O_2)_2} \quad (20)$$

$$\frac{d C_{Hb(O_2)_0}}{dt} = +k_{-1} C_{Hb(O_2)_1} \quad (21)$$

Na literatura, o modelo de pseudo primeira ordem é amplamente utilizado para descrever a dinâmica de desoxigenação da oxí-hemoglobina. Esse modelo é obtido a partir de uma simplificação do mecanismo da reação apresentado nas Equações (13) a (16), concluindo-se em uma única etapa, como pode ser visualizado na Equação (22).



O modelo matemático que descreve a dinâmica dos compostos envolvidos na reação, obtido a partir do balanço de massa, é dado pelas Equações (23) e (24):

$$\frac{d C_{Hb(O_2)_4}}{dt} = -k_{off} C_{Hb(O_2)_4} \quad (23)$$

$$\frac{d C_{Hb}}{dt} = k_{off} C_{Hb(O_2)_4} \quad (24)$$

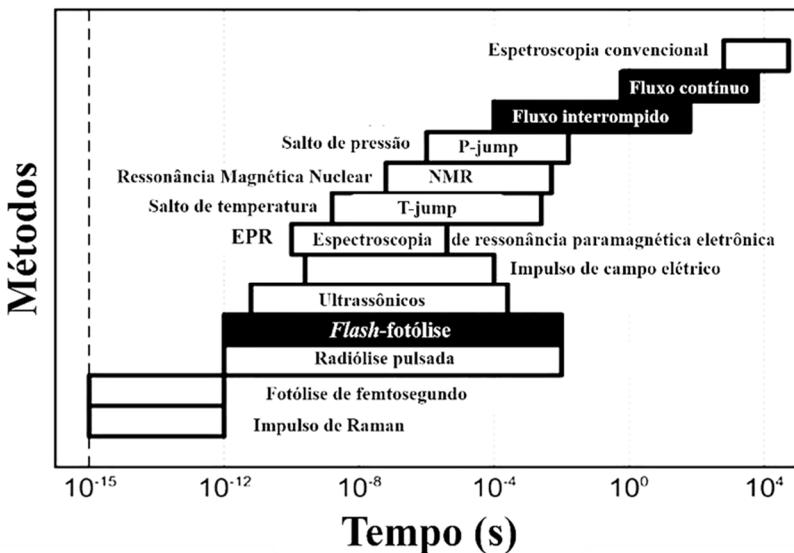
A Equação (25) apresenta a solução analítica da Equação (23), a partir da qual é possível prever o comportamento da concentração da oxihemoglobina na reação de desoxigenação.

$$C_{Hb(O_2)_4} = C_{Hb(O_2)_4}^0 \cdot e^{-k_{off} \cdot t} \quad (25)$$

2.6 MÉTODOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS PARA A ANÁLISE DE DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA

Existe uma ampla gama de técnicas experimentais especializadas para a mensuração de cinéticas rápidas, sendo que cada método possui um benefício dentro de sua limitação. Essas variadas técnicas se diferenciam por sua escala de tempo, de acordo com a Figura 13 (BRINDELL *et al.*, 2008).

Figura 13 - A escala de tempo de várias técnicas cinéticas.



Fonte: Adaptado de Brindell *et al.* (2008).

Por ser uma reação que ocorre rapidamente, a desoxigenação da oxihemoglobina é de difícil verificação experimental. Existem dois tipos de métodos experimentais para a determinação de reações químicas que

possuem meias-vidas muito curtas: os métodos de fluxo e os métodos de pulso. Os métodos comumente adequados para a análise de heme proteínas são o método de mistura rápida com fluxo contínuo, o método de mistura rápida com fluxo interrompido e o método de fotólise por pulso de laser (*flash*-fotólise) que serão abordados detalhadamente a seguir.

2.6.1 Método de mistura rápida com fluxo contínuo

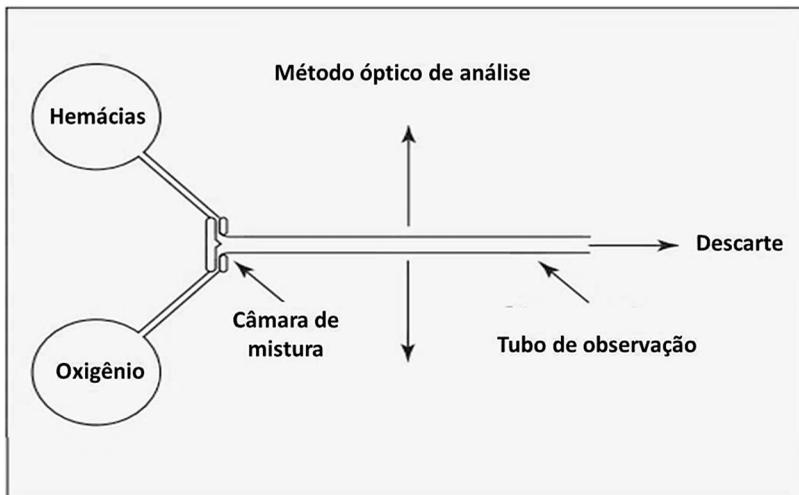
Hartridge e Roughton, em 1923, desenvolveram um equipamento de mistura rápida com fluxo contínuo para o estudo de reações enzimáticas que ocorrem rapidamente, tal como a reação entre a hemoglobina e o oxigênio.

Adair (1925), que foi um dos pioneiros a desvendar os sítios de ligação da hemoglobina, também utilizou em seus experimentos o método de fluxo contínuo.

Nesse método, denominado de fluxo contínuo, o equipamento era composto por dois tubos para colocar os reagentes e injetados de forma tangencial sob determinada pressão para um misturador dentro de uma câmara de mistura. Os reagentes, após injetados para uma câmara de mistura sob uma determinada pressão, seguiam com fluxo contínuo até um tubo de observação. A mistura homogênea, composta por oxi-hemoglobina juntamente com o ditionito de sódio, era analisada em diferentes pontos do tubo de observação por espectrofotometria com capacidade de detectar a reação em alta velocidade (KHORASSANI *et al.*, 2011). Conforme demonstrado na Figura 14, a velocidade do fluxo era constante e cada medida de distância correspondia a um intervalo de tempo após a mistura, necessitando de um grande período para ser avaliada, tornando tal técnica pouco viável para reações muito rápidas. Além disso, o tempo morto empregado nesse método de fluxo contínuo era relativamente grande e também necessitava da utilização de grandes quantidades de reagentes para a análise de cada experimento.

Esse método de fluxo contínuo foi originalmente modificado por Chance (1940), que introduziu pela primeira vez o sistema de mistura rápida com multijatos para acelerar o fluxo. Nesse mesmo período, Chance iniciou a construção da sua terceira versão para o equipamento, por verificar que o fluxo turbulento causava cavitação (bolhas) durante o preenchimento da câmara de observação (microcubeta) e esse problema estava causando interferência no resultado final. Por esse motivo, o fluxo contínuo foi aprimorado para o fluxo interrompido (KHORASSANI *et al.*, 2011).

Figura 14 - Representação do método de mistura rápida com fluxo contínuo. O oxigênio e as hemácias eram injetados sob uma vazão volumétrica constante em dois tubos ligados a uma câmara de mistura que está conectada ao tubo de observação. A análise óptica dessa mistura era realizada em determinados pontos ao longo do comprimento do tubo e convertida em intervalos de tempo.



Fonte: Adaptado de Souza (2016).

2.6.2 Método de mistura rápida com fluxo interrompido

Chance, em 1940, inventou o método de fluxo interrompido com o principal objetivo de economizar reagentes, reduzir o tempo morto e obter uma mistura mais homogênea sem formação de bolhas, lançando uma nova versão do equipamento de mistura rápida que foi denominado de *Stopped Flow* (CHANCE, 1940). Com esse processo, a quantidade de reagente utilizada foi reduzida drasticamente para a ordem de microlitros e foi introduzida a seringa de frenagem ou de parada após a câmara de mistura do equipamento (KHORASSANI *et al.*, 2011).

Gibson (1954) utilizou um equipamento similar ao de Chance, o qual era composto por duas seringas acionadas por pressão manual para uma câmara de mistura e, logo em seguida, para um tubo de observação.

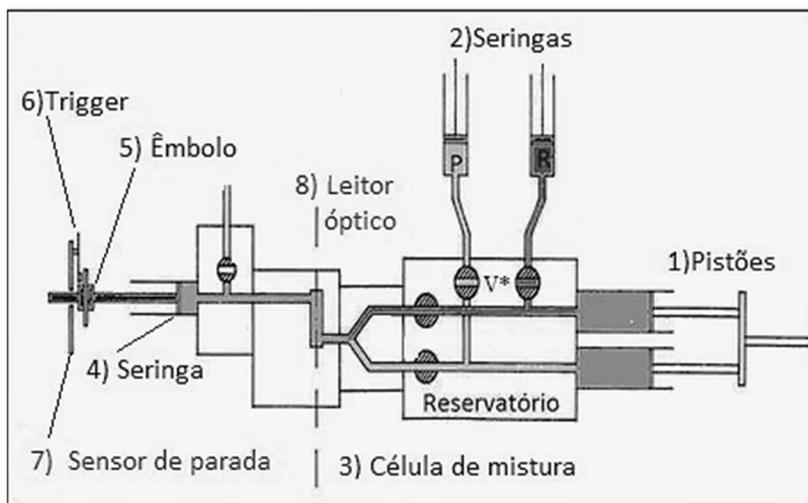
Stewart e Ouellet (1959) obtiveram seus resultados de mistura rápida com a adaptação de um espectrofotômetro de Beckman ao equipamento de fluxo interrompido, o qual possuía seringas removíveis para a mistura dos reagentes, temperatura controlada para reação e um

gravador sincronizado para registrar todas as etapas da reação após a interrupção do fluxo.

Gibson e Milnes (1964) continuaram a aperfeiçoar essa metodologia de mistura rápida, permitindo inovações para o estudo de reações rápidas até então desconhecidas, onde as soluções eram velozmente misturadas e levadas a uma câmara de mistura até sua posterior parada por uma seringa de frenagem para detecção da absorbância em função do tempo. Vale a pena ressaltar que Gibson (1970) foi o único pesquisador que calculou as constantes cinéticas da reação entre a hemoglobina e o oxigênio.

Grande parte desse progresso foi explorado e usado por vários outros pesquisadores. Chance (1994) inventou um instrumento moderno denominado de monocromador que era adaptado ao equipamento para garantir máxima eficiência no ajuste do comprimento de onda (CHANCE, 2004).

Figura 15 - Funcionamento do método de mistura rápida com fluxo interrompido.



Fonte: Adaptado de Harvey e Borchardt (1972).

Nesse método de mistura rápida com fluxo interrompido, as soluções são colocadas em reservatórios e injetadas rapidamente (milissegundos) para uma câmara de mistura. Em seguida, essa mistura é transportada para uma célula de observação espectrofotométrica, onde

após o preenchimento completo da seringa de frenagem o fluxo é interrompido ativando o gatilho (*trigger*) para dar início imediato a aquisição dos dados de absorbância em função do tempo. De acordo com a Figura 15, o funcionamento do equipamento ocorre quando os pistões (1) introduzem os reagentes presentes nas seringas (2) para dentro dos reservatórios, local onde são misturados rapidamente na célula de mistura (3). Logo após, segue para célula de observação espectrofotométrica (8), preenchendo a seringa de frenagem (4). O movimento do êmbolo (5) dessa seringa de frenagem ativa o sensor de parada (7), acionando o *trigger* (6) para ativar o início da aquisição de dados.

O método de mistura rápida com fluxo interrompido, chamado *Stopped Flow*, surgiu da necessidade de analisar o comportamento de reações extremamente rápidas em solução líquida ao longo de um curto espaço de tempo (BATISTELA *et al.*, 2006). Esse método permite monitorar as etapas iniciais da reação e avaliar todo o processo em que ela ocorre (milissegundos = 10^{-3} s). Uma vantagem importante desse método com fluxo interrompido é a economia de reagentes, pois permite utilizar quantidades na ordem de microlitros (μL) para análise da reação e também pode monitorar cinéticas de sistemas químicos e biológicos por absorbância ou fluorescência (FRESKGDARD; BERGENHEM; CARLSSON, 1992). Essa técnica de fluxo interrompido pode ser aplicada como ferramenta para uma ampla gama de pesquisa, como os processos de ligação de drogas, estudo de reações enzimáticas, investigação da transferência de elétrons em reações químicas, determinação da estrutura de proteínas e interações proteína-proteína. Por ser difícil estudar na prática reações que atinjam o equilíbrio em milésimos de segundos, faz-se necessário o auxílio de equipamentos especializados para misturar rapidamente os reagentes com fidedigna reprodutibilidade (BATISTELA *et al.*, 2006; KHORASSANI *et al.*, 2011, PEINTLER *et al.*, 2000).

No mercado existem vários fabricantes que comercializam equipamentos apropriados para esta finalidade. A diferença definida entre cada equipamento se resume na eficiência do menor tempo morto (*dead time*) que cada um permite obter, pois enquanto menor for esse tempo morto mais relevante o experimento se aproxima da escala de tempo biológica. O equipamento *SX 20 Stopped Flow Spectrometer*, fabricado pela empresa *Applied Photophysics Limited*, permite obter um tempo morto mínimo de 0,5 ms, já o *SX 17MV-S2* e o *SX 18 MV-R Stopped Flow Spectrofluorimeter* do fabricante *Artisan Technology Group*, podem comportar um tempo morto de 0,5 a 1,0 ms. O equipamento SF-61SX2, da empresa *Hi-Tech Scientific Ltda*, suporta utilizar um tempo morto de 2 ms, enquanto que o da *Bio-Logic Science Instruments (Stopped Flow*

Mixer 4000/S) normalmente pode alcançar um tempo morto também de 2 ms, porém o equipamento possibilita a utilização de um sistema de microcubeta, fazendo com que esse tempo diminua drasticamente, podendo chegar até 0,25 ms (BATISTELA *et al.*, 2006; BENAMOR *et al.*, 2016; CLARKE; KHALID, 2015). Exemplos de diversos tipos de equipamentos, suas vantagens e desvantagens têm sido relatados por Sema *et al.* (2012). A maioria dos equipamentos atuais existentes no mercado possui um tempo morto de no máximo 2 ms. Por esse motivo, o *SFM 4000/S* foi o equipamento de primeira escolha para a realização desse trabalho, pois permite reduzir o período do tempo morto para cerca de 0,25 ms quando equipado com seringas pressurizadas e com microcubeta especializadas (BATISTELA *et al.*, 2006; CLARKE; KHALID, 2015).

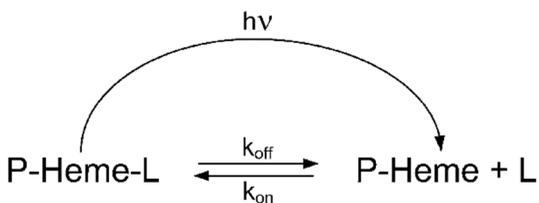
O equipamento de fluxo interrompido (*Stopped Flow*) pode estar associado à uma grande variedade de técnicas de detecção, sendo frequentemente utilizado para estudar a cinética rápida em pesquisas que necessitam ser realizadas em condições anaeróbias. É relevante destacar sua importância no processo de mistura em um curto período de tempo, assegurando a reprodutibilidade do experimento entre a sincronização no controle da mistura e a aquisição dos dados (GRILLO, 2009). Para realizar essa técnica de mistura rápida com fluxo interrompido são necessários dois componentes básicos denominados de injetores e misturadores. Porém, os misturadores não se restringem apenas ao processo de mistura, uma vez que neles podem ocorrer reações químicas, lhes atribuindo o caráter de reator.

2.6.3 Método de fotólise por pulso de laser (mistura rápida por *flash*-fotólise)

O método de mistura rápida por *flash*-fotólise, denominado de fotólise por pulso de laser (*laser flash-photolysis*), tem sido usado para a pesquisa da desoxigenação e oxigenação da molécula de hemoglobina. Esse método possibilita mensurar grandes quantidades de intermediários da reação, especialmente em experimentos de heme proteínas, sem afetar a sua estrutura molecular. Além de servir para monitorar as etapas iniciais da reação, o ensaio experimental permite uma análise na escala de tempo de microssegundo (1 picosegundo = 10^{-12} s) à milissegundo (10^{-12} s a 10^{-3} s), podendo ser aplicável a gases, líquidos e sólidos em moléculas de qualquer geometria e tamanho (BRINDELL *et al.*, 2008; LEPESHKEVICH *et al.*, 2016; ROSELL; MAUK, 2011).

George Porter e Ronald D. W. Norrish (1949) foram os pioneiros a descobrir a técnica de fotólise por pulso de laser com a intenção de estudar cinéticas rápidas. A fotólise baseia-se na decomposição ou dissociação de compostos químicos que são detectados espectroscopicamente por meio do feixe de luz ou pela radiação ultravioleta que atravessa o eixo do tubo fotomultiplicador. A luz permite que as moléculas da amostra analisada (P-Heme-L) se dissociem, originando os radicais intermediários livres (L), conforme representado na Figura 16. O sinal obtido por espectroscopia é avaliado aplicando a lei de Lambert-Beer, sendo ferramenta extremamente útil para a pesquisa de cinéticas muito rápidas (BRINDELL *et al.*, 2008).

Figura 16 - Representação da cinética das reações entre hemoproteínas e pequenos ligantes para a aplicação de fotólise por pulso de laser, onde P-heme-L indica a hemoproteína e L representa o ligante oxigênio (O₂).

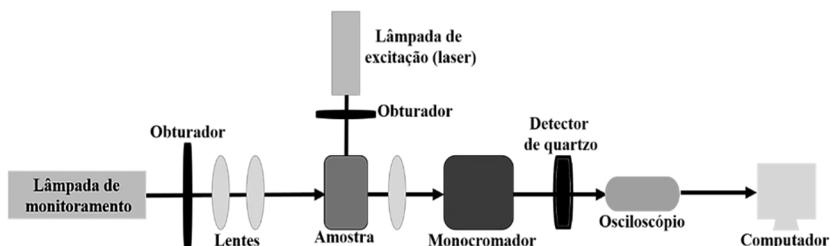


Fonte: Adaptado de Brindell *et al.* (2008).

No final dos anos de 1960, Gibson, apoiado por George Porter, construiu o seu primeiro equipamento de laser (*flowflash*) no seu laboratório em Harvard onde, a partir dessa técnica, descobriu a bioluminescência bacteriana (GIBSON; HASTINGS; GREENWOOD, 1965). Logo após, juntamente com Sawicki (1977), obteve avanços em sua pesquisa com a oxi-hemoglobina por meio de fotólise por pulso de laser.

O equipamento para esse tipo de análise é constituído por um detector de quartzo ou tubo fotomultiplicador, lentes adequadas para a passagem de luz, uma lâmpada de excitação apropriada para a produção de um flash intenso de laser, um monocromador, um osciloscópio e um computador acoplado para registrar os dados, de acordo com a Figura 17 demonstrada abaixo.

Figura 17 - Ilustração do esquema de funcionamento do equipamento de fotólise por pulso de laser.



Fonte: Adaptado de Yang *et al.* (2007).

O equipamento utilizado para essa finalidade por Lepeshkevich e colaboradores (2016) foi o LS-2132U, da LOTIS TII. A família de LOTIS TII Q-switched Nd-YAG inclui dispositivos com diferentes tipos de energia de pulso de saída, permitindo uma duração de 5 a 24 nanossegundos. Os modelos da LOTIS TII mais recentes disponíveis no mercado são os LS-2134TF e LS-2145TF, que se caracterizam por ser uma série de lasers compactos.

2.7 MÉTODOS DE OTIMIZAÇÃO

A otimização faz parte do nosso cotidiano pelo fato que direta ou indiretamente sempre estima-se procurar pontos máximos ou mínimos de problemas. As ferramentas utilizadas para a otimização estão inseridas no campo da matemática permitindo sua aplicação em diversos problemas práticos relacionados à Engenharia e também em outras áreas como Informática, Medicina, Administração, Farmácia, sendo de grande interesse para diversas aplicações industriais.

No contexto de otimização, os problemas são tratados dentro das seguintes definições (RAO, 2009):

- a) função objetivo:** é a função matemática que determina o ponto máximo ou mínimo do problema que se deseja analisar;
- b) variáveis de decisão:** são as variáveis independentes que aparecem na função objetivo do problema em questão;
- c) restrições:** são os limites impostos ou estabelecidos pelas leis naturais ao problema que está sendo avaliado e podem sofrer alterações, dependendo da decisão que for escolhida para a solução do problema;

d) região de busca: ou região viável significa a região do espaço definido pelas variáveis de decisão. Nessa região também pode ser encontrado o ótimo da função objetivo.

2.7.1 Busca unidirecional

O método de otimização por busca unidirecional consiste em fazer uma busca partindo de um ponto em uma única direção a outro a fim de minimizar ou maximizar a função objetivo a partir desse ponto escolhido, obtendo uma solução ótima para resolver o problema em questão. Uma estratégia para definir uma busca unidimensional ou unidirecional seria admitir um conjunto de minimizadores e determinar a direção de busca, escolhendo o melhor sentido até encontrar um ponto em que não existe direção de busca que melhore o valor da função objetivo (ANJOS, 2016; IVORRAA; MOHAMMADIB; RAMOSA, 2015; RAO, 2009).

Para realizar a otimização pela busca unidirecional faz-se necessário primeiramente dar uma estimativa inicial, definindo o ponto de partida e, posteriormente, encontrar um sentido ou direção de pesquisa paralela aos eixos do ponto inicial x_0 (ponto de partida) até atingir um ponto de mínimo que pode ser local ou global x (resposta do problema). Juntamente, deve-se calcular o tamanho ou comprimento do passo, que pode ser variável ou fixo (PEI; ZHU, 2016; VIEIRA; LISBOA, 2014). Uma vez que foi dada a direção e foi determinado o comprimento do passo, os métodos que empregam a busca unidirecional geram uma sequência iterativa (x_k) que pode ser definida pela Equação (26):

$$x_{k+1} = x_k + \alpha_k d_k \quad (26)$$

onde $k = 0, 1, 2, \dots$, α_k denomina o tamanho do passo e d_k indica a direção.

Nesse ponto, pode-se saber a direção escolhida a fim de seguir longe o suficiente para que a função atinja o seu máximo ou o seu mínimo. A escolha da forma como será calculado o passo a cada iteração pode ser baseada em diferentes métodos apresentados na literatura (CUI; WU; QU, 2011; VIEIRA; LISBOA, 2014).

Essa técnica de busca unidirecional pode ser melhor explicada passo a passo de acordo com a literatura (RAO, 2009; VIEIRA; LISBOA, 2014):

- a) ponto de partida (x_k):** inicia o processo de tentativa do problema em questão;
- b) direção de pesquisa (d_k):** identifica o vetor no qual serão realizadas as alterações das variáveis;
- c) espaçamento de cada tentativa:** determina a variação que ocorrerá em toda a direção de pesquisa para cada tentativa, calculando o **tamanho do passo (α_k)**;
- d) critério de parada:** caracteriza o critério para aceitar uma determinada solução como o ótimo de uma função.

2.7.2 Algoritmo genético

Otimização é uma ferramenta matemática que permite descobrir quais valores devem ser escolhidos para atingir os pontos máximos ou mínimos dos problemas na forma de funções.

Os algoritmos genéticos (AGs) são um exemplo dos métodos iterativos de otimização que foram desenvolvidos com o intuito de encontrar mínimos globais de uma função. Essa técnica se baseia no princípio da seleção natural segundo a teoria de DARWIN (1859), onde os indivíduos de mesma espécie ou espécies diferentes têm uma maior probabilidade de sobreviver no ambiente no qual vivem quando adaptados. Essa característica desejável tende a se expandir, aumentando o grau de adaptação da espécie otimizada (DARWIN, 1859). A técnica de algoritmo genético (AG) é amplamente utilizada em diversas áreas e consiste em um método de otimização empregado como ferramenta para resolver distintos tipos de problemas complexos que possibilitam abordar dados numericamente determinados ou funções analíticas (ARORA, 2004; DAVIS, 1989; HAUPT e HAUPT, 1998; RAO, 2009).

A busca para a melhor solução dos problemas de otimização começa a partir de uma população inicial, onde os indivíduos mais adaptados desta população geram uma nova com diferentes cromossomos dos pais. As operações que conduzem uma geração para outra são determinadas por seleção, cruzamento e mutação, de forma que os cromossomos mais capazes produzem um maior número de descendentes (ARORA, 2004; HAUPT e HAUPT, 1998; KIRKPATRICK; GELATT; VECCHI, 1983; RAO, 2009). A função de avaliação dos cromossomos é chamada de função fitness (FO) ou função objetivo $f(x)$ que estima o desempenho do cromossomo com relação à resolução do problema proposto. Em cada nova geração, um conjunto de indivíduos mais eficientes é produzido com o valor mais elevado da função fitness, o qual é escolhido (função de seleção) para o processo de reprodução

(cruzamento e mutação) e criação de novos indivíduos. As características dos pais são propagadas para os filhos e repassadas por várias gerações, permitindo originar um grande número de combinações e possibilidades de evolução natural das espécies. O processo somente encerra quando o critério de convergência estiver satisfeito. Esse critério pode ser especificado pelo número máximo de gerações ou por algum parâmetro que avalie a diferença de duas gerações consecutivas (ARORA, 2004; HAUPT e HAUPT, 1998; RAO, 2009).

Holland foi o precursor, em 1975, a estudar algoritmo genético (AG) com intuito de pesquisar os fenômenos de adaptação que acontece na natureza e tentar transferir para o computador esse mecanismo de seleção natural (HOLLAND, 1975).

David Goldberg, em 1989, popularizou o método após publicar o livro “Algoritmos Genéticos em Pesquisa, Otimização e Aprendizado de Máquina” (GOLDBERG, 1989).

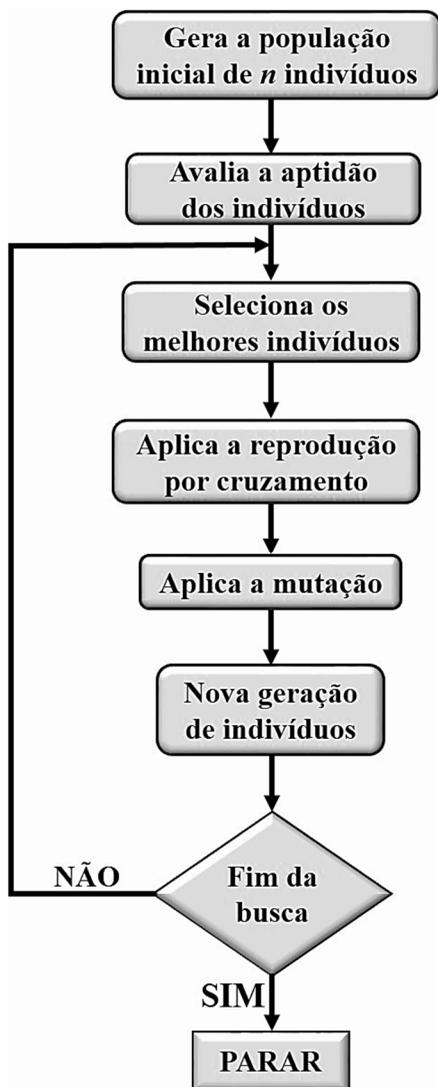
Holland, guiado pelo darwinismo, desenvolveu os procedimentos para o funcionamento dos AGs, que estão explicados abaixo pelos processos evolutivos divididos nas etapas de inicialização, avaliação, seleção, cruzamento, mutação, atualização e finalização e também de acordo com o fluxograma mostrado na Figura 18 (HOLLAND, 1975):

- a) inicialização:** gera a primeira população para submeter ao processo de evolução com várias respostas ao problema indicado;
- b) avaliação:** avalia a aptidão dos n indivíduos da população e analisa as soluções a fim de escolher a melhor resposta ao problema proposto;
- c) seleção:** seleciona os mais aptos ou melhores adaptados para a reprodução, sendo a probabilidade proporcional à aptidão;
- d) cruzamento (*crossover*):** recombina os alelos dos cromossomos, permitindo que sejam trocados para gerar novos indivíduos;
- e) mutação:** complementa o processo de reprodução e altera aleatoriamente as características dos indivíduos resultantes, modificando uma ou mais posições dos alelos no cromossomo;
- f) atualização:** inserem na população os indivíduos criados na etapa;
- g) finalização:** verifica o final da evolução das espécies e se todas as condições abordadas foram satisfeitas para encerrar a execução do programa. Em caso negativo, retorna para a etapa de avaliação.

O tamanho da população, a probabilidade de cruzamento e de mutação são parâmetros básicos necessários do algoritmo genético para

se obter a melhor otimização (ARORA, 2004; HAUPT e HAUPT, 1998; RAO, 2009).

Figura 18 - Fluxograma do funcionamento de um algoritmo genético (AG) tradicional.



Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

2.8 MÉTODOS DE OTIMIZAÇÃO HÍBRIDOS

Um dos principais motivos que levam a utilização de um método de otimização híbrido é por nem sempre ser possível minimizar funções de várias variáveis por meio de uma solução analítica e pela dificuldade de se obter uma solução ótima utilizando apenas uma técnica de otimização. Por isso, para os problemas mais complexos compostos por múltiplos parâmetros faz-se necessário ter em mãos um conjunto de ferramentas adquiridas por mais de um método para resolver o sistema avaliado, a fim de abranger uma combinação de fatores que proporcionem o melhor desempenho. À medida que aumentam os números de funções e de variáveis também cresce a dificuldade para determinar o conjunto de soluções ótimas inerentes ao problema que se deseja otimizar (ANJOS, 2016; EDGAR; HIMMELBLAU; LASDON, 2001; IZMAILOV, A.; SOLODOV, 2007).

Não existe um método único que somente ele próprio seja eficiente para ser aplicado em toda as soluções dos problemas analisados. Em cada caso particular devem ser avaliadas as características da função objetivo, o número de variáveis proposto pelo problema e o tipo de restrições a ser utilizado. Para formular e solucionar um problema de otimização, faz-se necessário analisar o processo e suas variáveis. Posteriormente, determina-se o critério que será utilizado para otimização e se faz a especificação da função objetivo. Por fim, aplica-se o método de otimização que pareça mais apropriado para a solução do problema em questão para que seja possível analisar a solução obtida e as considerações das variações dos parâmetros do modelo (RAO, 2009).

Neste contexto surge a necessidade de refinar o processo de otimização para resolver problemas de diversas áreas por um método de otimização híbrido onde é utilizada mais de uma técnica para resolução de um problema. Como o método de otimização híbrido fornece uma excelente alternativa para a manipulação de problemas com um grande número de variáveis, essa estratégia de utilizar métodos de otimização eficazes em conjunto gerou grande interesse da comunidade científica pela dificuldade de solucionar dados mais complexos (ANJOS, 2016; RAO, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização dos experimentos utilizou-se a meta-hemoglobina humana liofilizada, a qual foi submetida a uma purificação para redução à oxi-hemoglobina. Essa purificação foi realizada por cromatografia líquida de filtração em gel de exclusão (Sephadex G-25) seguido de diálise. Posteriormente, foi oxigenada com oxigênio gasoso medicinal 99,9% e quantificada pelo método de Drabkin. As formas heme-estruturais da Hb foram identificadas pelo espectro de absorção no comprimento de onda entre 390 nm e 650 nm. Por fim, a amostra de oxi-hemoglobina foi avaliada pelo método de mistura rápida com fluxo interrompido no equipamento *Stopped Flow Mixer 4000/S*.

3.1 MATERIAIS

O presente trabalho experimental foi desenvolvido com a utilização dos seguintes reagentes, equipamentos e utensílios descritos abaixo.

3.1.1 Reagentes

1. meta-hemoglobina humana do fabricante Sigma-Aldrich Brasil Ltda (H7379 liofilizada);
2. oxigênio gasoso medicinal 99,9% do fabricante Air Liquide Brasil;
3. Sephadex G-25 do fabricante Sigma-Aldrich Brasil Ltda;
4. membrana de diálise 30 kDa do fabricante Spectrum Laboratories;
5. kit de reagentes para hemoglobina do fabricante Labtest Diagnóstica S.A.;
6. ditionito de sódio ou hidrossulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) do fabricante Vetec;
7. tampão Hepes sódico-ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1 sal sódico ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$) do fabricante Vetec;
8. hidróxido de sódio perolado (NaOH) do fabricante Lafan;
9. álcool etílico 70° do fabricante Lafan;
10. água destilada

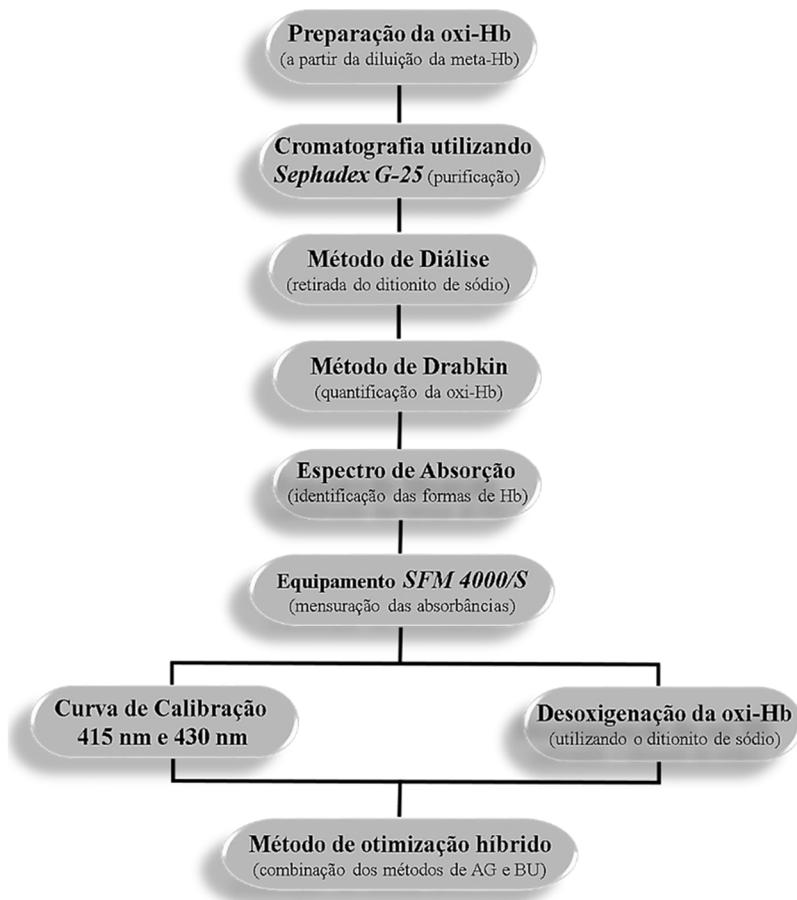
3.1.2 Equipamentos e utensílios

1. *Stopped Flow Mixer 4000/S (SFM 4000/S)* do fabricante Bio-Logic Science Instruments;
2. espectrofotômetro *SpectraMax Plus 384* do fabricante Molecular Devices;
3. pHmetro de bancada do fabricante Hanna;
4. balança analítica digital do fabricante Radwag;
5. agitador do fabricante Alfakit;
6. destilador de bancada do fabricante Alfakit;
7. coluna de cromatografia de vidro do fabricante Dist;
8. tubos Falcon de 15 mL e 50 mL;
9. descartpack;
10. micropipetas automáticas de volume variável do fabricante Kasvi;
11. ponteiros descartáveis;
12. seringas de plástico descartáveis de 10 mL;
13. espátula de metal;
14. bastão de vidro;
15. balão volumétrico de 5 mL; 10 mL; 250 mL e 500 mL do fabricante Uniglas;
16. béquer de 50 mL e 100 mL do fabricante Uniglas;
17. suporte com garra universal;
18. proveta de 50 mL; 100 mL; 250 mL e 1000 mL do fabricante Uniglas.

3.2 MÉTODOS

A sequência de procedimentos experimentais efetuados para obtenção da oxi-hemoglobina, todo o processo de desoxigenação e a otimização dos dados podem ser visualizados no fluxograma representado na Figura 19.

Figura 19 - Fluxograma de todas as metodologias utilizadas para a realização do procedimento experimental que será detalhado posteriormente na metodologia e no Apêndice A.



Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

3.2.1 Redução da meta-hemoglobina pelo método de cromatografia líquida por gel de exclusão molecular (SephadexG-25)

A preparação da meta-hemoglobina foi realizada de acordo com o fabricante e todo o procedimento experimental utilizado para sua diluição encontra-se detalhado no Apêndice A. Optou-se por utilizar a

meta-hemoglobina humana por apresentar praticamente nenhum risco de contaminação e maior durabilidade. Também é importante mencionar que, por ser um composto natural e liofilizado, pode ser facilmente armazenado e transformado em hemoglobina humana oxigenada. A purificação foi avaliada pela confirmação dos picos da oxi-hemoglobina no espectro de absorção segundo a literatura (BARATA-SILVA *et al.*, 2015).

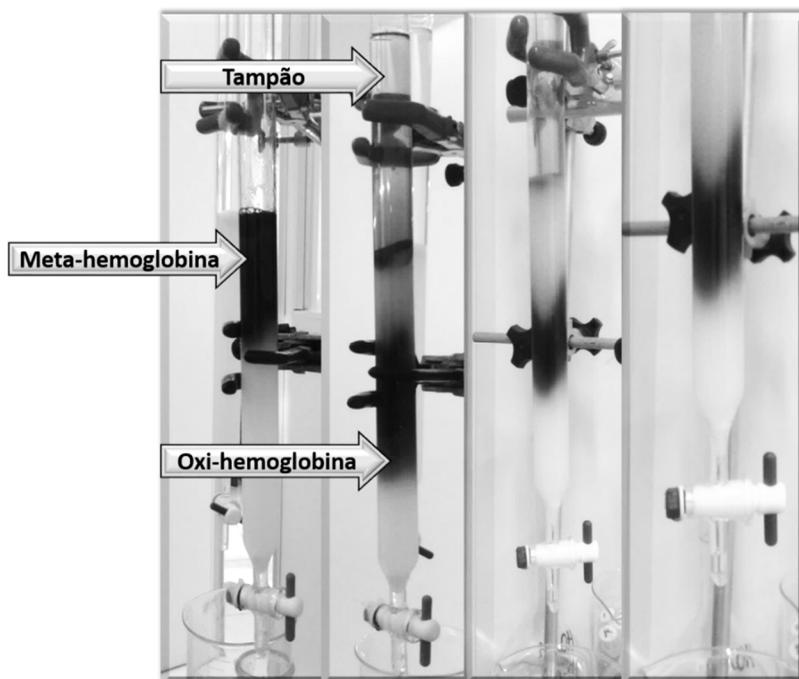
O método de cromatografia líquida por gel de exclusão molecular (Sephadex G-25) é um importante método para realização da purificação e análise de macromoléculas, tornando possível a remoção de fosfatos e outros contaminantes, sendo recomendado para separação de proteínas globulares (DIXON, 1985; WEBER *et al.*, 2013). O funcionamento dessa cromatografia tem como base a purificação da amostra por meio da separação de seus componentes, onde as moléculas de maior massa molecular tendem a migrar mais rapidamente que as de menor massa molecular, sendo eluídas primeiramente. As moléculas menores levam mais tempo para percorrer o mesmo caminho porque penetram no interior dos poros da resina, sendo eluídas por último na coluna (DIXON; MCINTOSH, 1967; DIXON, 1985; WEBER *et al.*, 2013).

A redução da meta-hemoglobina e sua posterior purificação para hemoglobina oxigenada foi realizada em uma coluna cromatográfica de vidro com 2 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento, local onde a resina Sephadex G-25, suspensa em água destilada, foi colocada até atingir 20 cm de altura para sua total compactação, conforme padronizado pelo fabricante. A Sephadex G-25 é formada por poros constituídos de um composto insolúvel altamente hidratado, onde as moléculas de baixa massa molecular ficam aderidas aos poros e as de alta massa molecular atravessam o gel de exclusão molecular (CHENG *et al.*, 2001; WEBER *et al.*, 2013).

O tampão Hepes 50 mM em pH 7,4 (Hepes sódico-ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1 sal sódico) foi utilizado como eluente ao longo de todo o processo para equilibrar o pH da resina Sephadex G-25. Primeiramente, no topo da coluna foi aplicado 2 mL do tampão contendo 200 mg de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) com a finalidade de ficar aderido nos poros da resina, uma vez que o mesmo atuará como agente redutor, sendo eliminado no final do processo. Logo em seguida, acrescentou-se a solução de meta-Hb (200 mg) que foi diluída em 10 mL de água destilada para entrar em contato com o agente redutor e ser eluída. Devido ao tratamento com o ditionito de sódio, a meta-Hb, de cor castanho, se transforma em oxi-Hb, de cor vermelho vivo, como pode ser visualizada na Figura 20 (CHENG *et al.*, 2001; TSURUGA *et al.*, 1998;

WEBER, 1992; WEBER *et al.*, 2013). A fração de oxi-Hb foi coletada e posteriormente oxigenada com oxigênio gasoso medicinal 99,9%, desprezando-se o início e o final da solução para se obter uma fração livre de contaminantes, principalmente de fosfatos. Depois desse procedimento, toda a solução foi colocada em uma membrana de diálise com tamanho inferior a 64 kDa a fim de determinar sua concentração. Por fim, a coluna foi lavada com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,2 M) e armazenada com água destilada para evitar que a resina secasse (DIXON, 1985; WEBER, 1992; WEBER *et al.*, 2013). Todo o procedimento foi realizado no Laboratório de Neuroengenharia Computacional (Neurolab/UFSC).

Figura 20 - Cromatografia líquida de filtração em gel de exclusão molecular realizada na coluna cromatográfica composta pela resina Sephadex G-25.



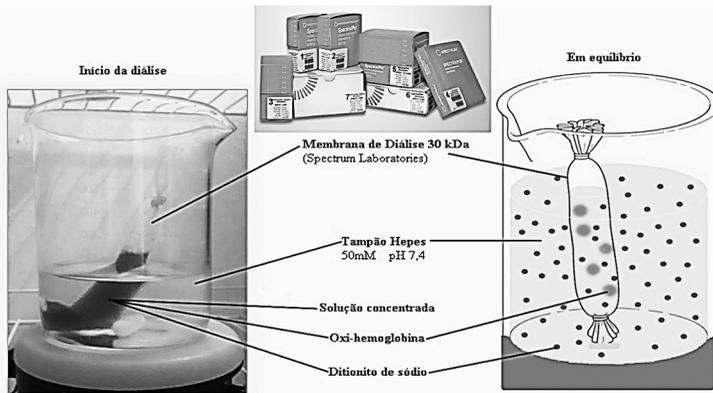
Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

3.2.2 Purificação da oxi-hemoglobina pelo método de diálise

A diálise é um processo que se baseia na difusão seletiva de moléculas através de uma membrana semipermeável, onde as moléculas são separadas com base na massa molar das partículas de interesse. A membrana de diálise é seletiva com relação ao tamanho das partículas, permitindo a passagem de solutos menores e mantendo a proteína de maior porte retida. Por isso, as moléculas maiores ficam retidas no lado interno da membrana, enquanto que as moléculas pequenas passam através dela, diminuindo sua concentração dentro da amostra. A característica dessa separação é determinada pelo tamanho do poro da membrana de diálise, chamado de massa molar de corte da membrana (MWCO).

Nessa técnica, a amostra da proteína oxi-hemoglobina, juntamente com ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) e a solução tampão Hepes (dialisado), foram colocadas em lados opostos da membrana semipermeável de diálise, a qual contém poros com massa molar de corte de 30 kDa (inferior a 64 kDa). O processo de purificação da oxi-hemoglobina foi realizado por diálise prolongada durante 24 h no Neurolab/UFSC sob agitação e temperatura constante de 8 °C contra um tampão Hepes 50 mM em pH 7,4 (trocado três vezes) com o objetivo de remover todo o excesso de ditionito de sódio presente na amostra de oxi-hemoglobina, conforme representado na Figura 21 (TSURUGA *et al.*, 1998; WEBER, 1992; WEBER *et al.*, 2013).

Figura 21 - Método de diálise.



Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

3.2.3 Determinação da concentração de oxi-hemoglobina

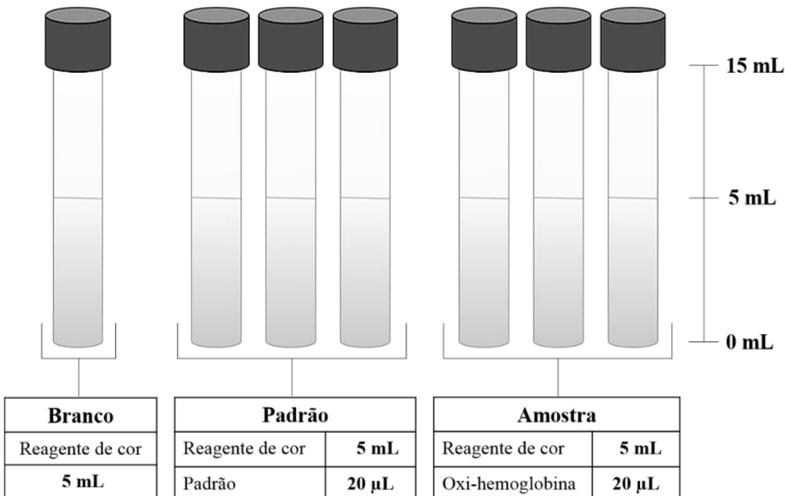
A concentração de oxi-hemoglobina foi determinada pelo método de Drabkin (kit Labtest) e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro *SpectraMax Plus 384* do fabricante Molecular Devices. O princípio desse método consiste na oxidação do ferro do grupo prostético heme da oxi-hemoglobina ao estado férrico (Fe^{3+}) pelo reagente de cor (ferrocianeto de potássio, cianeto de potássio e surfactante) formando hemiglobina (Hi), que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemiglobina (HiCN). Esse método é estabelecido pela reação colorimétrica de ponto final utilizando um padrão de hemoglobina com concentração conhecida de 10 g/dL (DRABKIN, 1948 e 1950) de acordo com a Equação (27). Todo o procedimento experimental utilizado para a quantificação da oxi-hemoglobina encontra-se detalhado no Apêndice A.

$$\text{Hemoglobina} \left(\frac{\text{g}}{\text{dL}} \right) = 10 \cdot \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \quad (27)$$

Inicialmente, a solução de oxi-hemoglobina retirada da diálise foi novamente oxigenada com oxigênio gasoso medicinal 99,9% e reservada. Foram utilizados sete tubos Falcon de 15 mL (1 branco, 3 padrões e 3 oxi-Hb) para a reação de quantificação, conforme mostrado na Figura 22. Em cada tubo Falcon foram colocados 5 mL do reagente de cor. Para o preparo da solução padrão foram adicionados 20 μL do padrão de hemoglobina (10 g/dL) e para a preparação da solução de oxi-hemoglobina foram adicionados 20 μL da amostra após dialisada (oxi-Hb). A mistura reacional foi deixada em repouso por 5 minutos. Depois do término desse tempo, as leituras das absorbâncias foram realizadas no comprimento de onda em 540 nm (DRABKIN, 1948 e 1950).

Todas as análises foram feitas em triplicatas e a concentração de oxi-hemoglobina foi calculada conforme a Equação (27) apresentada acima. O valor da concentração, obtido em gramas por decilitros (g/dL), foi calculado utilizando o fator de calibração com o padrão conhecido de hemoglobina (10 g/dL) (DRABKIN, 1948 e 1950).

Figura 22 - Quantificação da oxi-hemoglobina pelo método de Drabkin utilizando um padrão de concentração conhecida de 10 g/dL.



Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

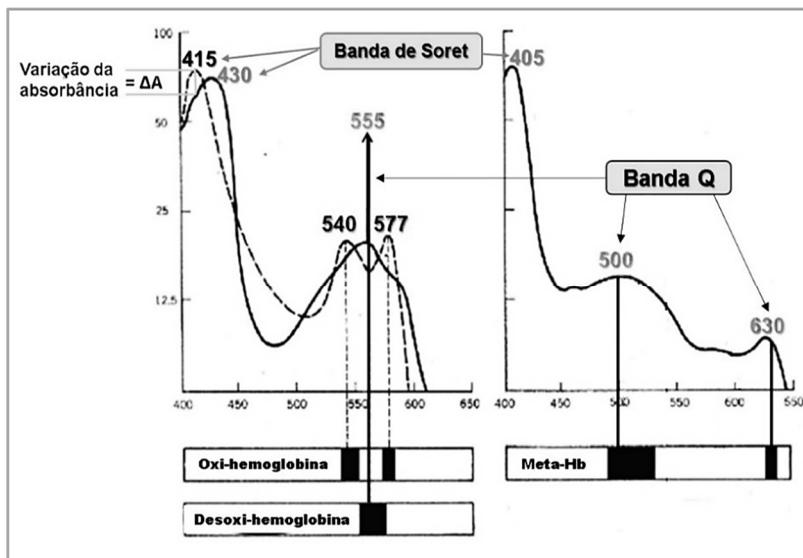
3.2.4 Determinação do espectro de absorção da molécula de hemoglobina

A determinação do espectro de absorção serve para caracterizar as distintas formas estruturais da molécula de hemoglobina. A ferro-protoporfirina tem como propriedade apresentar uma região de absorção máxima entre 400 a 440 nm, denominada de banda de *Soret*, e outra região que exibe uma absorção menor que a da banda de *Soret*, chamada de banda *Q*, a qual pode ser verificada pelo comprimento de onda entre 500 a 650 nm (GONÇALVES; BORISSEVITCH; ZÍLIO, 2009).

De acordo com a literatura (BARATA-SILVA *et al.*, 2015; NAOUM; RADISPIEL; MORAES, 2004), cada pico característico representa uma forma diferenciada da hemoglobina (Figura 24), podendo estar relacionado aos seguintes estados conformacionais:

- a) a oxi-hemoglobina possui absorções máximas locais em 415 nm (banda de *Soret*), 540 nm e 577 nm (banda *Q*);
- b) a desoxi-hemoglobina tem seus picos locais em 430 nm (região de *Soret*) e 555 nm (região da banda *Q*);
- c) a meta-hemoglobina exibe sua região de *Soret* em 405 nm e sua banda *Q* em 500 nm e 630 nm.

Figura 23 - Diferentes espectros de absorção das formas estruturais da molécula de hemoglobina, representando a região da banda de *Soret* (pico maior) e da banda *Q* (pico menor).



Fonte: Naoum, Radispiel e Moraes (2004).

Todas as análises do presente trabalho foram avaliadas no comprimento de onda entre 390 nm a 650 nm, justamente para mensurar o espectro de absorção de cada estrutura molecular no espectrofotômetro *SpectraMax Plus 384*. Com o objetivo de diminuir interferentes e obter um melhor sinal, utilizou-se a região da banda de *Soret* da oxi-Hb (415 nm) para avaliar a desoxigenação no *SFM 4000/S*. Não foram considerados nos experimentos os valores da banda *Q* por apresentarem sinais muito baixos e estarem susceptíveis a interferências (BARATA-SILVA *et al.*, 2015; NAOUM; RADISPIEL; MORAES, 2004). É importante mencionar que no comprimento de onda escolhido de 415 nm para todas as avaliações futuras, pode-se destacar uma diferença de absorbância (ΔA) relativamente pequena entre as formas oxi-Hb e desoxi-Hb. Esse fato terá implicações relevantes na análise dos resultados e será discutido posteriormente.

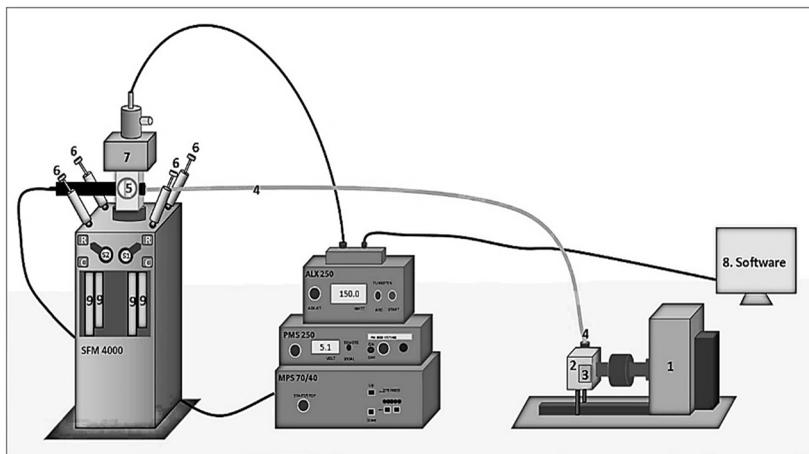
3.2.5 *Stopped Flow Mixer 4000/S* e método de mistura rápida com fluxo interrompido

Os elementos fundamentais que compõem o espectrômetro *Stopped Flow Mixer 4000/S* (*SFM 4000/S*) (Figura 24) incluem automação de elevado nível, alta sensibilidade, diminuição da cavitação e menor tempo morto (BATISTELA *et al.*, 2006; PEINTLER *et al.*, 2000). O equipamento possui todas as características que proporcionam um excelente desempenho para cinéticas rápidas (CHANCE, 2004; KHORASSANI *et al.*, 2011), pois para acompanhar a reação na sua etapa inicial é necessário um tempo morto inferior a 1 ms (BERGER *et al.*, 1967). O funcionamento do equipamento *SFM 4000/S* e seus componentes (localizado no Neurolab/UFSC) está detalhado logo a seguir na Figura 24.

Em função dessas condições que compõem o espectrômetro citadas acima, faz-se necessário descrever detalhadamente a sequência de eventos para a metodologia de mistura rápida com fluxo interrompido, realizada no *SFM 4000/S*. Esse método garante a utilização de micro volumes de amostras e a eficiência da mistura (BATISTELA *et al.*, 2006; BERGER, 1978), porém para que se obtenha uma solução homogênea com baixa viscosidade deve-se padronizar a concentração dos reagentes e a velocidade do fluxo de injeção. Segundo a Figura 24, essa técnica funciona da seguinte forma: os reagentes são injetados simultaneamente pelas quatro seringas (6) independentes por meio dos pistões (9) para os reservatórios e depois seguem para uma câmara de mistura em condições muito rápidas. O sistema óptico *MOS/200* é composto por lâmpada de Xe-Hg de 150 W (1), monocromador (2), botão para ajustar e fixar o comprimento de onda (3), cabo de fibra óptica (4) para o transporte da luz até que incida na microcubeta (5). A microcubeta (μ FC-08), que está localizada no interior da cabeça de observação (célula espectrofotométrica), deve ser completamente preenchida pela mistura homogênea. Em seguida, ocorrem acionamentos simultâneos pela ação de dois mecanismos distintos que constituem o sistema de parada brusca, denominado de *hard stop* (7): um intensifica a parada dos motores e outro, chamado de eletroválvula de alta velocidade, fecha a saída da microcubeta automaticamente no instante da parada do fluxo. A sincronização desses mecanismos faz com que seja acionado o gatilho (*trigger*) para início imediato da aquisição de dados pelo software (8). Esse software (Biokine 32 versão 4.74) tem a função de controlar o volume dos reagentes a serem ejetados de cada seringa, executar o tempo necessário para sequência das reações, salvar e recuperar graficamente todos os resultados, como

absorbância em função do tempo (BATISTELA *et al.*, 2006; KHORASSANI *et al.*, 2011).

Figura 24 - Equipamento *Stopped Flow Mixer 4000/S (SFM 4000/S)* e seus componentes.

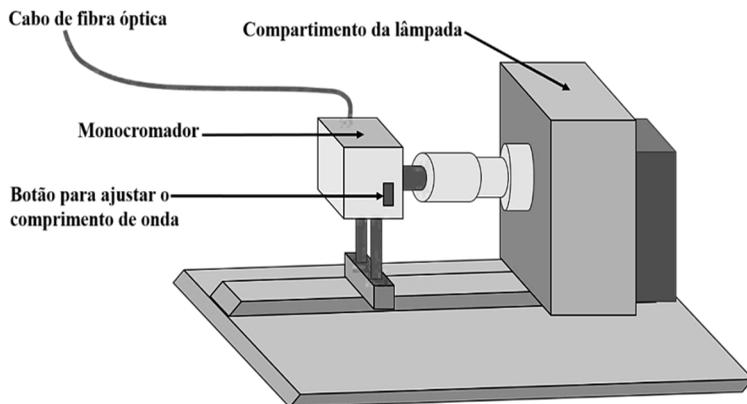


Fonte: Adaptado de Souza (2016).

Segundo o fabricante *Bio-Logic Science Instruments* (2014), a microcubeta de quartzo μ FC-08 é uma das mais eficientes no mercado para medir micro volumes de reagentes (μ L) e pode ser usada tanto para espectroscopia de absorbância quanto para fluorescência, percorrendo um caminho óptico de 0,08 cm em todos os sentidos.

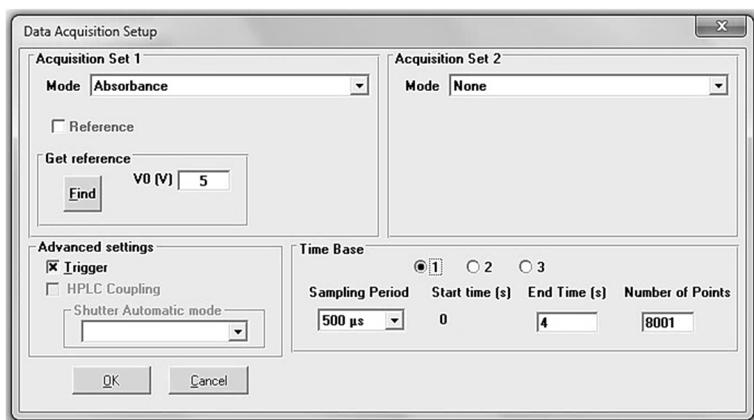
O sistema óptico *MOS/200*, que está representado na Figura 25, foi projetado para proporcionar maior velocidade e sensibilidade em cinéticas rápidas. Sua composição baseia-se em uma fonte de luz de alta intensidade, composta por uma lâmpada de xenônio-acrescida de mercúrio (Xe-Hg) com capacidade de 150 W para iluminação da amostra; um monocromador, que possui um botão para ajustar e fixar manualmente o comprimento de onda pelo usuário; e um cabo de fibra óptica que garante máxima eficiência para transportar a luz até a microcubeta (BATISTELA *et al.*, 2006; CHANCE, 2004; KHORASSANI *et al.*, 2011).

Figura 25 - Sistema óptico MOS/200.



Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

Figura 26 - Demonstração da configuração do tempo total de observação da reação (4 s)



Fonte: Bio-Logic Science Instruments (2014).

Foi definido que o tempo total de observação da reação seria de 4 s, como visualizado na Figura 26. Nesse período de 4 s são coletados 8001 pontos, onde a cada 500 μs é obtido um ponto para a aquisição de dados (*Data Acquisition Setup*) pelo software (Bio-Kine 32 versão 4.74) (Figura 26).

Segundo Berger (1967), o valor do tempo morto empregado para a captura dos dados iniciais da reação entre a hemoglobina e o oxigênio deveria ser inferior a 1 ms. Isso porque, quanto menor for o período de tempo morto maior será a visualização das etapas iniciais da reação. Importante mencionar que, durante todo procedimento de calibração do equipamento, o tempo morto estimado utilizando a μ FC-08 é de apenas 0,4 ms, com uma vazão volumétrica de 9,0 mL/s e um volume total utilizado na microcubeta de 202 μ L na proporção de 1:1 (101 μ L de oxi-hemoglobina e 101 μ L de ditionito de sódio), como representado na Figura 27. A vazão volumétrica é um requisito muito importante, pois ela deve estar em uma margem de segurança para que a proteína não sofra desnaturação e para que a interferência seja mínima, porque velocidades muito altas podem gerar formação de bolhas e misturas não homogêneas.

Figura 27 - Padronização da sequência de mistura da oxi-hemoglobina com ditionito de sódio.

Syringe	Content of syringes	Initial concentration	Final concentration
Syringe 1	Tampao Hepes		
Syringe 2	Tampao Hepes		
Syringe 3	Ditionito de sodio	8,6 mM	4,3 mM
Syringe 4	Oxi-hemoglobina	10 μ M	5,0 μ M

Fonte: Bio-Logic Science Instruments (2014).

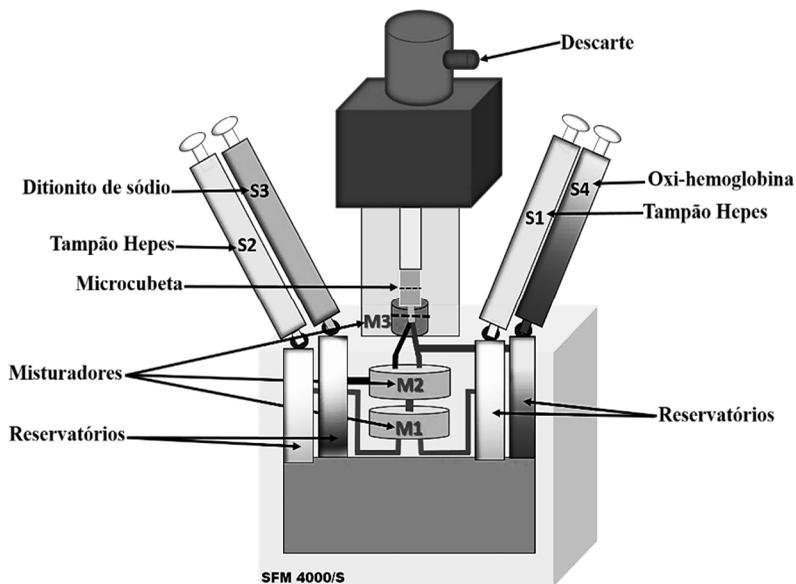
É importante explicar que outros pesquisadores utilizaram metodologia e tempo morto diferentes ao do que foi realizado no presente trabalho. Como por exemplo, Gibson (1970), em seu experimento com hemoglobinas humanas (pH 7,0) obteve o resultado das constantes

cinéticas usando um tempo morto de 1,2 ms e temperatura de 21,5 °C. Sua solução estoque de 3 mM de HbA₀ (oxi-hemoglobina humana) foi diluída em tampão fosfato 0,1 M e a reação de desoxigenação foi realizada com o ditionito de sódio. Já Johnson, Adamson e Mauk (1998) utilizaram um tempo morto de 1,5 ms para seus ensaios de desoxigenação, sob temperatura de 37 °C, tampão Tris 50 mM, pH 7,4 e 20 µM de HbA₀ (oxi-hemoglobina humana) para reagir com 1,5 mg/mL de ditionito de sódio. Gelderman e colaboradores (2010) empregaram um tempo morto de 1,3 ms sob condições semelhantes à de Johnson, Adamson e Mauk (1998) para temperatura (37 °C) e mesmo tampão em pH 7,4. Porém, a concentração de oxi-hemoglobina humana foi de 30 µM HbA₀ para 1,5 mg/mL de ditionito de sódio. Jia e colaboradores (2013) em seus experimentos utilizaram 30 µM de oxi-hemoglobina humana diluído em tampão Tris 50 mM em pH 7,4 para 1,5 mg/mL de ditionito de sódio, diferindo apenas da temperatura empregada (25 °C) e do tempo morto de 1,3 ms.

O equipamento possui três misturadores do tipo *Berger Ball* que estão representados na Figura 28 por M1, M2 e M3. De acordo com o fabricante, a cada experimento é necessário, realizar um branco para zerar a absorbância e calibrar o equipamento para garantir as leituras espectrofotométricas precisas. O primeiro misturador M1 é responsável pelas seringas S1 e S2, servindo somente para calibrar o zero no equipamento, não sendo utilizado posteriormente no experimento. As seringas um e dois (S1 e S2) devem ser sempre preenchidas com tampão de escolha (neste caso, Hepes 50mM em pH 7,4 contendo ditionito de sódio) para fazer a correta calibração até que se obtenha uma linha reta com valor zero de absorbância. Nesse circuito, as válvulas das seringas S1 e S2 devem estar na posição C (aberto) e as demais devem permanecer na posição R (fechado). Em seguida, esse circuito precisa permanecer fechado (posição R) durante todo o procedimento experimental para que as amostras não sejam diluídas além do necessário.

Convém mencionar que é obrigatório preencher todos os reservatórios anteriormente para evitar a entrada de oxigênio, posicionado a válvula na posição R, e depois abrir as válvulas das seringas S3 e S4 (posição C) para iniciar o experimento. Exclusivamente, nas seringas S3 e S4 devem ser colocados os reagentes para a mistura, sendo que a solução de ditionito de sódio deve ser colocada na seringa S3 e a oxi-hemoglobina purificada na seringa S4.

Figura 28 - Desenho do *SFM 4000/S* aberto para demonstrar a localização de todos os misturadores M1, M2 e M3 do tipo *Berger Ball* e todos os reagentes utilizados no procedimento experimental presentes nas seringas S1, S2, S3 e S4.



Fonte: Adaptado de Souza (2016).

A solução de ditionito de sódio na seringa S3 passa direto pelo misturador M2 e chega até o último misturador M3 (localizado sob a microcubeta), para efetivar a mistura com a solução de oxi-hemoglobina presente na seringa S4, como indicado na Figura 28. Desse compartimento (M3), essa mistura de reagentes deverá preencher a microcubeta até acionar o sistema de parada brusca para detecção da absorbância pela passagem de luz, ativando o gatilho para dar início à aquisição dos dados pelo software (HOLLAND *et al.*, 1985; BIO-LOGIC SCIENCE INSTRUMENTS, 2014).

3.2.5.1 Processo de desoxigenação da oxi-hemoglobina no SFM 4000/S utilizando como agente redutor o ditionito de sódio.

Fundamentado em diversas literaturas e conclusões, foi considerado que para todas as concentrações de oxi-hemoglobina analisadas, a melhor concentração de ditionito de sódio (8,6 mM) seria a

que satisfizesse os seguintes requisitos: uma concentração que atingisse a completa desoxigenação com maior economia de reagente, uma menor viscosidade na mistura da solução, para evitar problemas de entupimento no equipamento e melhorar a homogeneidade na mistura para não dificultar o processo de mensuração (BRITTAIN; SIMPSON, 1989; COIN; OLSON, 1979; ELMER; HARRIS; PALMER, 2011; HOLLAND *et al.*, 1985; JIA *et al.*, 2004 e 2013; JORGE *et al.*, 2012; LAMBETH; PALMERS, 1973; WIREKO; ABRAHAM, 1992). A desoxigenação da oxi-hemoglobina com a utilização em excesso do ditionito de sódio como agente redutor vem sendo frequentemente usada pelo método de mistura rápida desde os primeiros trabalhos realizados por Hartridge e Roughton (1923). O ditionito de sódio ou hidrossulfito de sódio é comumente empregado na desoxigenação dos pigmentos heme devido sua capacidade de remover completamente o oxigênio de heme proteínas e de não afetar a estrutura da hemoglobina durante a geração dos produtos da reação (WIREKO; ABRAHAM, 1992). O uso desse agente redutor é encontrado em trabalhos de redução de enzimas, estudos de transferência de elétrons de proteínas e na reação cinética de dissociação da oxi-hemoglobina (MCKENNA; GUTHEIL; SONG, 1991).

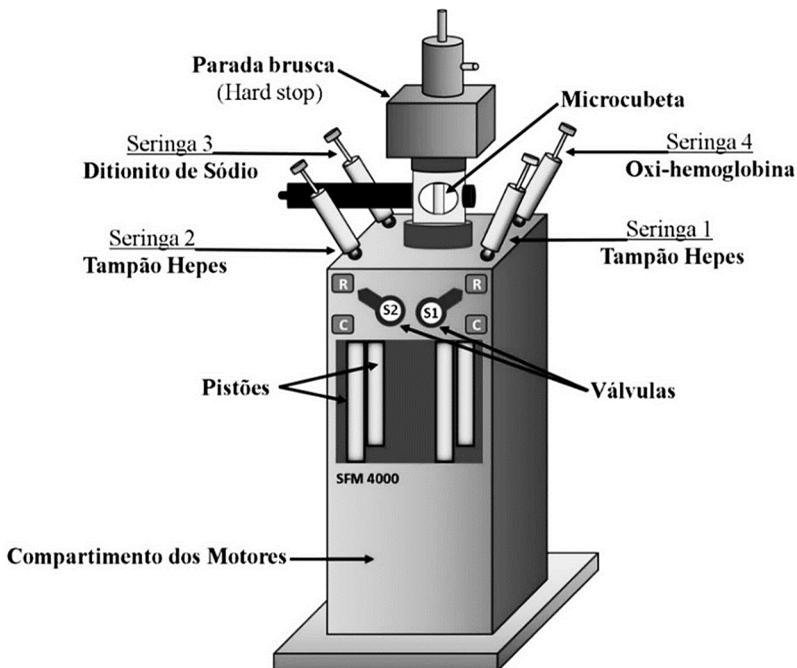
No procedimento de desoxigenação foi inserido o agente redutor ditionito de sódio na seringa S3 e na seringa S4 cada uma das concentrações de oxi-hemoglobina a serem avaliadas. Conforme proposto por Jia e colaboradores (2004 e 2013), foi fixado o valor de 1,5 mg/mL de ditionito de sódio que equivale a 8,6 mM onde, na proporção de 1:1 no *SFM 4000/S*, resultou em 4,3 mM para cada concentração de oxi-hemoglobina analisada.

Convém ressaltar que, para evitar possíveis contaminações e entrada de oxigênio no *SFM 4000/S*, a cada experimento as seringas eram trocadas e o seu êmbolo ajustado manualmente para a retirada de possíveis bolhas de ar. Durante todo o procedimento experimental sempre foram usados:

- 1) seringas novas e estéreis de 10 mL;
- 2) mesmo tampão (Hepes 50mM pH 7,4);
- 3) temperatura estável em torno de 25 °C (a sala foi ambientada nessa temperatura com o ar condicionado, sendo monitorado por termômetro para ambiente em função do equipamento não possuir controle de temperatura);
- 4) condições iniciais de pH em torno de 7,4.

Todas as soluções foram colocadas na ordem mostrada pela Figura 29 e de acordo com as recomendações do fabricante (BIO-LOGIC SCIENCE INSTRUMENTS, 2014).

Figura 29 - Representação da ordem de distribuição das seringas S1, S2, S3 e S4 no *SFM 4000/S* com seus respectivos reagentes para a reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina juntamente com outros componentes do equipamento.



Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

Para cada concentração de oxi-hemoglobina a ser desoxigenada, no mínimo, foram repetidas 20 corridas cinéticas no *SFM 4000/S* para obter o resultado das absorbâncias em função do tempo (s). O comprimento de onda foi ajustado em 415 nm (resultado do pico máximo da oxi-hemoglobina) no *MOS/200*, que está acoplado ao equipamento (BARATA-SILVA *et al.*, 2015; NAOUM; RADISPIEL; MORAES, 2004).

3.2.5.2 Curvas de calibração

A curva de calibração da oxi-hemoglobina foi determinada no próprio equipamento *SFM 4000/S*, mensurada em triplicata. Para isso, foram elaboradas diferentes diluições de hemoglobina oxigenada a partir da solução estoque (1,23 g/dL) nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e

50 μM . Os resultados obtidos do *SFM 4000/S* deram origem a curva de calibração da oxi-Hb a partir da realização de uma regressão linear adquirida pelo software Origin®. O valor encontrado referente ao coeficiente angular da curva de calibração (a_0) equivale ao coeficiente de extinção molar (épsilon = ϵ) da oxi-Hb multiplicado pelo caminho óptico da microcubeta (L). Convém ressaltar que no *SFM 4000/S* o caminho óptico da microcubeta é de 0,08 cm, ou seja, menor do que o padrão utilizado pela maioria dos equipamentos espectrofotométricos comuns, que é de 1 cm.

A curva de calibração da desoxi-hemoglobina foi construída a partir da hipótese de que a reação de desoxigenação foi completa (JORGE *et al.*, 2012). Sendo assim, os resultados obtidos da desoxigenação das concentrações de cada oxi-hemoglobina no *SFM 4000/S* também deram origem a curva de calibração da desoxi-hemoglobina. O valor de absorbância final mensurado no experimento de desoxigenação corresponde à absorbância da desoxi-Hb, no comprimento de onda (415 nm), para um valor de concentração igual à concentração inicial de oxi-hemoglobina. A curva de calibração também foi obtida a partir de uma regressão linear.

Para os demais compostos intermediários resultantes da reação entre a hemoglobina e o oxigênio, o valor do coeficiente angular da curva de calibração “ a_i ” foi estimado por meio de otimização, assim como as constantes cinéticas de dissociação k_{-4} , k_{-3} , k_{-2} , k_{-1} .

3.2.6 Otimização das constantes cinéticas

Para determinar as constantes de dissociação do oxigênio com a oxi-hemoglobina (k_{-4} , k_{-3} , k_{-2} , k_{-1}) foi utilizado o método de busca unidirecional, o método algoritmo genético e uma combinação dos dois. Os programas computacionais foram elaborados em linguagem Fortran, com uso do ambiente Microsoft Visual Studio 2010 e estão apresentados no Apêndice B.

3.2.6.1 Função objetivo (FO)

A função objetivo deste trabalho, apresentada na Equação (28), corresponde à minimização do erro entre a absorbância mensurada no *SFM 4000/S* e o valor de absorbância que seria obtido a partir da utilização das curvas de calibração dos compostos proteicos envolvidos na desoxigenação da oxi-hemoglobina e de suas concentrações, obtidas a partir do modelo matemático:

$$FO = \min(Abs - Abs^m)^2 \quad (28)$$

Em função da absorvância da forma desoxigenada da hemoglobina apresentar um valor de absorvância significativo no comprimento de onda em 415 nm, que foi utilizado durante todos os experimentos realizados no *SFM 4000/S*, os valores de absorvâncias obtidos são resultado da soma das duas formas de hemoglobina (oxi-hemoglobina com a desoxi-hemoglobina), conforme pode ser observado na Figura 23 (página 70). Além disso, embora não se encontre na literatura varreduras dos compostos intermediários da reação, supõe-se que os mesmos apresentem comportamento semelhante ao das outras formas, contribuindo também para o valor mensurado no equipamento. Deste modo, tanto a absorvância experimental, quanto a calculada com base no modelo matemático para a reação e as curvas de calibração, correspondem à soma das absorvâncias individuais de cada um dos compostos intermediários, como demonstrado na Equação (29):

$$Abs^m = \sum_{i=0}^4 Abs_{Hb(O_2)_i}^m \quad (29)$$

A absorvância de cada um dos compostos envolvidos na reação pode ser calculada a partir de suas respectivas curvas de calibração, conforme expresso na Equação (30):

$$Abs_{Hb(O_2)_i}^m = a_i \cdot C_{Hb(O_2)_i} \quad (30)$$

onde “ a_i ” é o coeficiente angular da curva de calibração e “ i ” varia de 0 a 4.

As concentrações de cada um dos compostos proteicos podem ser avaliadas pelas Equações (17) a (21), que descrevem a dinâmica da reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina com o ditionito de sódio.

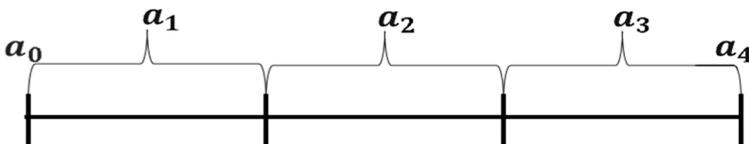
3.2.6.2 Busca unidirecional

O método de algoritmo por busca unidirecional foi utilizado inicialmente isoladamente e, posteriormente, em conjunto com o de algoritmo genético a fim de otimizar as quatro constantes cinéticas de

dissociação (k_{-4} , k_{-3} , k_{-2} , k_{-1}) e os três coeficientes angulares intermediários das curvas de calibração (a_1 , a_2 e a_3).

A primeira etapa da busca unidirecional foi a seleção das estimativas iniciais. Para isso, foram gerados quarenta mil conjuntos de sete números aleatórios (um para cada parâmetro do modelo). Esse processo foi dividido em duas etapas: com e sem restrição dos coeficientes das curvas de calibração. A restrição imposta para os coeficientes das curvas de calibração foi o ordenamento ($a_0 < a_1 < a_2 < a_3 < a_4$) e distribuição linear, ou seja, conhecidos os valores de a_0 e a_4 , dividiu-se o intervalo entre eles em três partes e procurou-se cada um dos coeficientes intermediários nesse intervalo, conforme pode ser observado na Figura 30. Essa escolha está relacionada ao fato que a absorvância é função da estrutura espacial da molécula. A cada oxigênio liberado, essa estrutura sofre uma pequena modificação, o que conduz à ideia de que há um sequenciamento decrescente na absorvância das estruturas.

Figura 30 - Ilustração da restrição imposta para determinar os coeficientes das curvas de calibração.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

O programa de busca unidirecional trabalha com a minimização do erro, que nesse caso consiste no quadrado da soma das diferenças entre a absorvância experimental e a absorvância calculada utilizando o modelo aqui proposto para cada uma das concentrações avaliadas. Alimentado com a estimativa inicial e seu erro, o programa caminha nas duas direções procurando aquela que terá um erro menor. Definida a direção, ele decide o tamanho do passo, que pode ser igual ao inicial, menor ou maior, dependendo dos valores de erro encontrado para cada uma dessas alternativas. Quanto maior a diferença entre um erro e outro, maior é o passo. Quanto menor essa diferença, menor o passo.

As decisões tomadas para a busca unidirecional estão especificadas na Tabela 2 e estão relacionadas ao tamanho do passo inicial e da diferença entre erros para a qual o programa assume o resultado como

satisfatório. Além disso, é estipulado um número máximo de busca para o caso de o critério do erro não ser atingido.

Tabela 2 - Parâmetros utilizados na busca unidirecional.

Coefficiente de contração do passo	0,5 μM^{-1} ou s^{-1}
Passo inicial das constantes cinéticas	1,0 s^{-1}
Passo inicial dos coeficientes das curvas de calibração	$1,0 \cdot 10^{-4}$ D.O. $\cdot \mu\text{M}^{-1}$
Mínima diferença para erro	$1,0 \cdot 10^{-10}$ D.O.
Passo mínimo	$1,0 \cdot 10^{-8}$ μM^{-1} ou s^{-1}
Número máximo de iterações para cada parâmetro	200
Número máximo de iterações totais	300

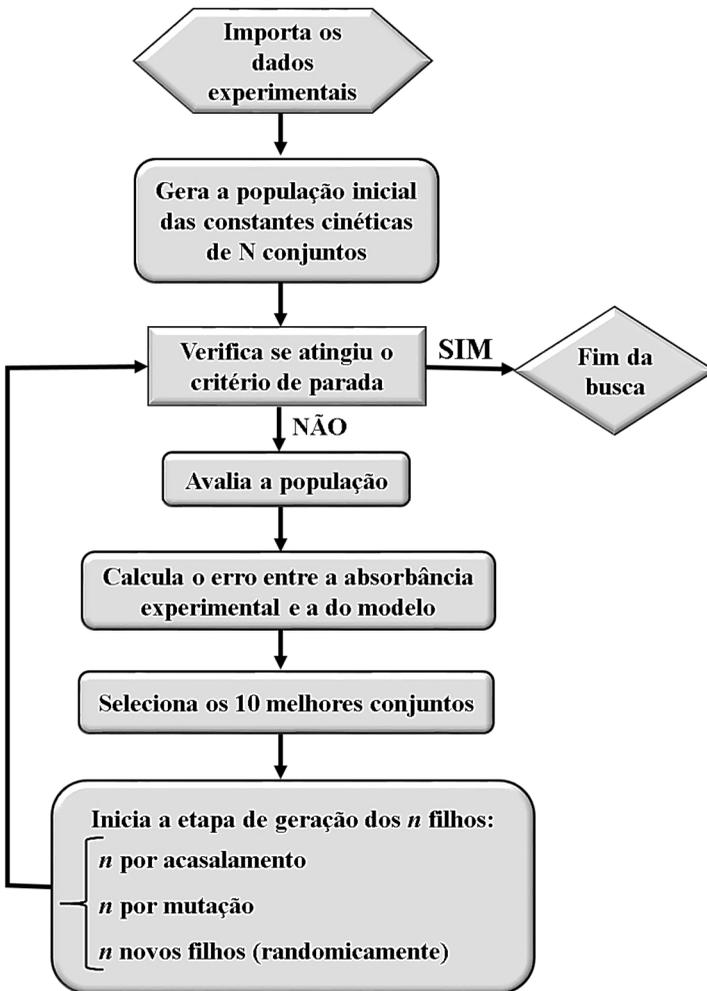
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

O espaço de busca utilizado no programa de busca unidirecional foi de 0 a 4000 para as constantes cinéticas e de a_0 a a_4 para os coeficientes das curvas de calibração (determinados experimentalmente).

3.2.6.3 Algoritmo genético

A implementação do algoritmo genético foi realizada utilizando a linguagem Fortran. O fluxograma do programa computacional é mostrado na Figura 31 e a rotina encontra-se apresentada no Apêndice B.

Figura 31 - Fluxograma do programa computacional de algoritmo genético.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

A sequência de eventos segue os seguintes passos:

- 1) importa os valores de absorbância em função do tempo obtidos experimentalmente;
- 2) gera a população inicial de 7 parâmetros composta por 50 conjuntos ($N_{conjuntos}$). Cada conjunto é representado por um

vetor contendo as 4 constantes cinéticas de dissociação $k_{-4}, k_{-3}, k_{-2}, k_{-1}$ e os três coeficientes angulares intermediários das curvas de calibração desconhecidas (a_1, a_2 e a_3). Os valores das constantes cinéticas são escolhidos aleatoriamente, utilizando um número randômico extraído de uma distribuição equiprovável, dentro da faixa de $k_{\text{mínimo}}$ a $k_{\text{máximo}}$. Os valores dos coeficientes angulares das curvas de calibração também são escolhidos aleatoriamente, utilizando um número randômico extraído de uma distribuição equiprovável, dentro da faixa de a_0 e a_4 ;

- 3) verifica se o teste é menor que o N_{testes} que o programa fará;
- 4) resolve as equações cinéticas para todas os compostos proteicos envolvidos na reação de dissociação do O_2 para cada um dos conjuntos gerados. As equações diferenciais são resolvidas utilizando o método de Euler simples;
- 5) com as concentrações obtidas no passo 4, calcula a absorvância total somando a multiplicação do valor de concentração pelo coeficiente angular da curva de calibração para cada um dos compostos proteicos;
- 6) calcula a diferença entre a absorvância experimental e a absorvância do modelo e eleva o valor ao quadrado;
- 7) soma o erro entre a absorvância experimental e a do modelo;
- 8) ordena os conjuntos do menor para o maior erro;
- 9) seleciona os melhores 10 conjuntos. Estes vetores serão preservados para a próxima iteração computacional;
- 10) inicia a etapa de geração dos filhos a partir dos selecionados no passo 9, ou seja, cria-se 40 filhos, sendo 10 por acasalamento, 20 por mutação e 10 novos obtidos randomicamente dentro da mesma faixa de $k_{\text{mínimo}}$ a $k_{\text{máximo}}$ e a_0 a a_4 .

- o acasalamento consiste na geração de filhos através do cruzamento entre os “genes” dos pais. Os pais serão os 10 melhores conjuntos. Estes pais formam 10 filhos, ou seja, os próximos 10 conjuntos. Para facilitar o entendimento do resultado do acasalamento, pensa-se inicialmente que os filhos são iguais aos pais. Posteriormente, trocam-se alguns dos genes. A Tabela 3 mostra um exemplo de quais trocas podem dar origem a cada um dos filhos.

Tabela 3 - Representação do acasalamento dos pais obtendo como resultado 10 filhos.

Conjunto dos filhos	Elemento do conjunto que será modificado	Conjunto ao qual deveria ser o correspondente	Conjunto ao qual é correspondente
11	k_{-3}	1	4
	k_{-4}	1	4
12	k_{-3}	2	5
	k_{-4}	2	5
13	k_{-3}	3	6
	k_{-4}	3	6
14	k_{-3}	4	1
	k_{-4}	4	1
15	k_{-3}	5	2
	k_{-4}	5	2
16	k_{-3}	6	3
	k_{-4}	6	3
17	a_2	7	8
18	a_4	8	7
19	a_3	9	10
20	a_3	10	9

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

- a formação dos filhos por meio da mutação consiste, primeiramente, na escolha do gene a ser mutado. Essa escolha necessita da obtenção de um número randômico a partir de uma distribuição equiprovável. Em seguida, é feita uma análise se o número sorteado

está abaixo da probabilidade estipulada ($p_{mutação}$). Em caso afirmativo, haverá mutação, caso negativo, não haverá. Havendo mutação, será escolhido um valor para o parâmetro do conjunto a ser modificado de forma análoga à descrita no passo 2;

- os novos filhos são criados seguindo as considerações do passo 2.

11) retorna ao passo 3.

Os parâmetros usados no programa estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados no algoritmo genético.

Parâmetros	Valor adotado
$N_{conjuntos}$	50
$k_{mínimo}$	0
$k_{máximo}$	4000
N_{testes}	100
$p_{mutação}$	0,30

Fonte: Desenvolvida pela autora (2016)

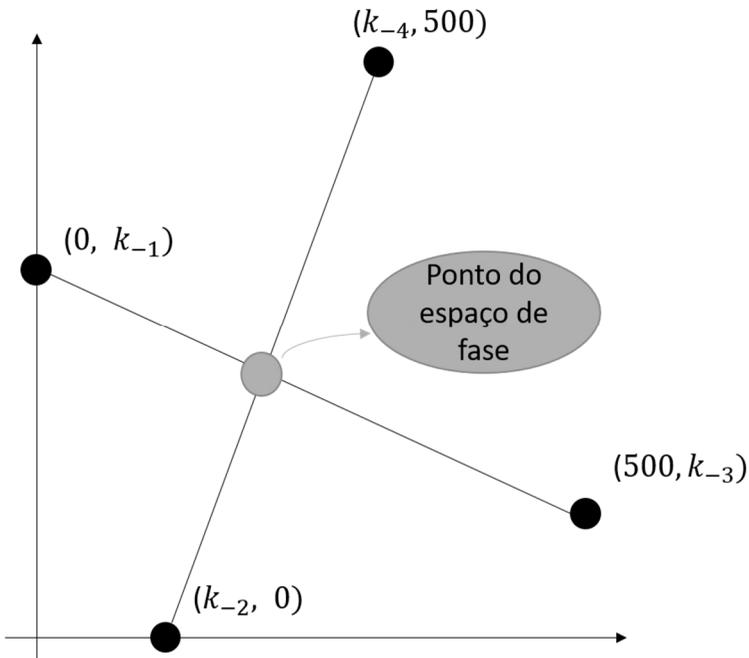
3.2.6.4 Construção do espaço de fase

A análise dos resultados da otimização pode ser realizada sob diferentes perspectivas a fim de se avaliar simultaneamente os parâmetros do modelo. Uma dessas possíveis análises é a partir da construção de um espaço de fase, comumente utilizado para representar um estado de um sistema.

Considerando apenas os quatro parâmetros cinéticos (k_{-4} , k_{-3} , k_{-2} e k_{-1}), é possível imaginá-los sendo os vértices de um quadrilátero em um espaço de fase bidimensional. A estruturação desse quadrilátero pode ser entendida a partir de um exemplo ilustrado na Figura 32. A intercepção das diagonais do quadrilátero origina um ponto no sistema de coordenadas cartesianas, que pode ser entendido como um

ponto do espaço de fase. Deste modo, cada conjunto obtido origina um ponto do espaço de fase a partir da construção do quadrilátero correspondente e a intercepção de suas diagonais.

Figura 32 - Ilustração da forma de construção dos pontos do espaço de fase.



Fonte: Desenvolvida pela autora (2016)

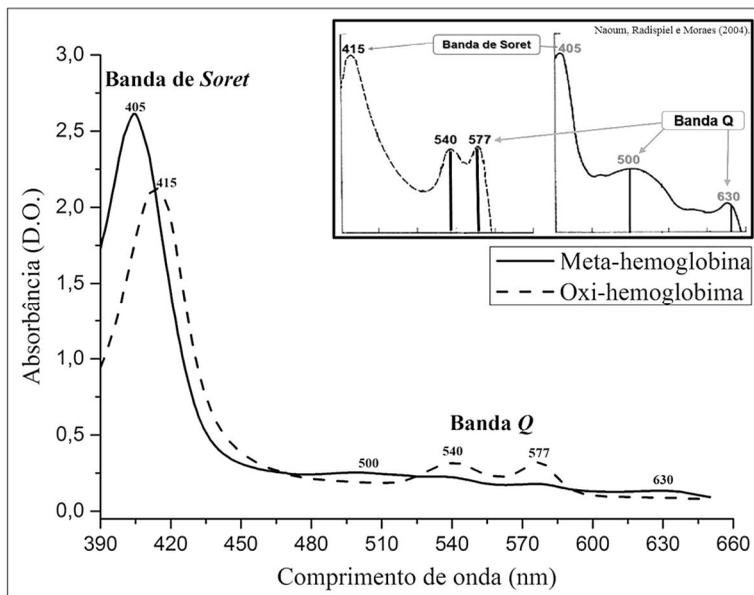
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a realização dos experimentos e da otimização, obtiveram-se os resultados que serão aqui apresentados e discutidos.

4.1 REDUÇÃO DA META-HEMOGLOBINA E QUANTIFICAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA

Cada conformação da hemoglobina foi identificada separadamente por meio de varredura entre 390 nm a 650 nm (Figura 33).

Figura 33 - Determinação do espectro de absorção da meta-hemoglobina (linha contínua) e da oxi-hemoglobina (linha tracejada) após a purificação em comparação com a literatura.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Na Figura 33 está demonstrado o espectro de absorção da meta-Hb (linha contínua) e da oxi-Hb (linha tracejada), confirmando que os resultados dos picos encontrados nas bandas de *Soret* e *Q* estão em acordo com os da literatura. O gráfico de absorbância (D.O.) em função do comprimento de onda (nm) comprova que realmente ocorreu a conversão,

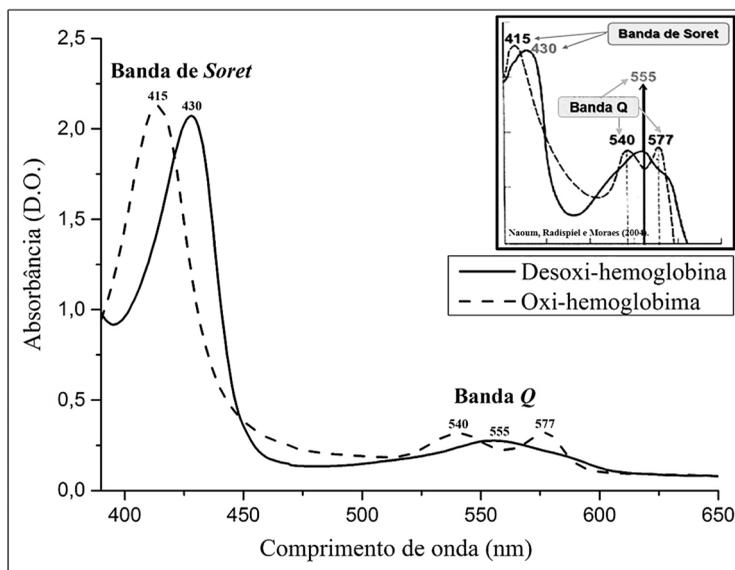
evidenciando que a meta-Hb (estado férrico) foi reduzida à oxi-hemoglobina (estado ferroso) pelo ditionito de sódio conforme esperado após sua purificação na coluna cromatográfica com Sephadex G-25.

O método de Drabkin foi utilizado para quantificar a concentração de oxi-Hb, onde o valor médio encontrado foi de $1,23 \pm 0,02$ g/dL.

4.2 CONFIRMAÇÃO DA DESOXIGENAÇÃO COMPLETA DA OXI-HEMOGLOBINA UTILIZANDO O DITIONITO DE SÓDIO

Para a construção da curva de calibração da desoxi-hemoglobina, assumiu-se a hipótese de que a reação de desoxigenação da oxi-Hb com o ditionito de sódio é completa. A fim de confirmar essa suposição, realizou-se a reação de desoxigenação para uma determinada concentração de oxi-hemoglobina e, em seguida, fez-se leituras de absorvância no espectrofotômetro. O resultado obtido pode ser evidenciado na Figura 34, que corrobora a suposição realizada.

Figura 34 - Diferença das curvas do espectro de absorção da oxi-hemoglobina (linha contínua) e da desoxi-hemoglobina (linha tracejada) após a desoxigenação no *SFM 4000/S* em comparação com a literatura.



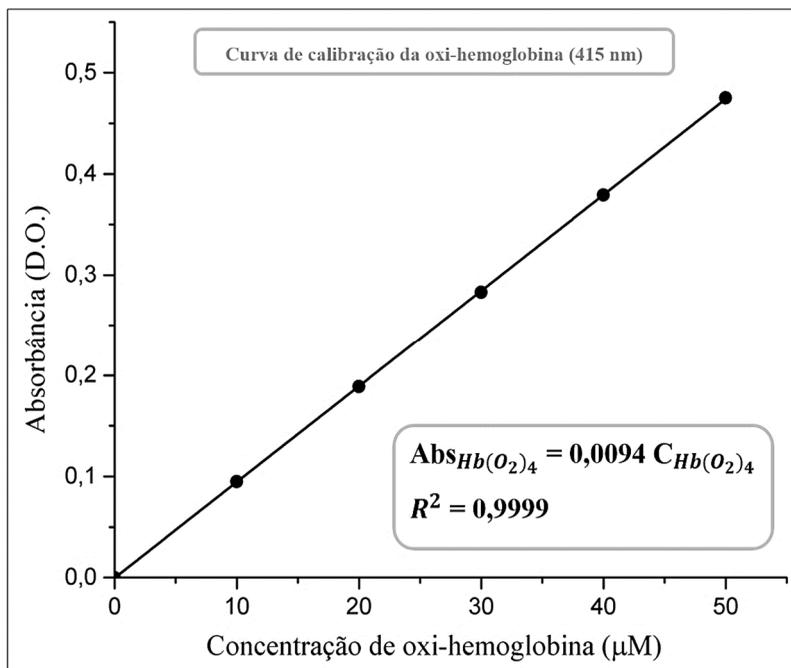
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Os resultados apresentados na Figura 34 estão em acordo com as argumentações de Jia e colaboradores (2013), Brittain e Simpson (1989), Coin e Olson (1979), Dalziel e O'Brien (1957), Jorge *et al.* (2012) e Elmer e colaboradores (2010), cuja afirmação é a de que o ditonito de sódio em excesso (1,5 mg/mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) remove totalmente o oxigênio que se encontra conectado a oxi-Hb, confirmando que a oxi-Hb (linha tracejada) se transformou em desoxi-hemoglobina (linha contínua) após sua desoxigenação com ditonito de sódio no *SFM 4000/S* (Figura 34). Com a intenção de conseguir o melhor sinal, foi mantido o valor máximo do espectro de absorção da oxi-hemoglobina (415 nm) para a avaliação experimental (NAOUM; RADISPIEL; MORAES, 2004).

4.3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Os dados utilizados para a curva de calibração da oxi-hemoglobina foram obtidos no próprio *SFM 4000/S*. Após a construção do gráfico de absorbância em função da concentração, constatou-se o comportamento linear para o intervalo de concentração avaliada (10 a 50 μM). Deste modo, fez-se uma regressão linear utilizando o software Origin®, cujo resultado pode ser observado na Figura 35. A curva de calibração da forma oxigenada apresentou como resultado do coeficiente angular de $a_4 = 0,0094 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Figura 35). Esse resultado (0,0094) foi dividido pelo caminho óptico da microcubeta (0,08 cm) e multiplicado por mil a fim de padronizar esse valor para as unidades comumente utilizadas ($\text{mM} \cdot \text{cm}^{-1}$) e obter o coeficiente de extinção molar de $\epsilon = 117,5 \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (épsilon). Antonini e Brunori (1971) obtiveram o coeficiente de extinção molar de $\epsilon = 128 \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ no comprimento de onda em 415 nm. O comprimento de onda utilizado no experimento do presente trabalho foi o mesmo realizado para os experimentos de Antonini e Brunori (1971), porém, a diferença de 6,3 % com relação ao valor do coeficiente de extinção molar apresentado na literatura deve-se à forma como foi preparada a oxi-hemoglobina. As condições experimentais utilizadas no presente trabalho foram tampão Hepes 50mM em pH 7,4 e temperatura ambiente em torno de 25 °C ao invés de água pH 7,0 e temperatura de 20 °C (ASSEDELFT; ZIJLSTR, 1975).

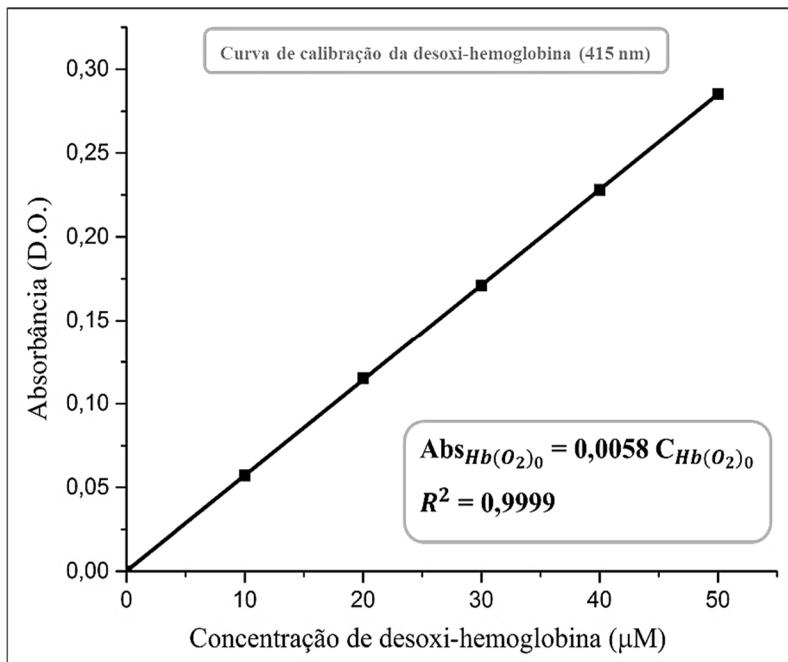
Figura 35 - Curva de calibração da absorbância (D.O.) em função da concentração de oxí-hemoglobina (μM) mensurada no comprimento óptico em 415 nm (Banda de *Soret*).



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Considerando que a reação da oxí-Hb com o ditionito de sódio foi completa, os dados utilizados para a curva de calibração da desoxi-Hb correspondem aos valores finais de absorbância das diferentes concentrações de oxí-Hb (10, 20, 30, 40 e 50 μM). Após a construção do gráfico de absorbância em função da concentração de desoxi-Hb, observou-se comportamento linear, sendo possível a realização de uma regressão linear utilizando o software Origin®, conforme pode ser visualizado na Figura 36. O coeficiente angular da curva de calibração da forma desoxigenada foi de $a_0 = 0,0058 \mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Figura 36 - Curva de calibração da absorbância (D.O.) em função da concentração de desoxi-hemoglobina (μM) mensurada no comprimento óptico em 415 nm (Banda de *Soret*).



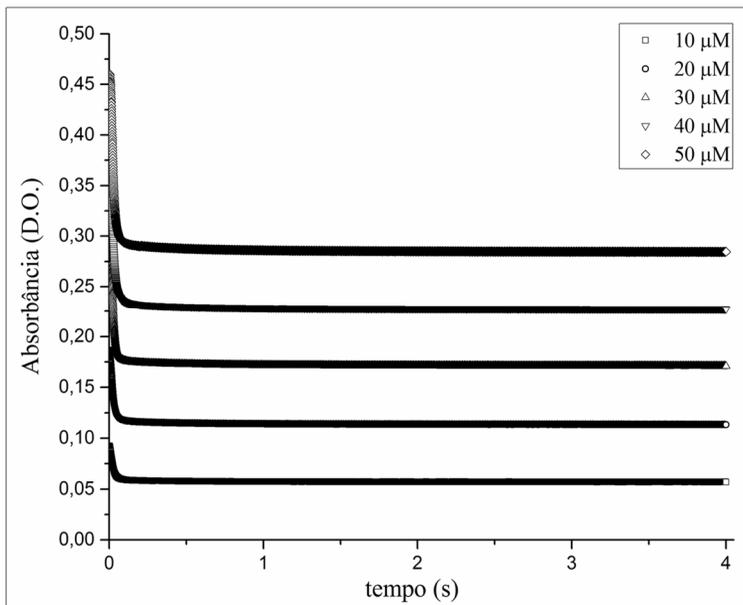
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

4.4 EXPERIMENTOS DE DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA NO *SFM 4000/S*

A reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina realizada no *SFM 4000/S* fornece valores de absorbância ao longo do tempo. Os resultados experimentais obtidos nesse equipamento para cada valor de concentração de oxi-hemoglobina utilizado (10, 20, 30, 40 e 50 μM) estão mostrados conjuntamente na Figura 37, de modo que se pode concluir que o comportamento qualitativo de todas as curvas é semelhante.

É importante explicar que os valores finais de absorbância, quando a curva atinge o patamar, correspondem às absorbâncias somente da desoxi-hemoglobina no comprimento de onda de 415 nm. A partir desses valores é que a curva de calibração da desoxi-Hb foi construída.

Figura 37 - Gráfico da desoxigenação de todas as concentrações de oxí-hemoglobina (10; 20; 30; 40 e 50 μM) analisadas por 4 s no *SFM 4000/S* utilizando o comprimento de onda em 415 nm (região da banda de *Soret*).

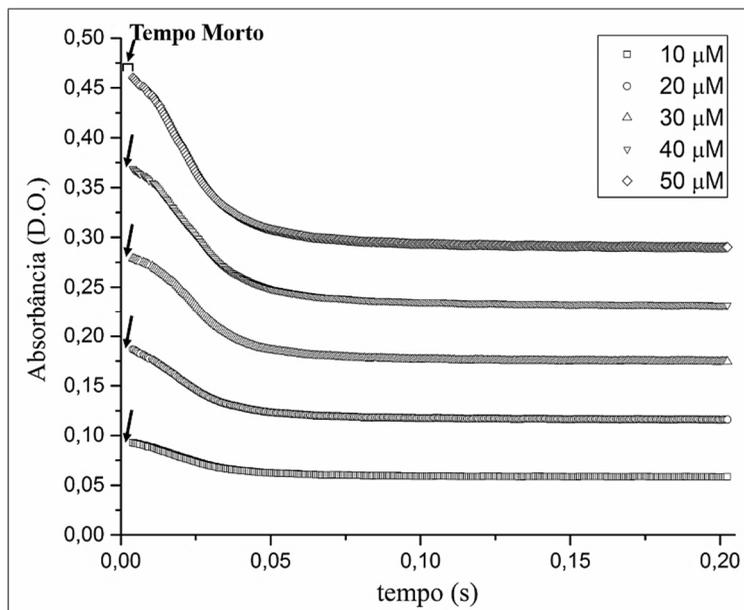


Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Com a intenção de analisar mais detalhadamente o comportamento de todas as curvas e melhor visualizar a etapa inicial da reação que ocorre rapidamente, o gráfico da Figura 37 foi ampliado e analisado apenas até 0,2 s, conforme demonstrado na Figura 38.

A partir da Figura 38 é possível concluir que, de fato, a parte dinâmica da reação ocorre antes de 0,2 s e nessa figura também pode ser explicado o intervalo referente ao tempo morto obtido no início de cada curva analisada (10; 20; 30; 40 e 50 μM). Em função dessa característica, a otimização será realizada apenas para esse intervalo de tempo, minimizando o erro acumulado por um grande número de pontos que não fazem parte da região de interesse no que diz respeito ao estudo cinético das reações.

Figura 38 - Gráfico ampliado da desoxigenação de todas as concentrações de oxi-hemoglobina para 0,2 s, demonstrando o tempo morto para cada uma das concentrações de oxi-hemoglobina analisadas (pelas flechas).

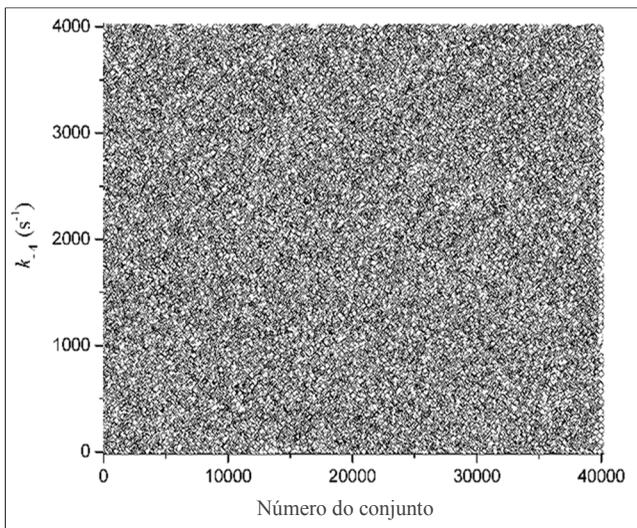


Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

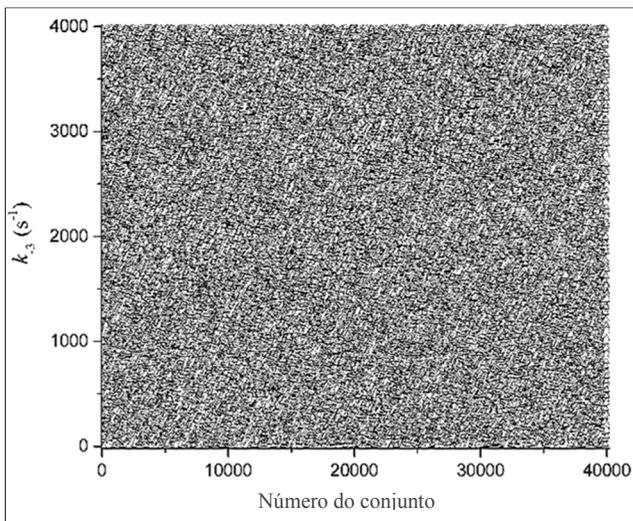
4.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO MODELO

Após a obtenção das curvas de absorbância em função do tempo (0,2 s), fez-se a otimização das constantes cinéticas do modelo para a desoxigenação da oxi-hemoglobina. O processo de otimização foi realizado de acordo com determinados passos a fim de facilitar o desenvolvimento de diversas análises que serão aqui descritas.

A primeira etapa foi a execução da busca unidirecional permitindo uma análise inicial com relação aos possíveis valores para os parâmetros do modelo. Para isso, na inicialização do método de otimização foram gerados quarenta mil conjuntos de sete números aleatórios que, antes de serem aplicados na busca unidirecional, foram analisados. Os valores dos parâmetros para cada um desses quarenta mil conjuntos podem ser visualizados nas Figuras 39 a 42 para as constantes cinéticas do modelo k_{-4} , k_{-3} , k_{-2} e k_{-1} , respectivamente.

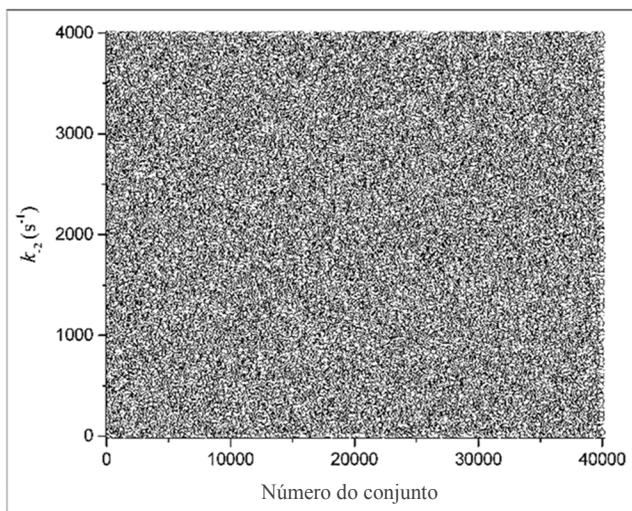
Figura 39 - Valores gerados aleatoriamente para a constante cinética k_{-4} .

Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

Figura 40 - Valores gerados aleatoriamente para a constante cinética k_{-3} .

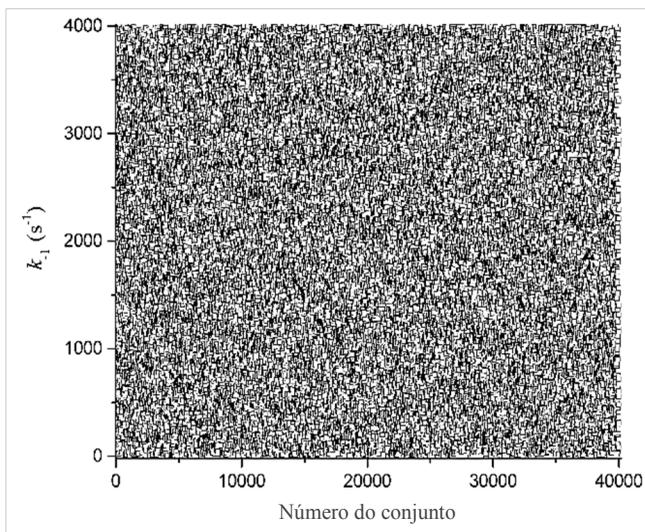
Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

Figura 41 - Valores gerados aleatoriamente para a constante cinética k_{-2} .



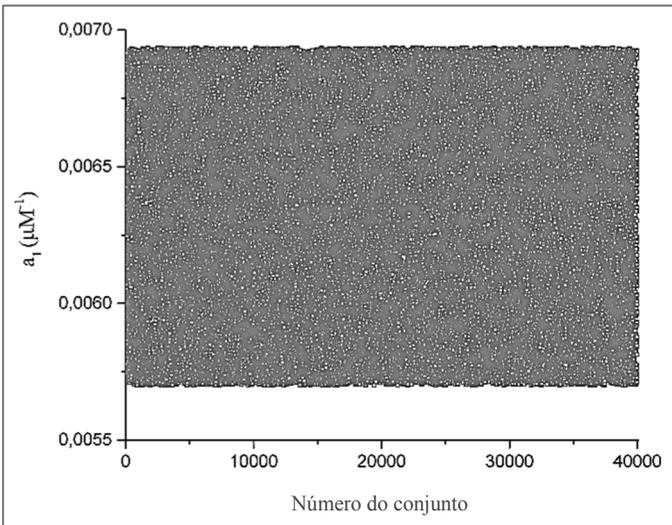
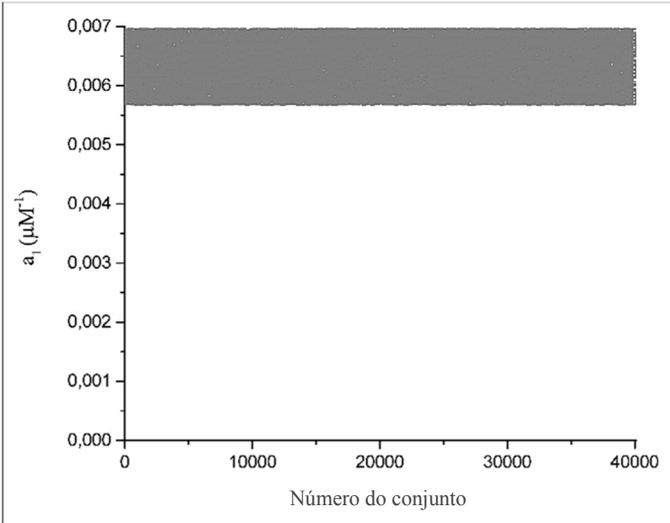
Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

Figura 42 - Valores gerados aleatoriamente para a constante cinética k_{-1} .



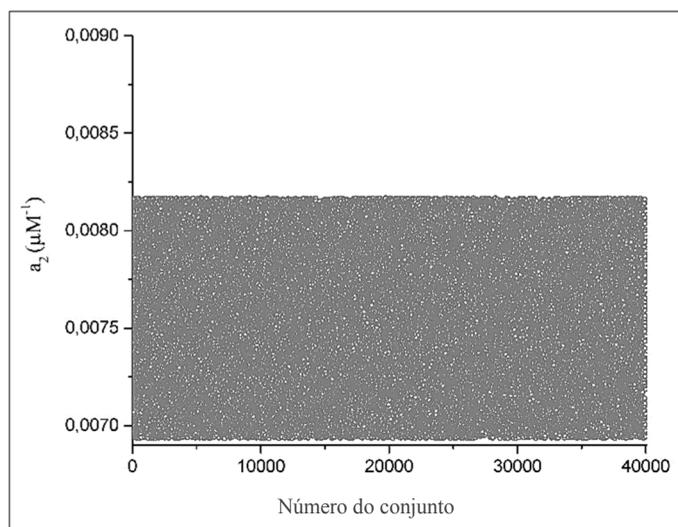
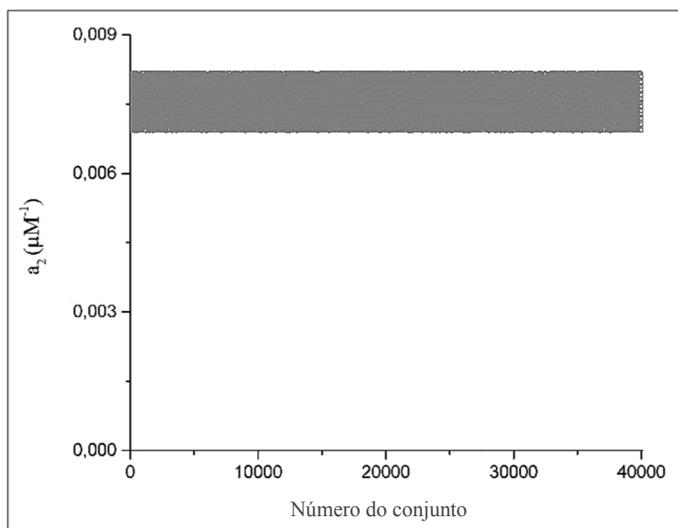
Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

Figura 43 - Valores gerados aleatoriamente para o coeficiente intermediário da curva de calibração do modelo a_1 , mostrado em diferentes escalas.



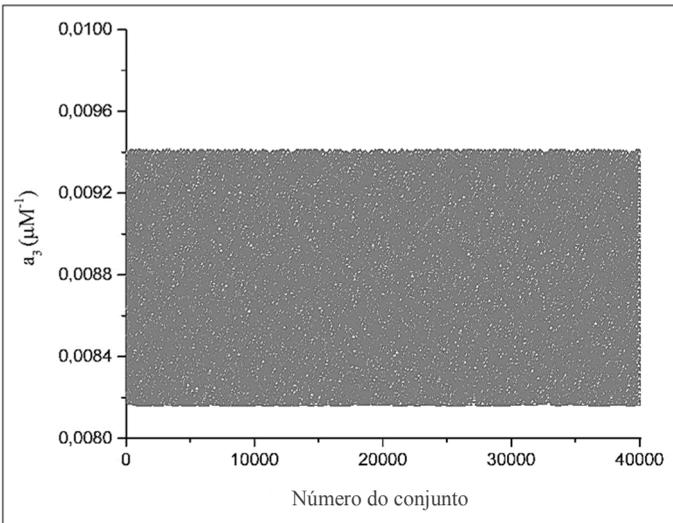
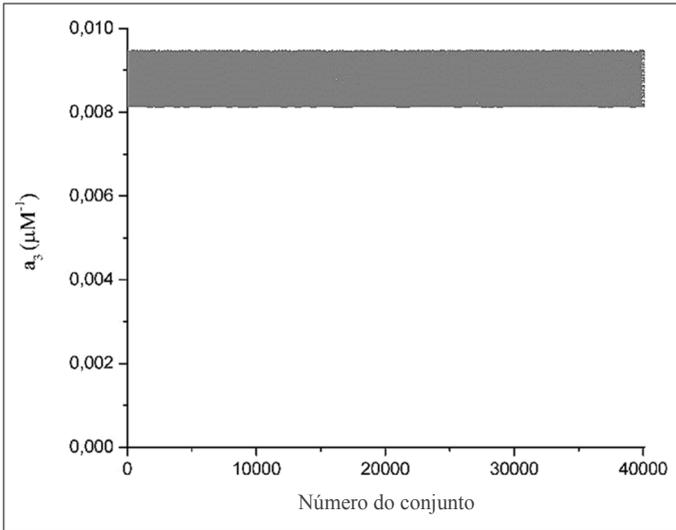
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 44 - Valores gerados aleatoriamente para o coeficiente intermediário da curva de calibração do modelo a_2 , mostrado em diferentes escalas.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 45 - Valores gerados aleatoriamente para o coeficiente intermediário da curva de calibração do modelo a_3 , mostrado em diferentes escalas.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

As Figuras 43 a 45 apresentam todos os coeficientes intermediários das curvas de calibração (a_1 , a_2 e a_3) e para ser melhores visualizados foram mostrados em diferentes escalas (duas vezes cada um). A única restrição na geração desses valores aleatórios é o ordenamento linear dos coeficientes intermediários das curvas de calibração.

A partir das Figuras 39 a 45 é possível verificar que os parâmetros se distribuem sem regiões preferenciais no espaço de busca escolhido, o que era o esperado, uma vez que se utilizou uma distribuição equiprovável para sua seleção.

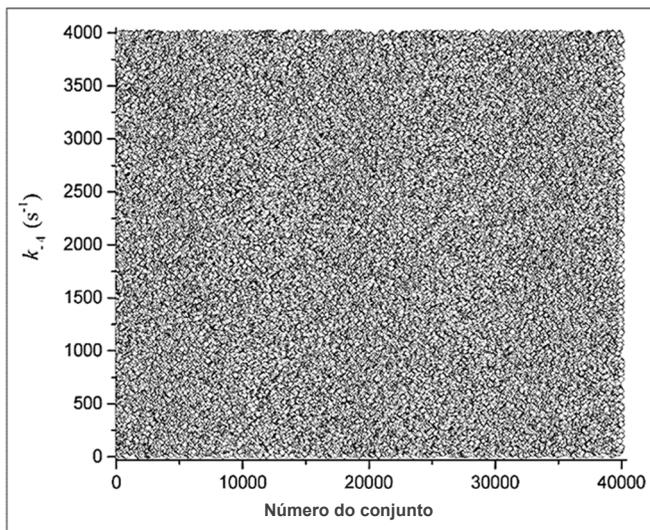
É importante ressaltar que os quarenta mil conjuntos de parâmetros gerados podem ser analisados antes que se execute a busca unidirecional. Uma das análises presumíveis é com relação ao erro obtido para cada um deles. A Tabela 5 explica detalhadamente a quantidade de conjuntos que ficam abaixo ou igual a determinados valores de erros. Todos os quarenta mil conjuntos conduzem a valores de erros menores ou iguais a 22,10, sendo que somente um deles atingiu o valor menor ou igual a 0,03 e abaixo ou igual a 0,1 obtém-se 199 conjuntos.

Tabela 5 - Quantidade de conjuntos que resultam em erros abaixo de determinados valores.

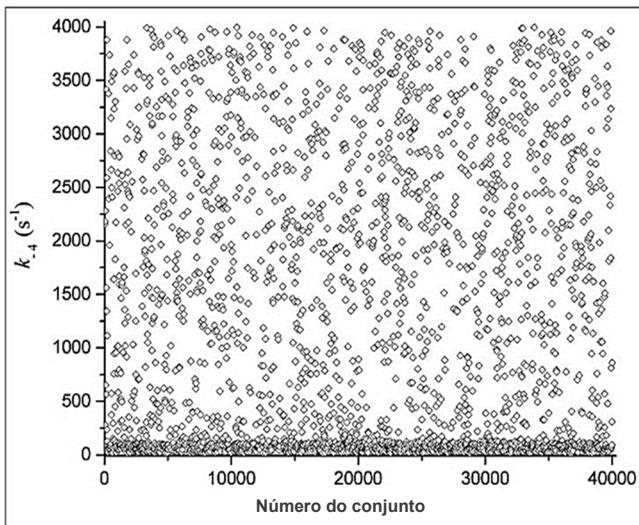
Valor do erro	Quantidade de conjuntos que resultam em erros abaixo do valor ao lado especificado
22,10	40.000
2,50	39.779
1,00	2.627
0,50	1.120
0,10	199
0,05	17
0,04	10
0,03	1

Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

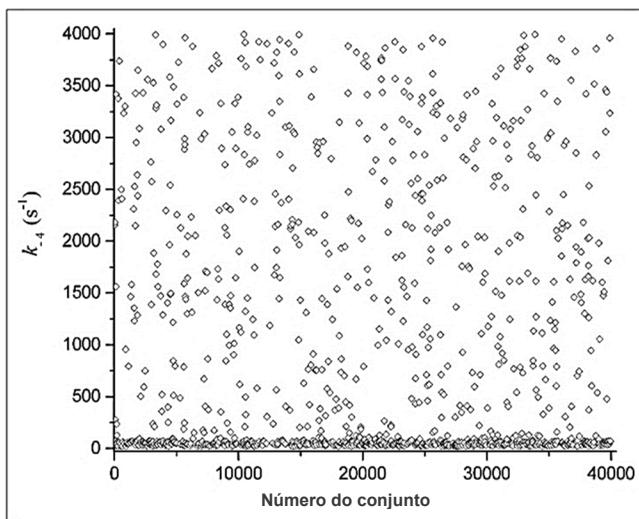
Um dos aspectos interessantes é observar os valores dos parâmetros das constantes cinéticas k_{-4} , k_{-3} , k_{-2} e k_{-1} , quando considerados segundo os erros obtidos (2,5; 1,0; 0,5 e 0,1) após sua aplicação no modelo, conforme representados nas Figuras 46 a 61.

Figura 46 - Valor da constante cinética k_{-4} para erro igual ou abaixo de 2,5.

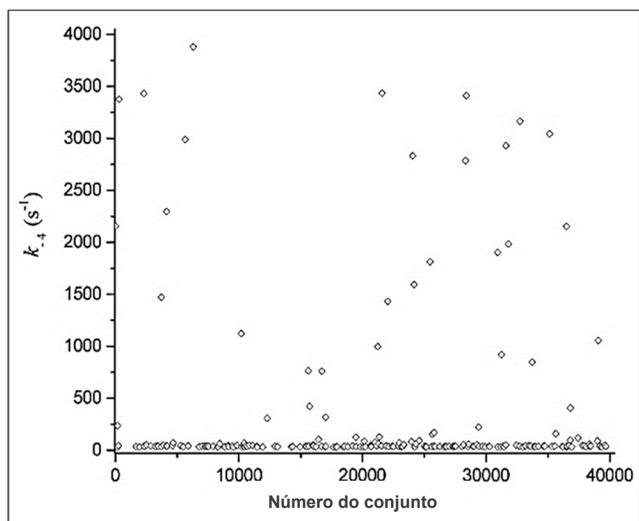
Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

Figura 47 - Valor da constante cinética k_{-4} para erro igual ou abaixo de 1,0.

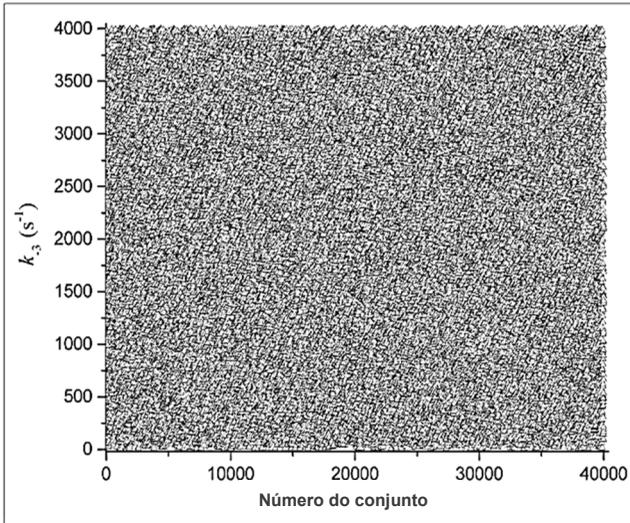
Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

Figura 48 - Valor da constante cinética k_{-4} para erro igual ou abaixo de 0,5.

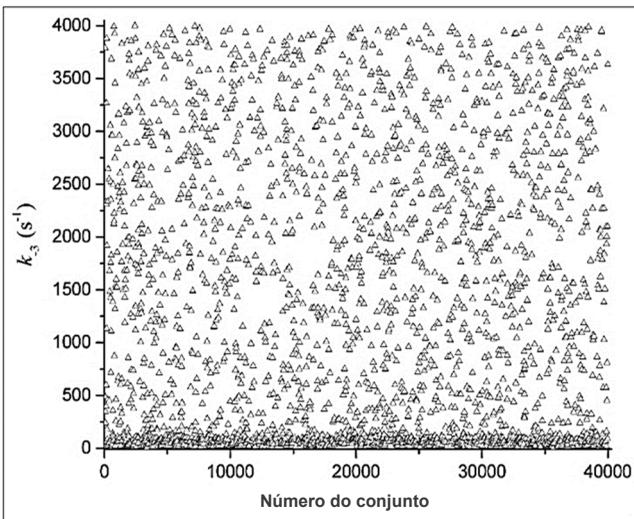
Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

Figura 49 - Valor da constante cinética k_{-4} para erro igual ou abaixo de 0,1.

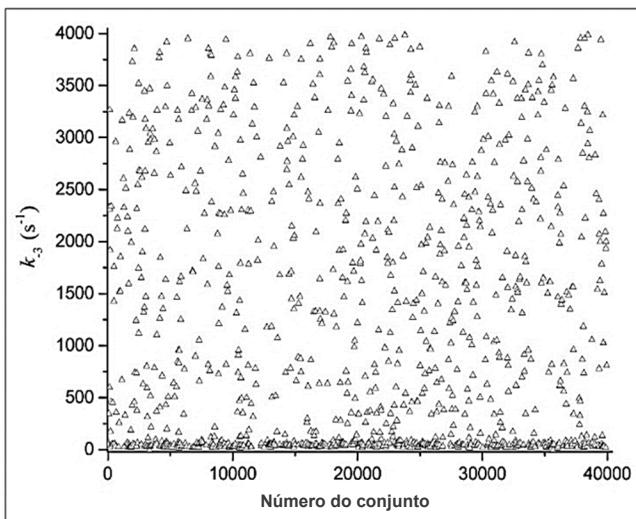
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 50 - Valor da constante cinética k_{-3} para erro igual ou abaixo de 2,5.

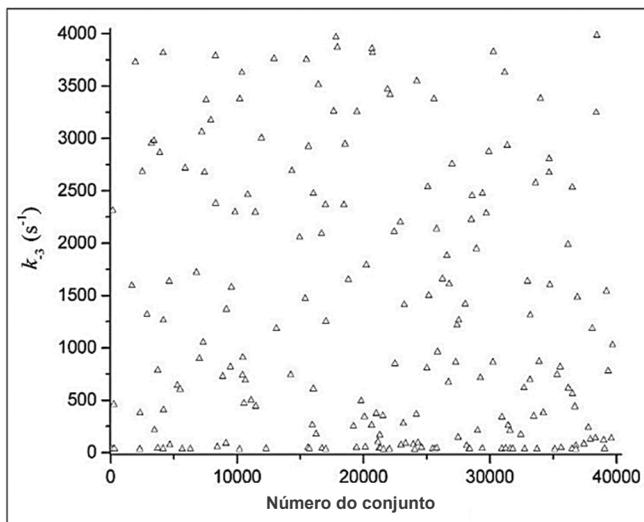
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 51 - Valor da constante cinética k_{-3} para erro igual ou abaixo de 1,0.

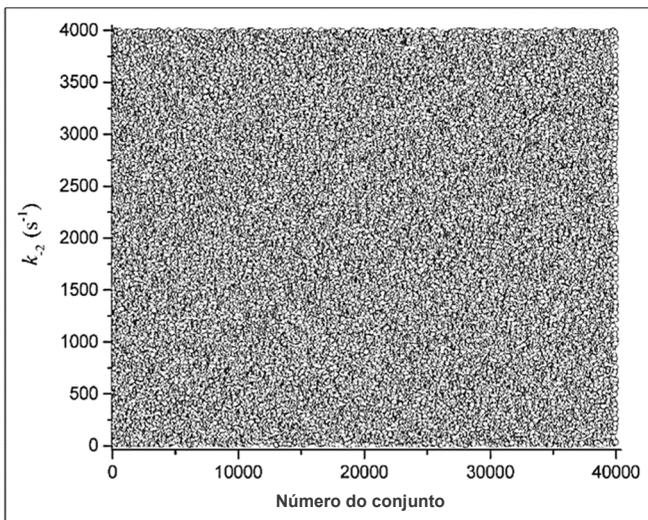
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 52 - Valor da constante cinética k_{-3} para erro igual ou abaixo de 0,5.

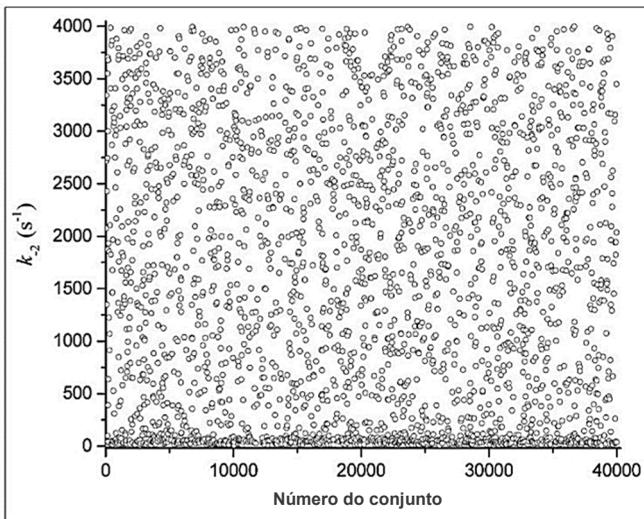
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 53 - Valor da constante cinética k_{-3} para erro igual ou abaixo de 0,1.

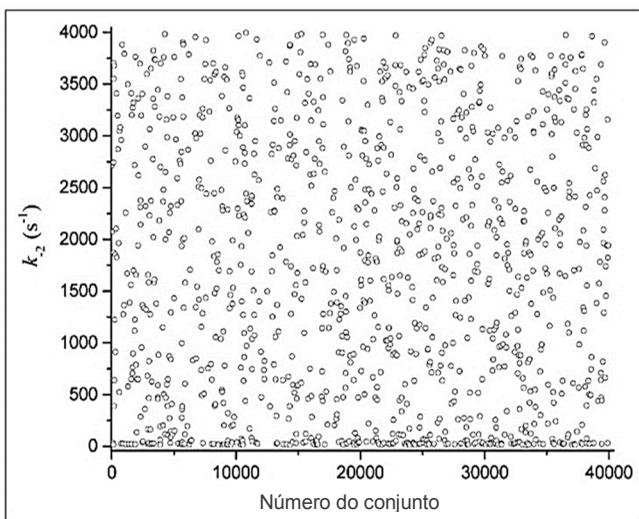
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 54 - Valor da constante cinética k_{-2} para erro igual ou abaixo 2,5.

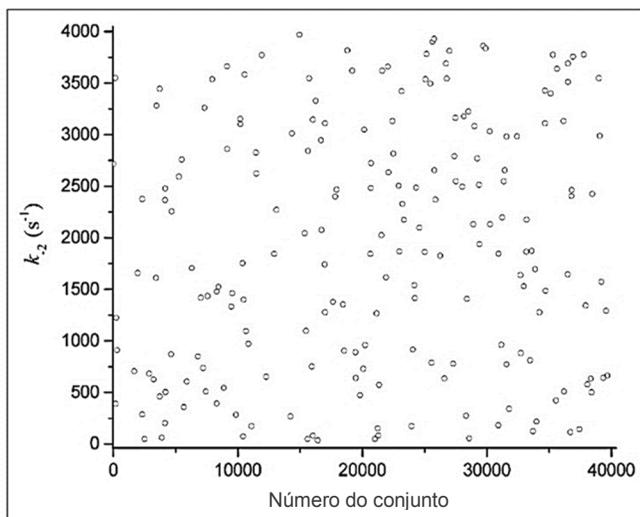
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 55 - Valor da constante cinética k_{-2} para erro igual ou abaixo 1,0.

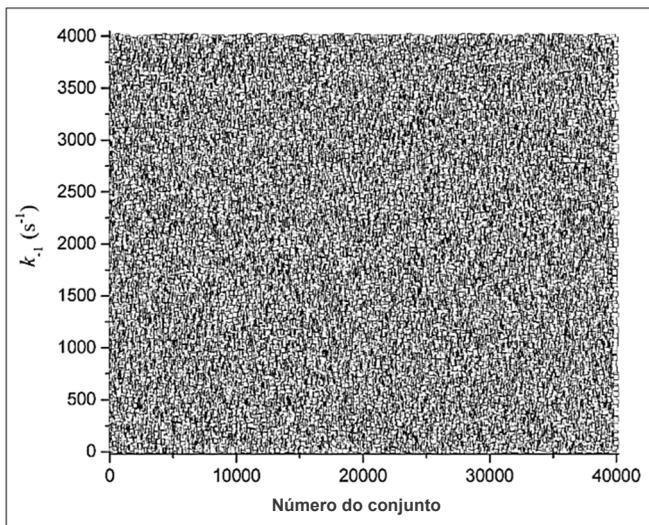
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 56 - Valor da constante cinética k_{-2} para erro igual ou abaixo 0,5.

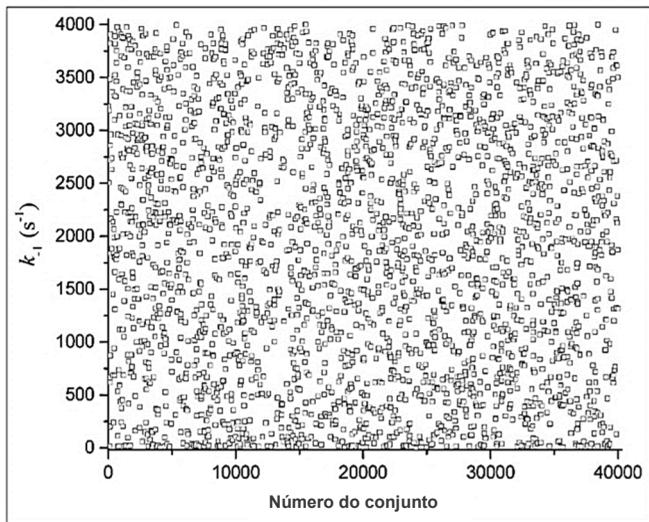
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 57 - Valor da constante cinética k_{-2} para erro igual ou abaixo 0,1.

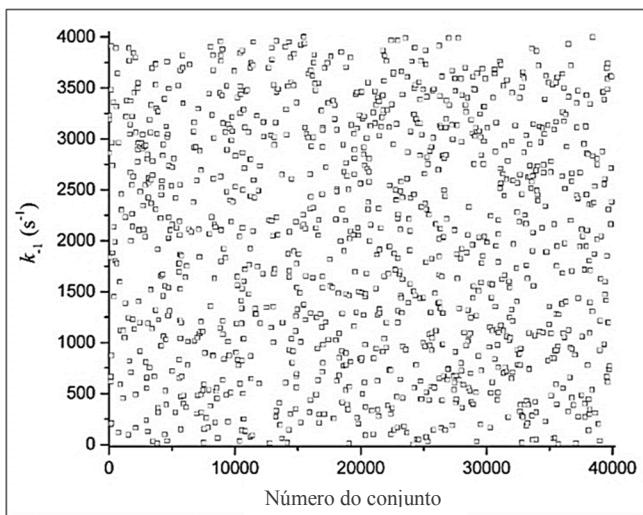
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 58 - Valor da constante cinética k_{-1} para erro igual ou abaixo 2,5.

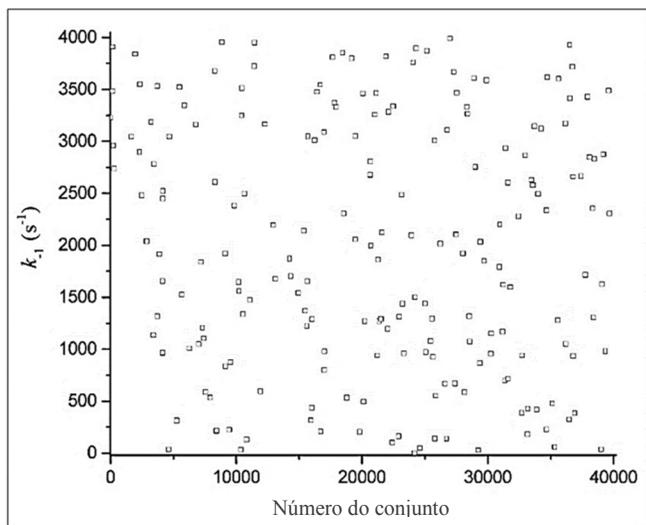
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 59 - Valor da constante cinética k_{-1} para erro igual ou abaixo 1,0.

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 60 - Valor da constante cinética k_{-1} para erro igual ou abaixo 0,5.

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

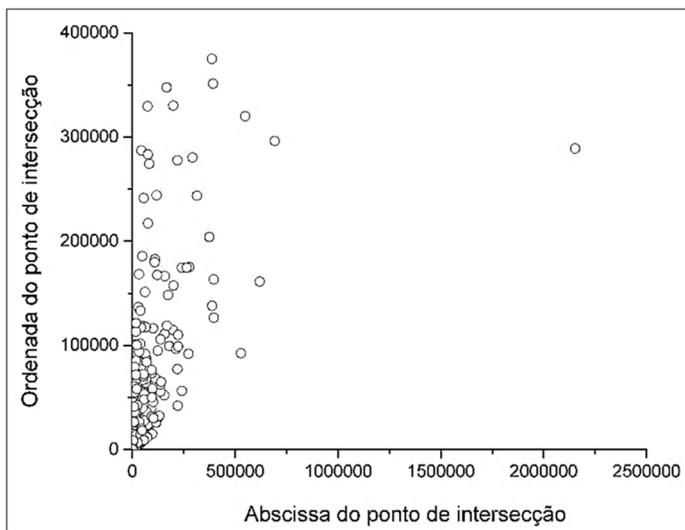
Figura 61 - Valor da constante cinética k_{-1} para erro igual ou abaixo 0,1.

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Nas Figuras 46 a 61 podem ser observados os valores de todas as constantes cinéticas para erros iguais ou abaixo de 2,5; 1,0; 0,5 e 0,1, sendo que em alguns parâmetros é possível verificar uma concentração em determinada região a partir de erro menor ou igual a 1,0. É interessante destacar que o parâmetro k_{-4} apresenta-se mais concentrado em comparação com os outros (k_{-3} , k_{-2} , k_{-1}), ou seja, o parâmetro que controla a reação mais lenta, segundo a hipótese da cooperatividade (YONETANI; KANAORI, 2013). Em oposição, o parâmetro k_{-1} é o mais disperso, o que também é coerente com essa teoria, uma vez que os parâmetros que controlam reações mais rápidas influenciam menos no resultado final (GIBSON, 1970 e 2004).

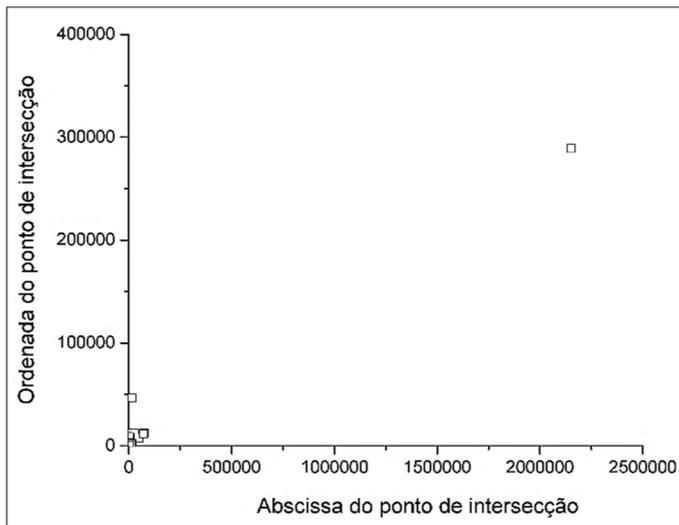
Uma outra maneira de avaliar os parâmetros é uni-los em apenas um gráfico por meio de um espaço de fase, segundo descrito na metodologia. O espaço de fase para os conjuntos de parâmetros que resultam em erros iguais ou abaixo de 2,5; 1,0; 0,5 e 0,1 estão representados em mesma escala nas Figuras 62 a 65. É plausível concluir, a partir da análise da Figura 62 a 65, que parâmetros os quais resultam em erros mais baixos apresentam um espaço de fase menos disperso. Esse tipo de avaliação será melhor discutido quando os resultados da busca unidirecional forem expressos.

Figura 62 - Espaço de fase para valor com erro abaixo de 2,5.



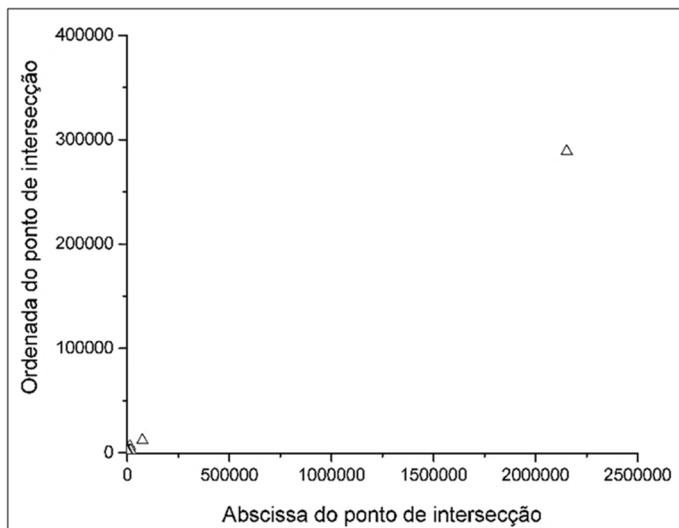
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 63 - Espaço de fase para valor com erro abaixo de 1,0.



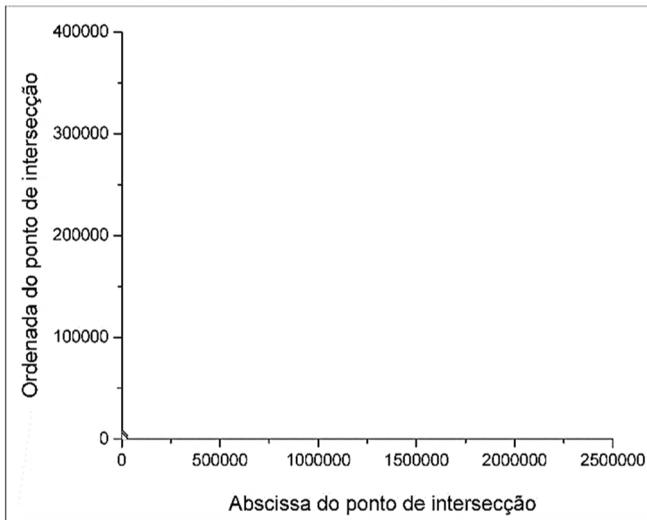
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 64 - Espaço de fase para valor com erro abaixo 0,5.



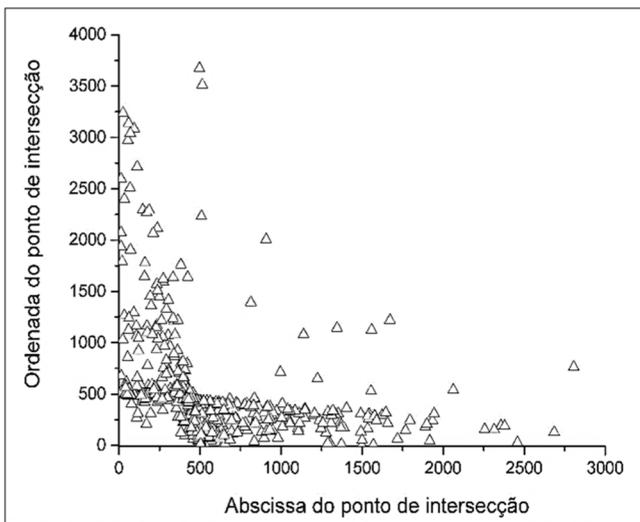
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 65 - Espaço de fase para valor com erro abaixo de 0,1.



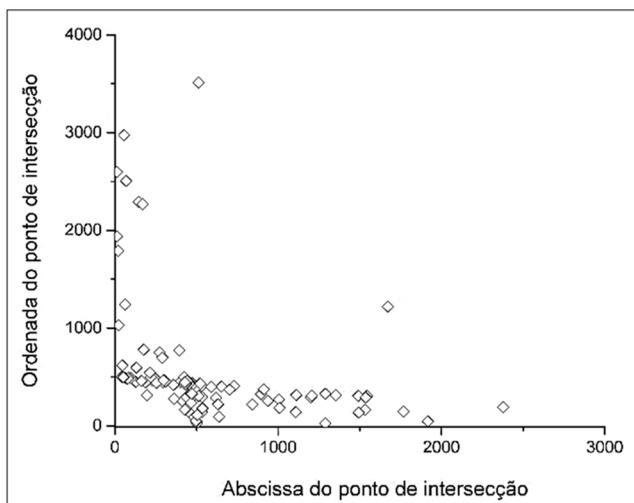
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 66 - Espaço de fase em escala ampliada para valores de erro igual ou abaixo de 0,5.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 67 - Espaço de fase em escala ampliada para valores de erro igual ou abaixo de 0,1.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

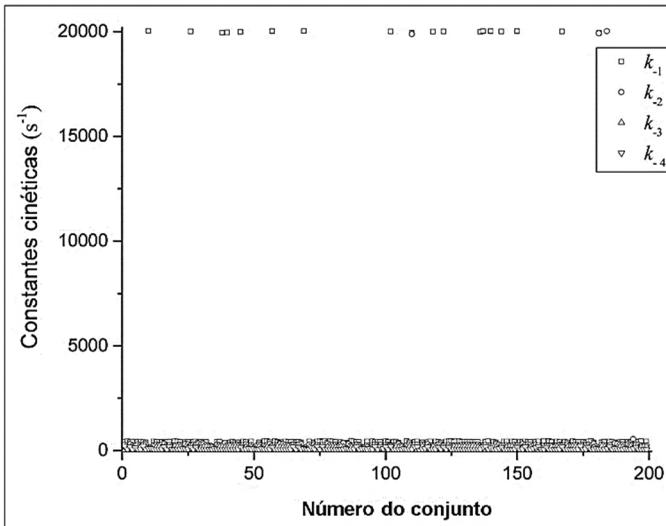
Com o objetivo de favorecer a visualização da diminuição de dispersão, o espaço de fase é demonstrado nas Figuras 66 e 67 em uma escala ampliada para os conjuntos de parâmetros que resultam, respectivamente, em erros iguais ou abaixo de 0,5 e 0,1.

Depois de analisar todos os conjuntos inicialmente gerados, optou-se por efetuar a busca unidirecional somente com aqueles conjuntos que obtiveram erro menor ou igual a 0,1. Essa escolha se deu, principalmente, em função do esforço computacional requisitado. Após essa decisão, executou-se a busca unidirecional para os 199 conjuntos que satisfazem essa condição (vide Tabela 5 da página 99).

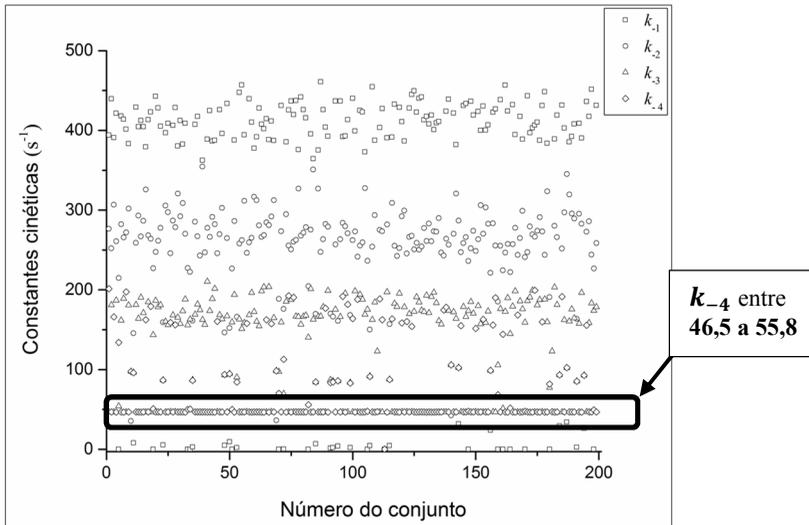
Posteriormente, com os resultados dos 199 conjuntos de novos parâmetros adquiridos pela busca unidirecional, os valores foram processados graficamente e podem ser observados nas Figuras 68 (constantes cinéticas) e 69 (coeficientes intermediários das curvas de calibração). Na Figura 68a estão representadas as constantes cinéticas (k_{-4} , k_{-3} , k_{-2} , k_{-1}) de todos os conjuntos. A fim de melhor visualizar os valores desses parâmetros, a Figura 68b foi construída removendo-se os 3 pontos de k_{-2} e os 18 de k_{-1} que assumem valores da ordem de 20.000, o que é inconsistente com o problema como um todo.

Figura 68 - Valores das constantes cinéticas após a execução da busca unidirecional: a) todas as constantes cinéticas com valores até 20.000 e b) todas as constantes cinéticas com valores inferiores a 500.

a)



b)



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

É interessante analisar, na Figura 68, a relação entre as constantes cinéticas obtidas a partir da busca unidirecional. Mesmo sem a utilização de restrições, constata-se que os menores erros são encontrados, em sua maioria, quando a seguinte ordem é seguida: $k_{-4} < k_{-3} < k_{-2} < k_{-1}$. Esse resultado está em acordo com o princípio da cooperatividade (YONETANI; KANAORI, 2013) e é relevante explicar que ele surgiu naturalmente a partir de números gerados aleatoriamente.

Outro aspecto importante que pode ser extraído dos resultados é que 67,3% dos menores erros estão associados à valores de k_{-4} entre 46,5 e 55,8. Esses valores estão próximos ao valor da constante cinética do modelo de pseudo primeira ordem para essa reação, $46,4 \text{ s}^{-1}$ (SOUZA, 2016), o que é coerente, uma vez que esta é a etapa limitante da reação.

Na Figura 70 está representado o espaço de fase com todos os resultados obtidos após a execução da busca unidirecional e na Figura 71, por sua vez caracteriza apenas o espaço de fase que apresentam valores para k_{-4} entre 46,5 e 55,8.

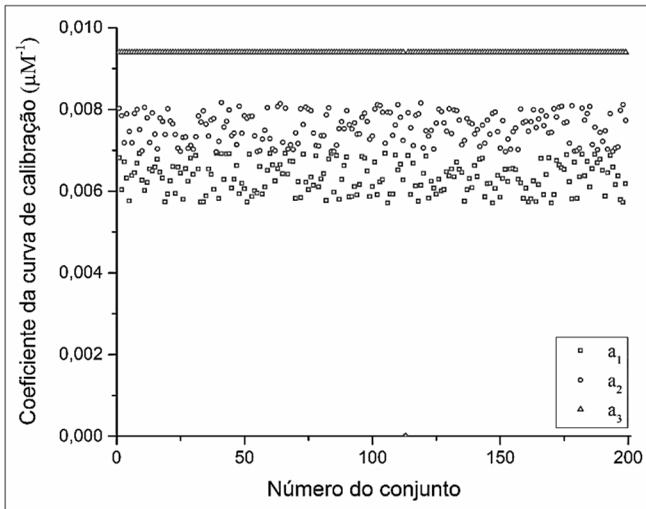
É possível perceber, a partir da análise da Figura 71, que existe uma região de máxima concentração dos pontos, que aqui será denominado região viável, ou seja, é a região formada pelos conjuntos de constantes cinéticas que expõem erros aceitáveis e se encontram em acordo com o princípio de cooperatividade.

Outro aspecto fundamental a ser analisado são os erros atingidos antes (Figura 72a) e após (Figura 72b) a realização da busca unidirecional. Apesar da busca ser capaz de reduzir o erro para valores de até 0,0067, os valores que estão abaixo de 0,028 são inconsistentes com a física do problema, uma vez que não satisfazem a hipótese de reação completa. Deste modo, é importante considerar que parece existir uma região mínima de erro para o problema, cuja média é 0,029.

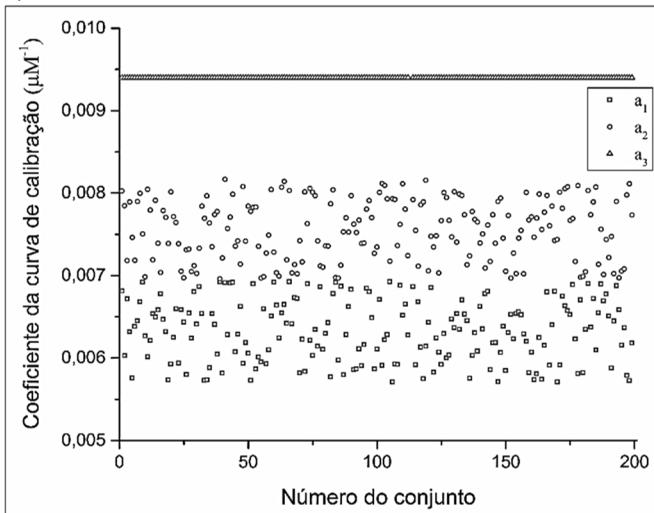
Vale ressaltar que os conjuntos que não satisfazem a hipótese de reação completa são aqueles que apresentam valores de k_{-1} inferiores a 50 s^{-1} , conforme pode ser observado na Figura 73.

Figura 69 - Valores dos coeficientes intermediários das curvas de calibração após a execução da busca unidirecional: a) todos os coeficientes angulares da curva de calibração com valores até 0,01 e b) mesmo gráfico ampliado.

a)

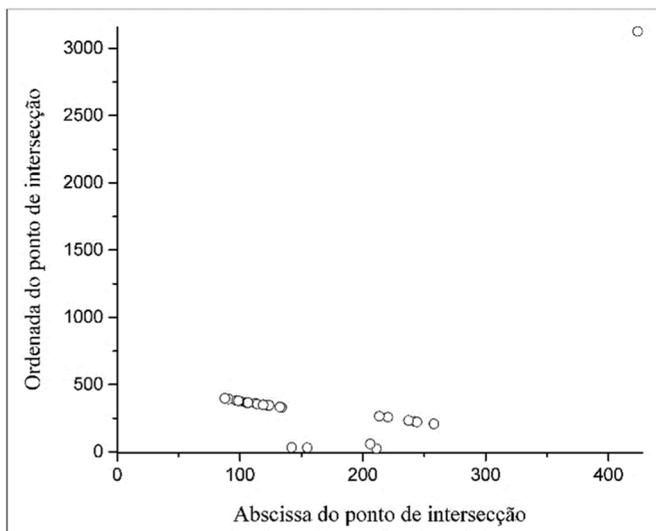


b)



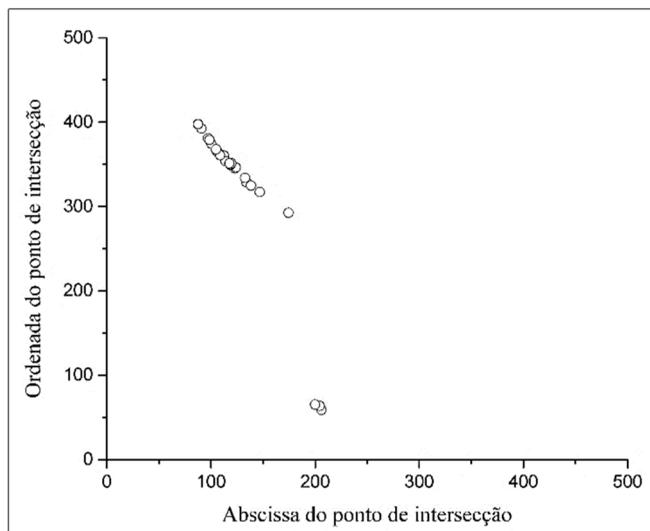
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 70 - Espaço de fase de todos os pontos gerados na busca unidirecional.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

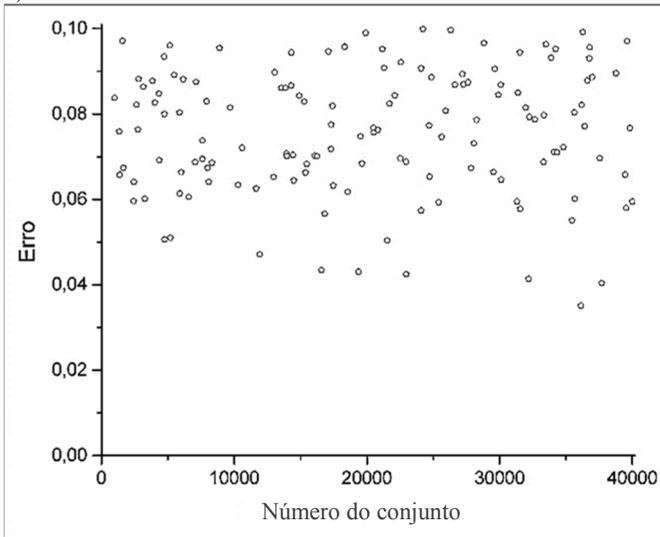
Figura 71 - Espaço de fase dos pontos cujo valor de k_{-4} está entre 46,5 e 55,8.



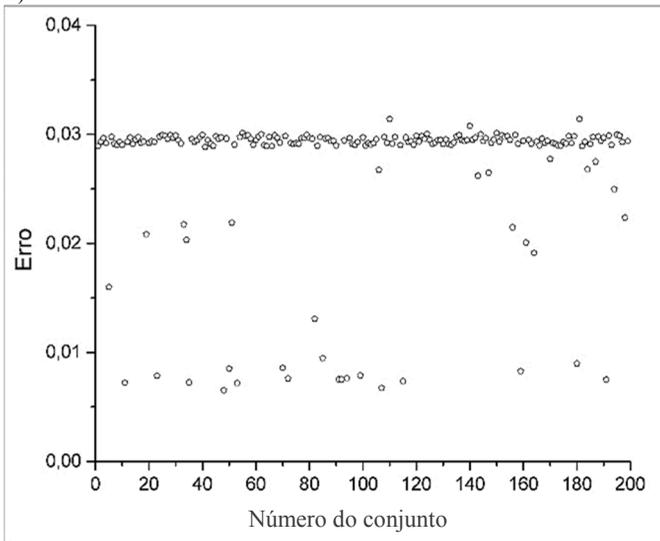
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 72 - Erro antes (a) e após (b) a realização da busca unidirecional.

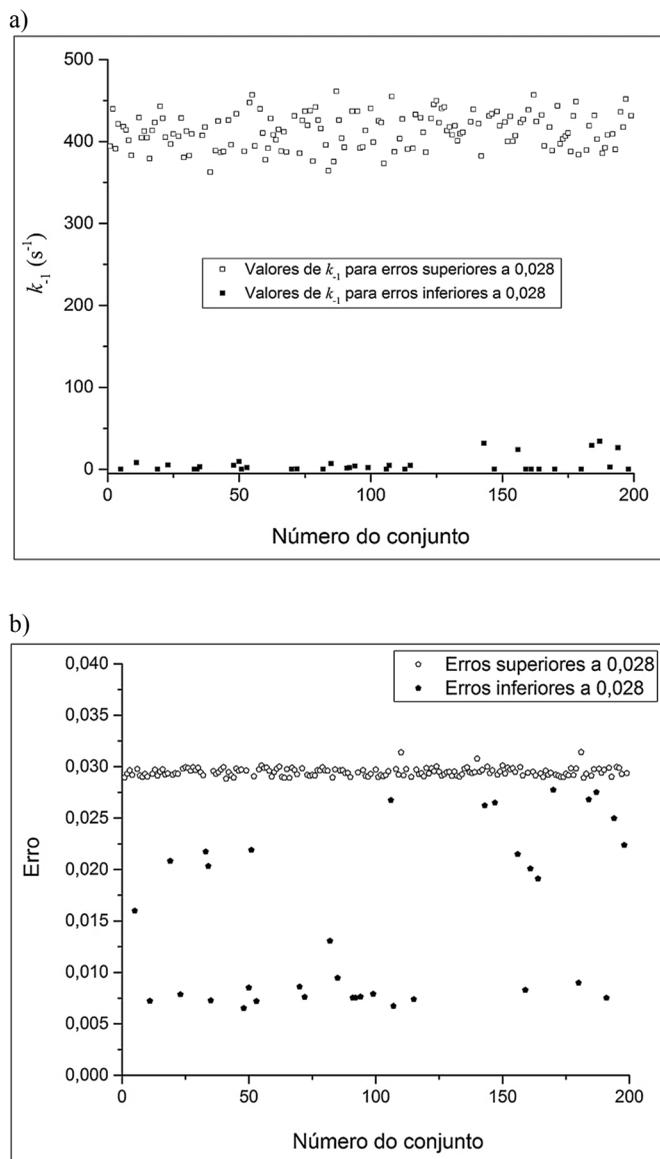
a)



b)



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 73 - Valores de a) k_{-1} e do b) erro após a realização da busca unidirecional.

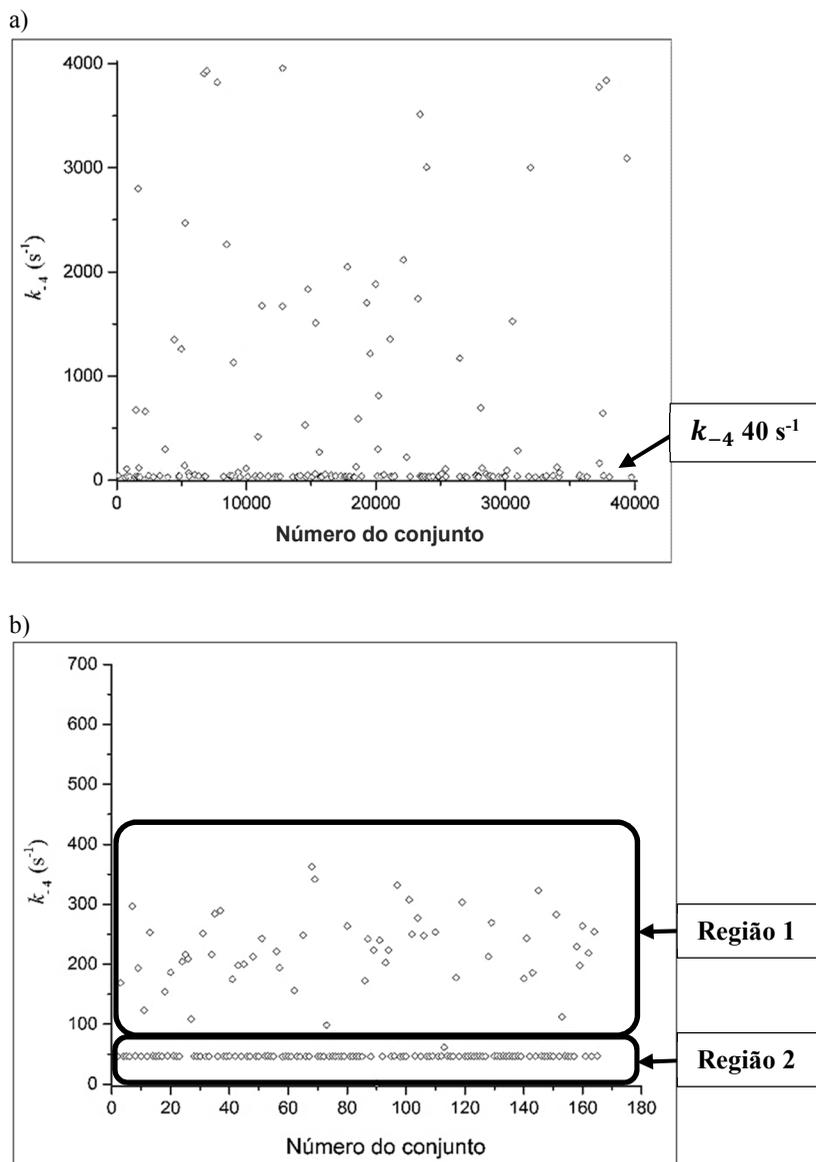
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Como única restrição de todo o problema até o momento tinha sido a ordenação dos coeficientes das curvas de calibração. A fim de analisar a influência dessa decisão nos resultados obtidos, essa restrição foi eliminada. As Figuras 74 a 80 apresentam os valores iniciais dos parâmetros do modelo utilizados na busca direcional (a) e após a aplicação desse método de otimização (b), foram excluídos os valores maiores que 1000, tal como realizado anteriormente por serem inconsistentes com a física do problema analisado. Os valores iniciais foram gerados de forma análoga à situação anterior: quarenta mil conjuntos foram criados aleatoriamente e selecionaram-se aqueles que obtiveram erros inferiores ou iguais a 0,1. O número de conjuntos que atendeu a esse critério foi 165.

Assim, como no programa que incorporava a restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração, é significativo avaliar que para valores de erro igual ou abaixo de 0,1 há uma concentração dos valores de k_{-4} em torno de 40 s^{-1} , antes mesmo da realização da busca unidirecional, conforme pode ser identificado no gráfico da Figura 74a.

Além disso, nas Figuras 74 a 77 percebe-se claramente que depois da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração, os valores das constantes cinéticas encontram-se divididos em duas regiões bem distintas.

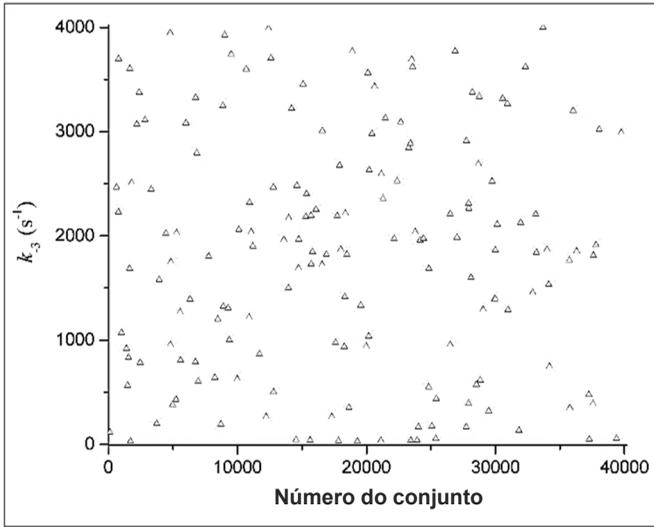
Figura 74 - Valores de k_{-4} antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração.



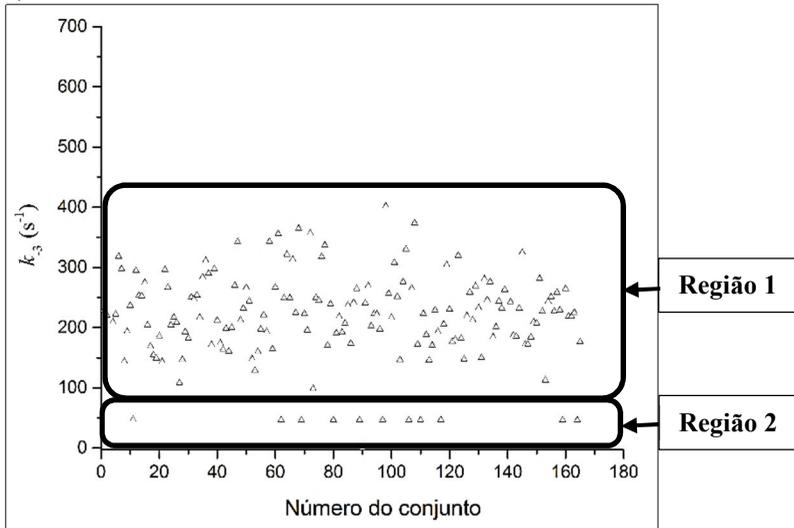
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 75 - Valores de k_{-3} antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração.

a)

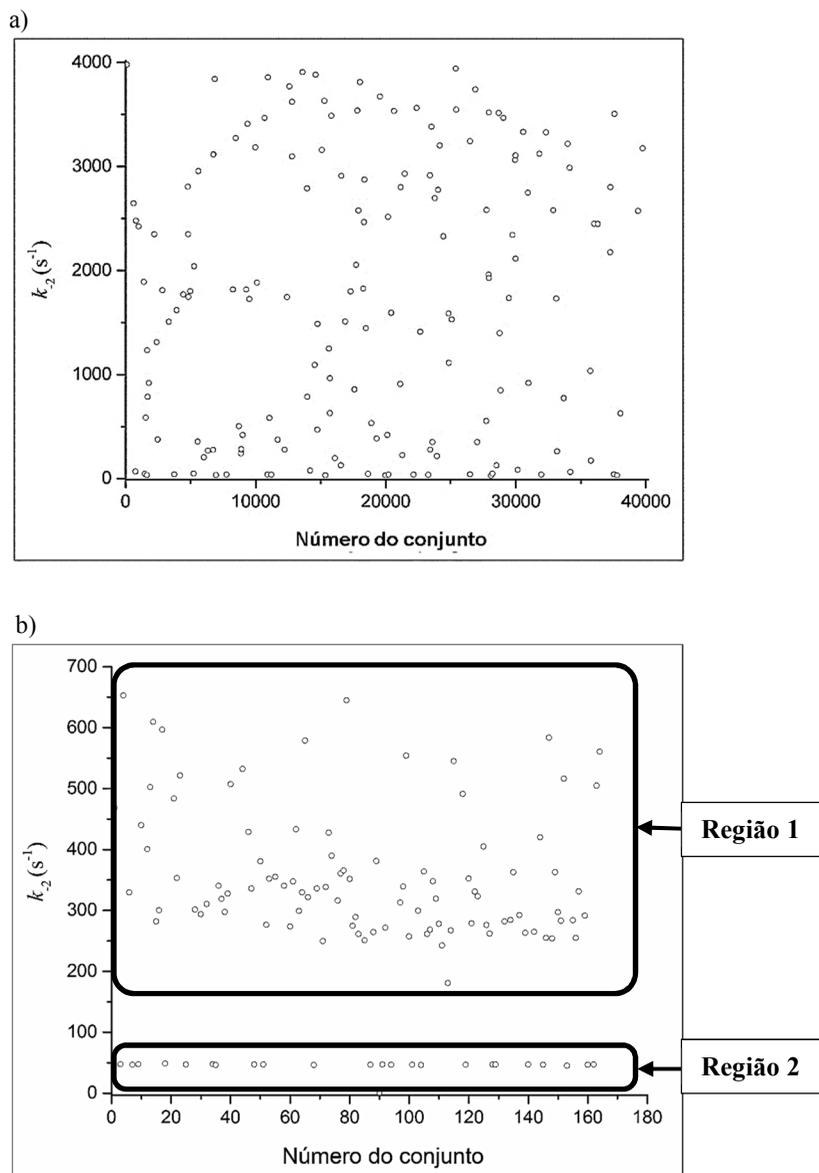


b)



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

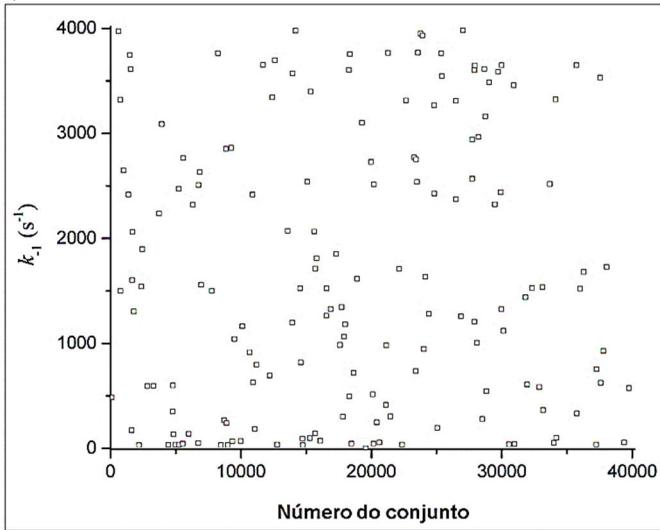
Figura 76 - Valores de k_{-2} antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração.



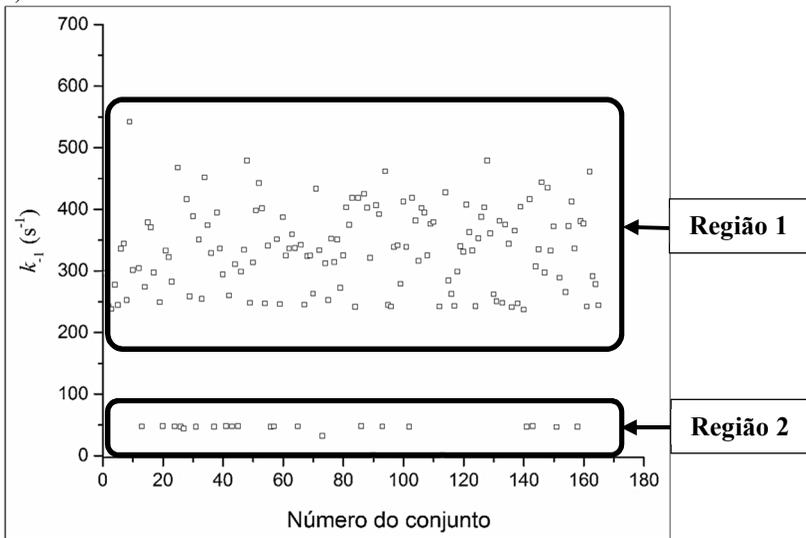
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 77 - Valores de k_{-1} antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração.

a)

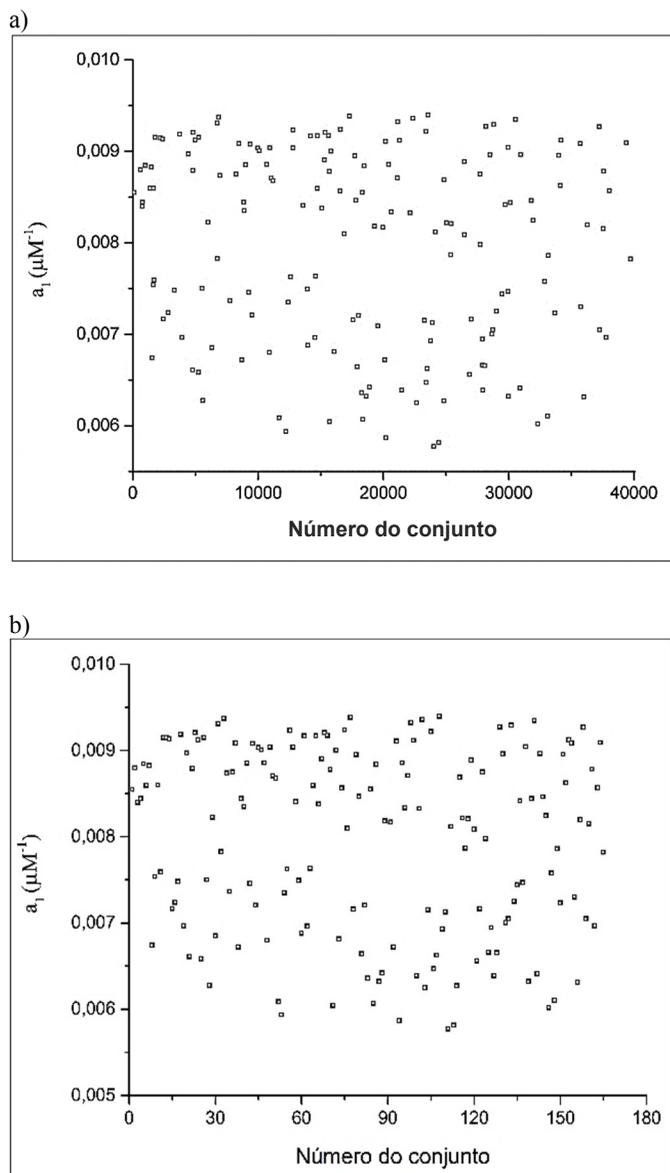


b)



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

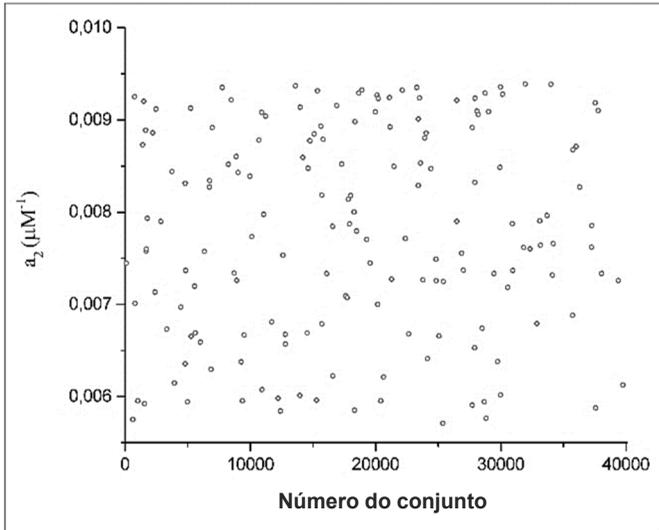
Figura 78 - Valores de a_1 antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração.



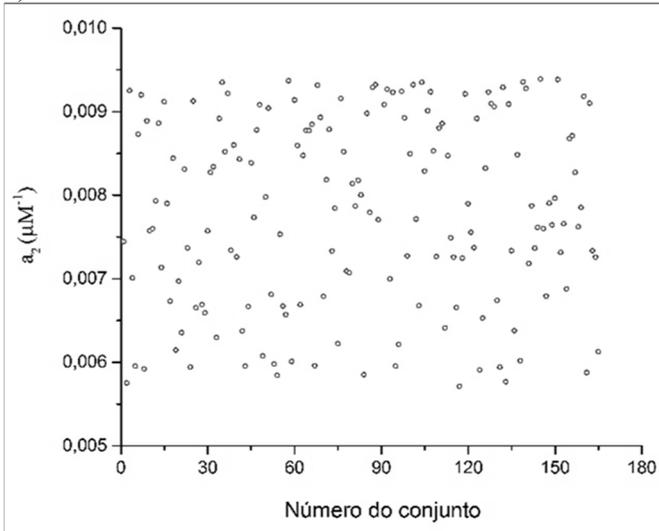
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 79 - Valores de a_2 antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes das curvas de calibração.

a)

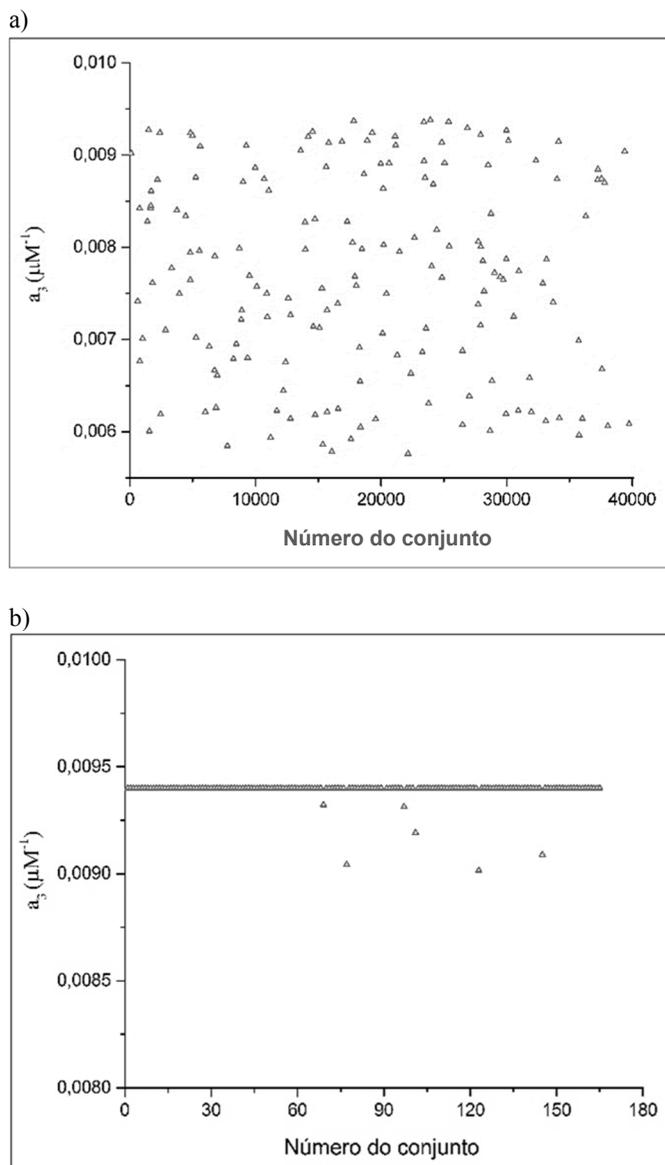


b)



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

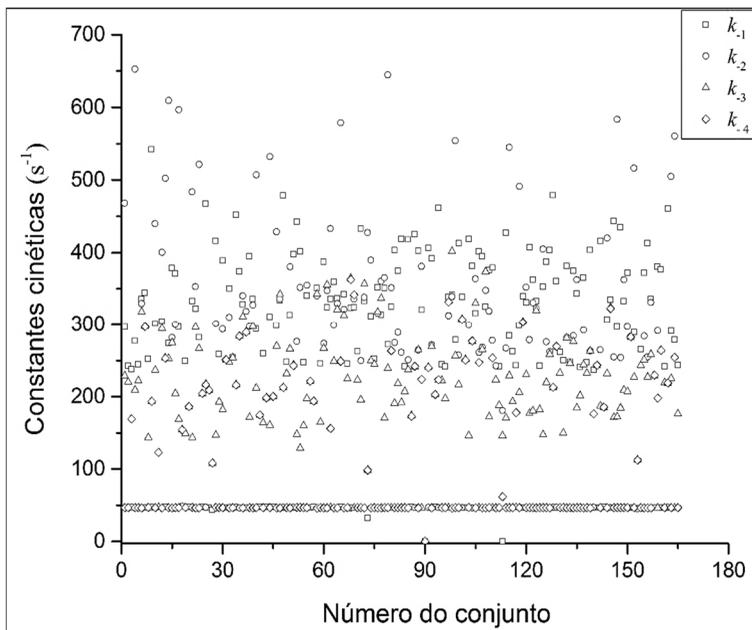
Figura 80 - Valores de a_3 antes (a) e depois (b) da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes das curvas de calibração.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Outro ponto a ser analisado é se a ordem crescente das constantes cinéticas está sendo atendida, esta avaliação está demonstrada na Figura 81. Como a partir do gráfico da Figura 81 fica difícil uma conclusão a respeito do ordenamento dos parâmetros das constantes cinéticas, para uma avaliação mais apropriada, calculou-se as médias desses parâmetros, assim como a quantidade de pontos que deram origem a cada um deles, conforme representado na Tabela 6.

Figura 81 - Valores das constantes cinéticas após a realização da busca unidirecional sem restrição nos coeficientes das curvas de calibração.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Na Tabela 6 estão expressos todos os valores calculados, assim como a quantidade de pontos de cada um dos parâmetros cinéticos para uma melhor comparação, e observa-se que as constantes k_{-1} , k_{-2} e k_{-3} concentram-se prioritariamente na **Região 1**. O k_{-4} , por sua vez, tem uma presença maior na **Região 2**. Constatando esse fato e baseado nos valores médios das constantes cinéticas, é provável concluir que, majoritariamente, $k_{-4} < k_{-3} < k_{-2} \cong k_{-1}$. Deste modo, o resultado

obtido sem a restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração é semelhante ao que considera a restrição, com exceção da relação entre k_{-1} e k_{-2} .

Tabela 6 - Médias calculadas para as duas regiões (Região 1 e Região 2) de todas as constantes cinéticas.

	k_{-4} (s ⁻¹)	Número de pontos	k_{-3} (s ⁻¹)	Número de pontos
Região 1	227,14	55	230,00	150
Região 2	46,63	109	46,54	11

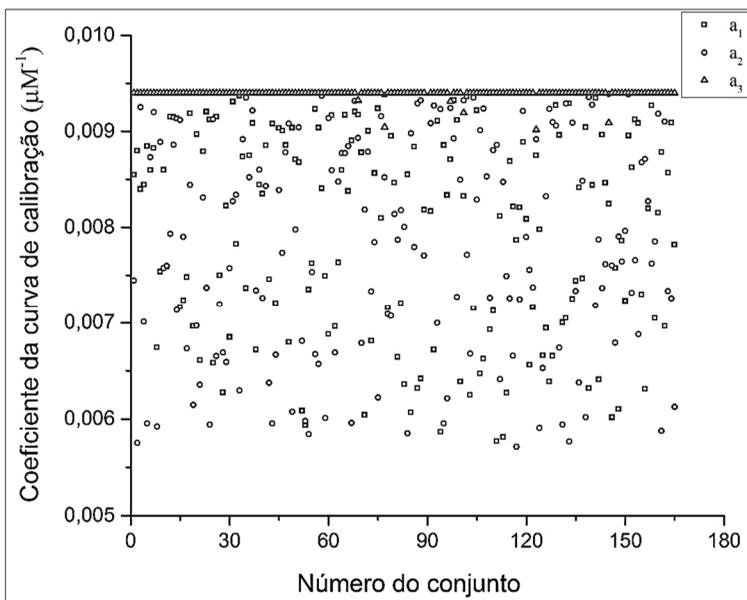
	k_{-2} (s ⁻¹)	Número de pontos	k_{-1} (s ⁻¹)	Número de pontos
Região 1	359,30	96	341,25	139
Região 2	46,84	23	46,23	21

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Como também não é possível visualizar claramente se a ordem crescente dos parâmetros está sendo correspondida, com relação aos coeficientes intermediários das curvas de calibração, foram calculados os valores médios e a relação obtida foi $a_1 = 0,0078 \mu\text{M}^{-1}$, $a_2 = 0,0075 \mu\text{M}^{-1}$ e $a_3 = 0,0094 \mu\text{M}^{-1}$.

Na Figura 82 estão mostrados os valores para os coeficientes intermediários das curvas de calibração após a realização da busca unidirecional sem restrição e verifica-se que esses parâmetros seguem o seguinte ordenamento em que $a_1 \cong a_2 < a_3$.

Figura 82 - Valores dos coeficientes intermediários das curvas de calibração após a realização da busca unidirecional sem restrição.

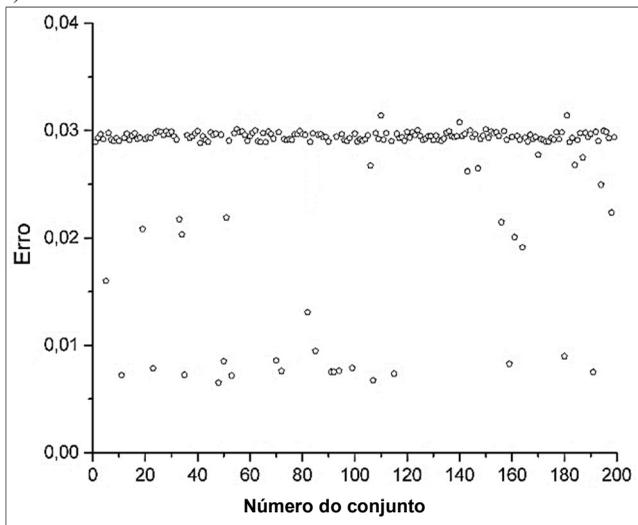


Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

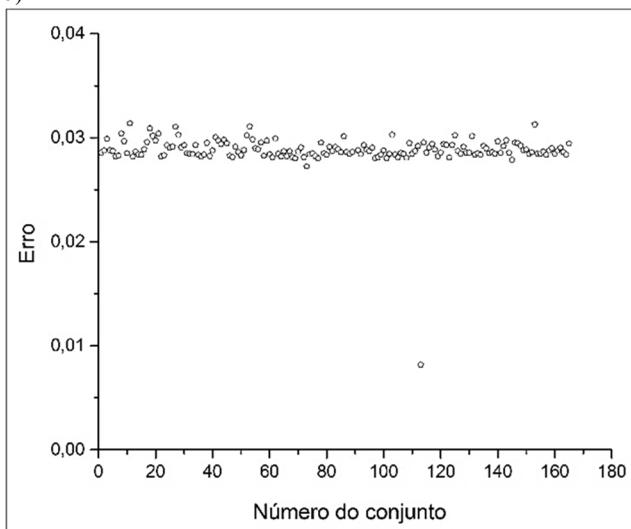
Com a intenção de se definir se os próximos passos serão com ou sem a utilização da restrição, na Figura 83 foi comparado o erro entre as duas opções (com ou sem restrição dos coeficientes intermediários das curvas de calibração). Como a ordem de grandeza do erro é semelhante nas duas situações e o uso da restrição conduziu a um ordenamento nas constantes cinéticas coerente com a hipótese da cooperatividade, por esse motivo optou-se por manter a restrição para as próximas análises.

Figura 83 - Erro após a busca unidirecional para o caso: a) com restrição e b) sem restrição.

a)



b)



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Depois de toda essa análise inicial, passou-se à utilização do algoritmo genético como método de otimização. A princípio o procedimento empregado foi o mesmo espaço de busca e a mesma restrição com relação aos coeficientes angulares do método de busca unidirecional. Para a probabilidade de mutação igual a 0,30, executou-se o programa 10 vezes em função das diferentes estimativas iniciais que podem ser geradas.

Uma vez que o erro é um dos critérios de escolha dos parâmetros, avaliou-se primeiramente o erro do melhor conjunto de cada um dos testes realizados para 10 diferentes execuções do programa. Para uma melhor visualização dos resultados, separou-se o gráfico dos erros em duas partes, dando origem aos gráficos das Figuras 84 e 85. É importante destacar que nos dez primeiros testes, nove das dez execuções já atingem valores de erro inferiores a 0,05. Outra evidência é que parece haver uma região limite para os valores do erro, com uma média de 0,032, o que também ocorre na busca unidirecional.

Figura 84 - Erro do melhor conjunto até o 20º teste para 10 execuções do programa

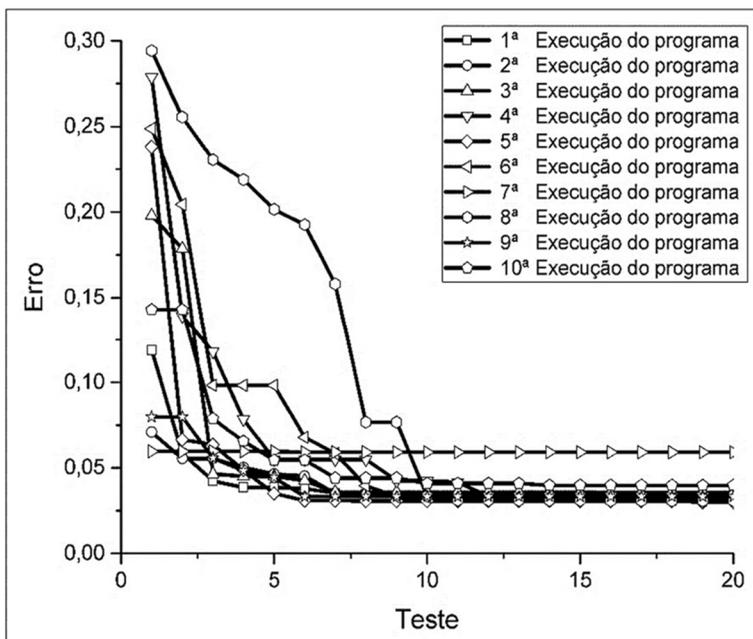
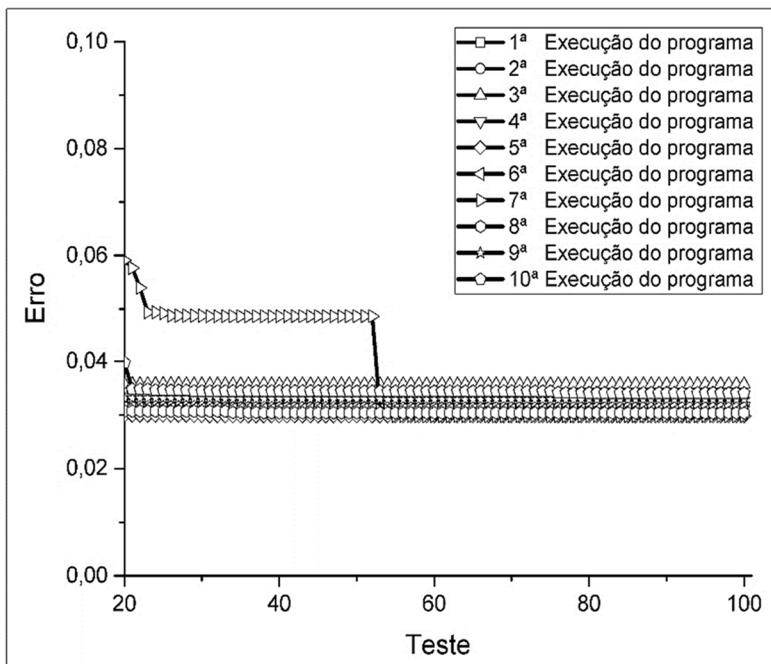


Figura 85- Erro do melhor conjunto desde o 20º teste até o 100º para 10 execuções do programa.

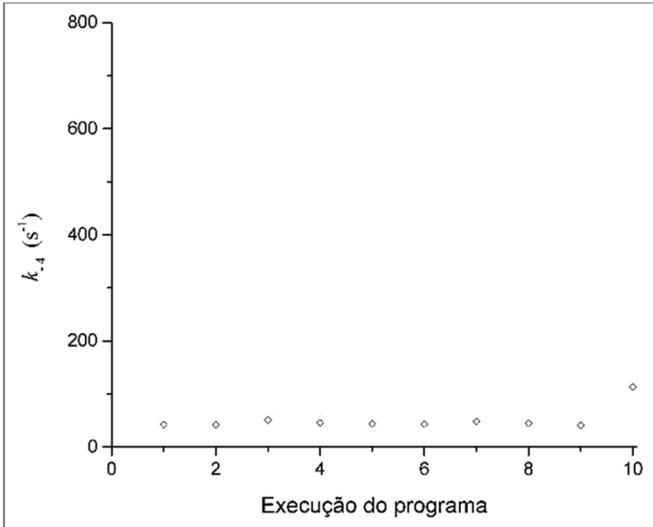


Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

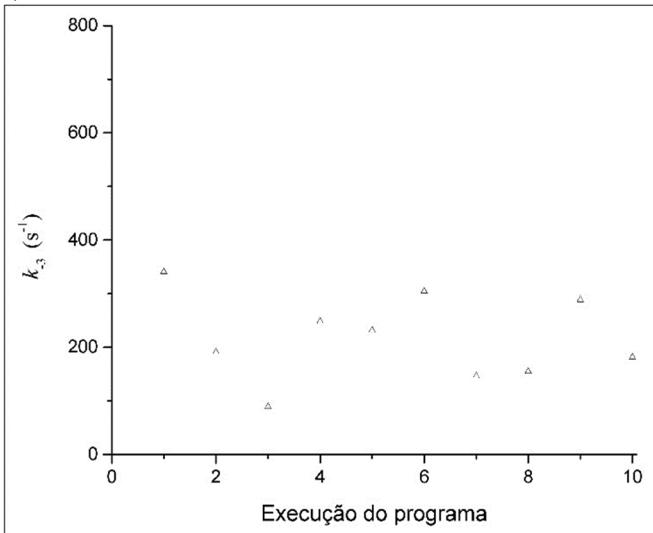
Com relação aos parâmetros do modelo, os valores obtidos pelo método de algoritmo genético podem ser visualizados nas Figuras 86 e 87 para todas as constantes cinéticas separadamente e na Figura 88 para todos os coeficientes intermediários das curvas de calibração em conjunto. Percebe-se que, assim como nos dois casos já analisados anteriormente, há uma dispersão maior dos valores adquiridos quanto menos limitante é a reação que um determinado parâmetro controla. Além disso, os valores de k_{-4} concentram-se por volta de 40 s^{-1} , próximo ao valor do modelo de pseudo primeira ordem.

Figura 86 - Valores das constantes cinéticas após a execução do método de algoritmo genético: a) k_{-4} ; b) k_{-3} .

a)



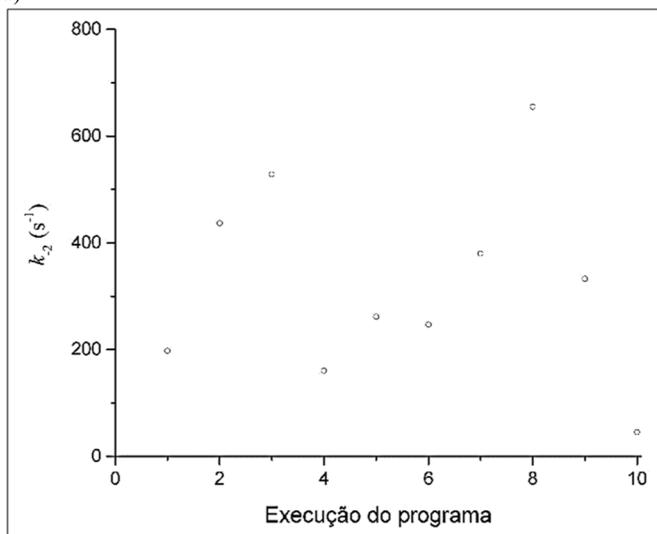
b)



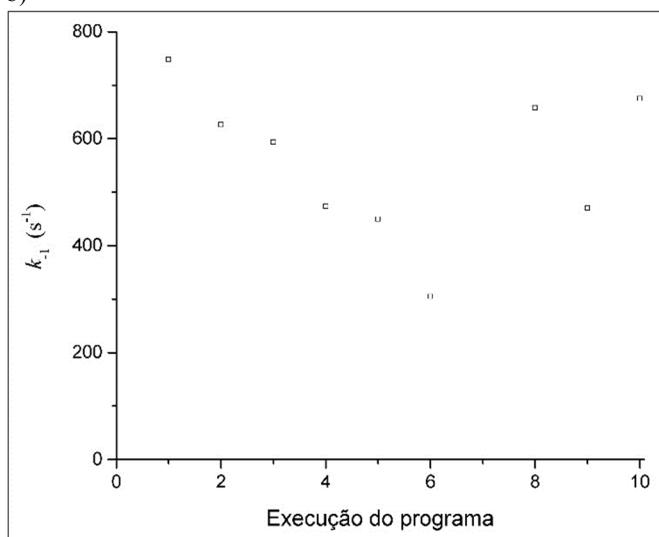
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 87 - Valores das constantes cinéticas após a execução do método de algoritmo genético: a) k_{-2} e b) k_{-1} .

a)

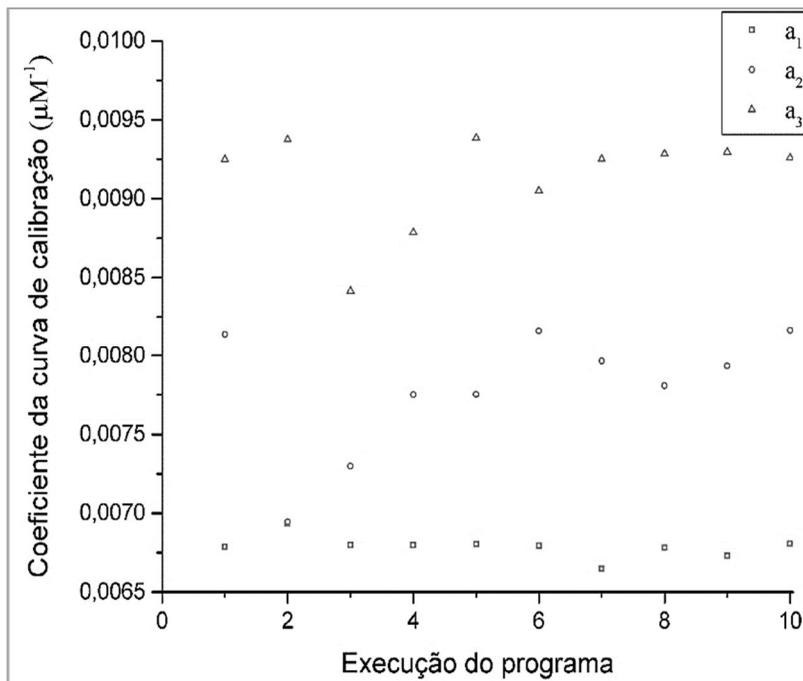


b)



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

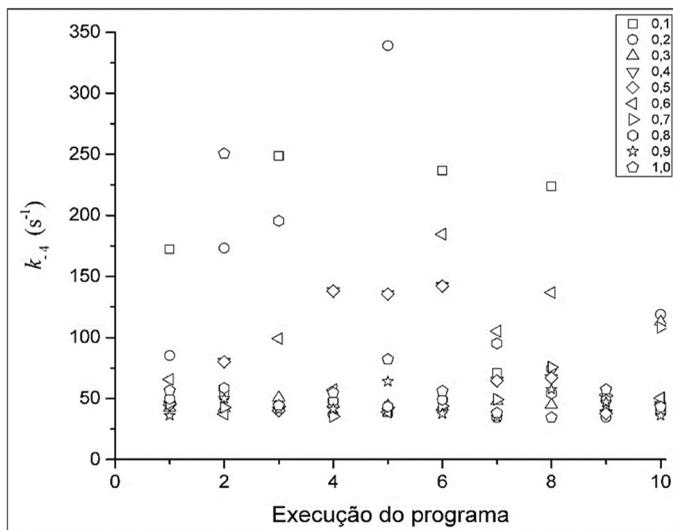
Figura 88 - Coeficientes intermediários das curvas de calibração obtidos pelo método de algoritmo genético.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

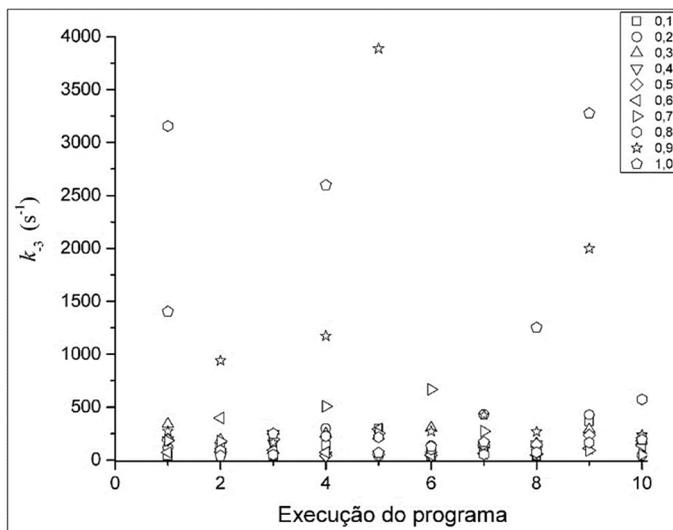
A fim de analisar a influência da probabilidade de mutação nos resultados, variou-se esse parâmetro de 0 a 1,0. Os resultados obtidos para as constantes cinéticas podem ser vistos nas Figuras 89 a 92. Em função da dispersão que se tem de todos os parâmetros, definiu-se que não há uma influência bem definida da probabilidade de mutação nos resultados. Deste modo, optou-se por realizar todas as próximas análises com todas as probabilidades, o que corresponde a 100 conjuntos de parâmetros, uma vez que, para cada uma delas foram realizadas dez execuções. Os valores do erro, expostos no gráfico da Figura 93, também não destaca um tipo de comportamento específico em função da probabilidade de mutação.

Figura 89 - Valores de k_{-4} para diferentes probabilidades de mutação.



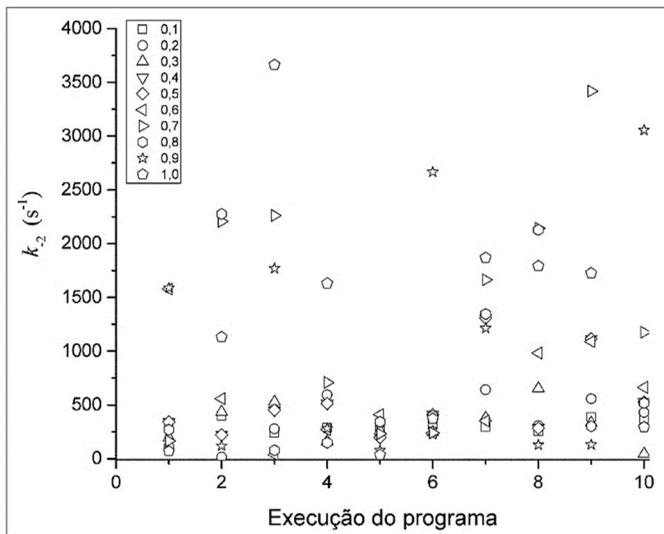
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 90 - Valores de k_{-3} para diferentes probabilidades de mutação.



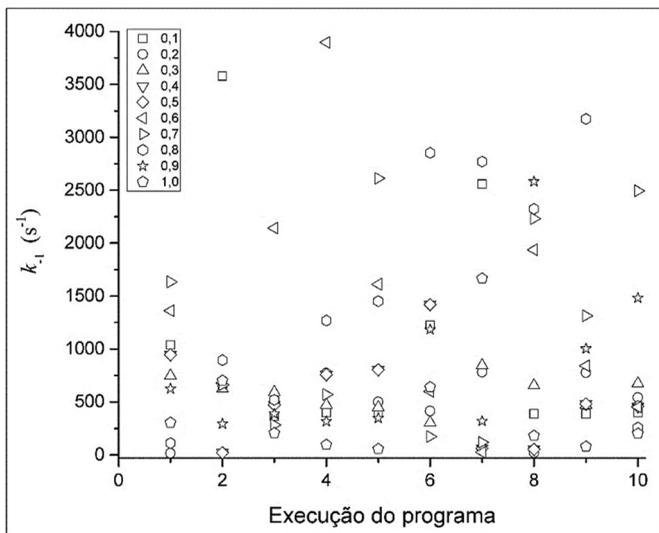
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 91 - Valores de k_{-2} para diferentes probabilidades de mutação.



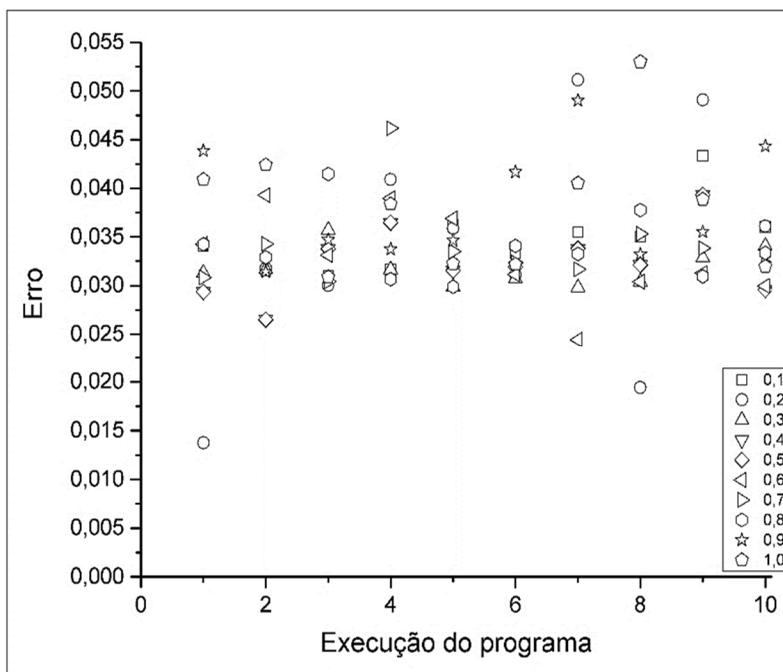
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 92 - Valores de k_{-1} para diferentes probabilidades de mutação.



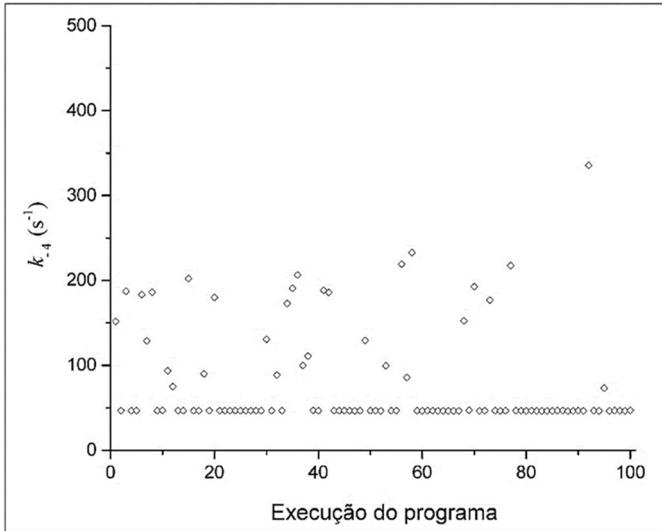
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 93 - Valores de erro para diferentes probabilidades de mutação.

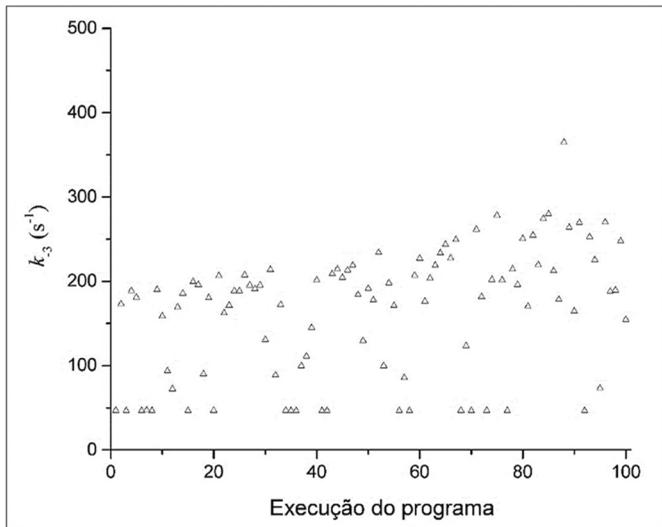


Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

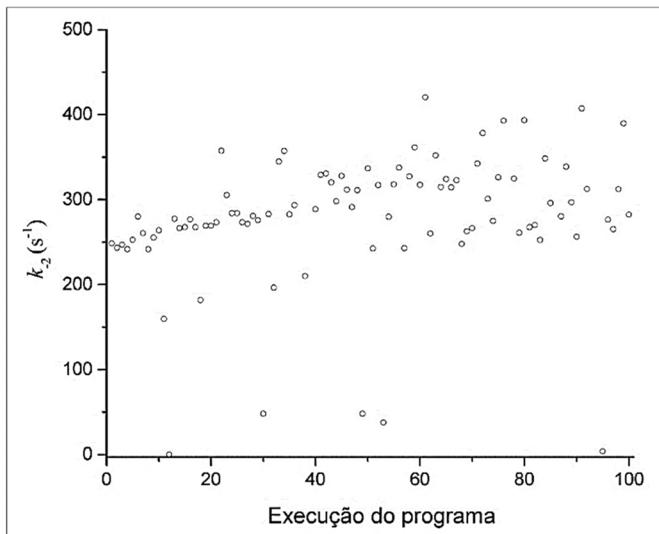
Após a execução do algoritmo genético, realizou-se a busca unidirecional utilizando como valores iniciais os resultados do algoritmo genético (método de otimização híbrido). Os valores para cada um dos parâmetros pelo método de otimização híbrido podem ser visualizados nas Figuras 94 a 97. Novamente, observa-se que a busca unidirecional concentra os valores iniciais em uma região mais bem delimitada.

Figura 94 - Valores de k_{-4} obtidos após usar o método de otimização híbrido.

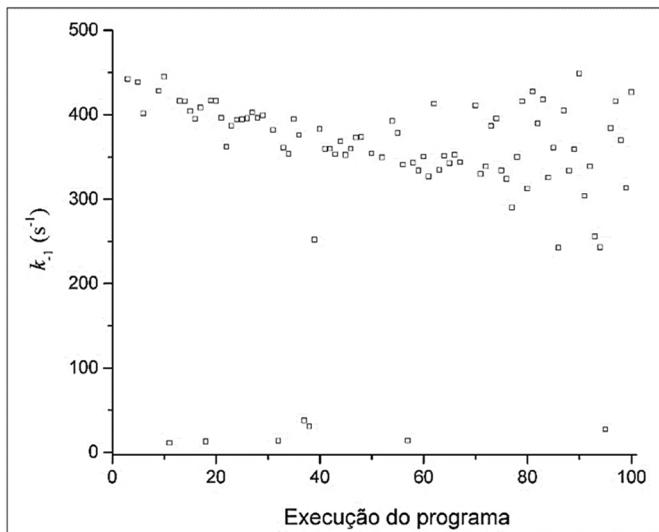
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 95 - Valores de k_{-3} obtidos após usar o método de otimização híbrido.

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 96 - Valores de k_{-2} obtidos após usar o método de otimização híbrido.

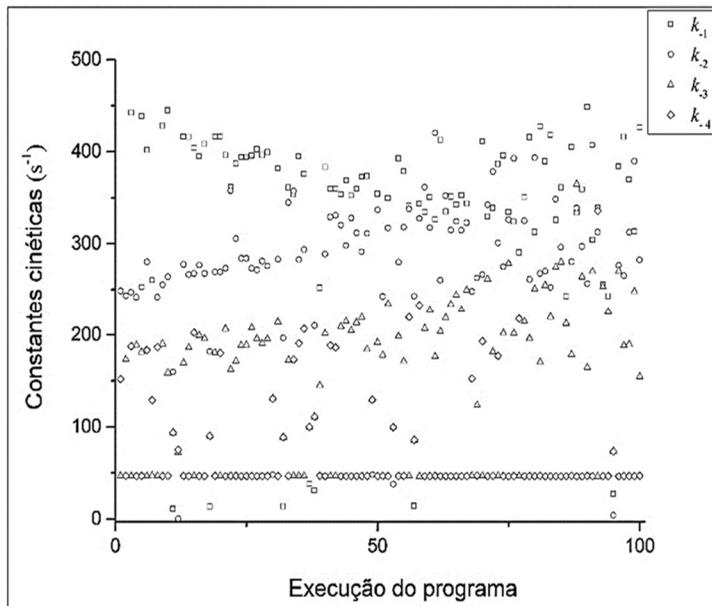
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 97 - Valores de k_{-1} obtidos após usar o método de otimização híbrido.

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

A Figura 98 mostra todas as constantes cinéticas simultaneamente de modo que se pode ressaltar uma sequência preferencial no ordenamento das constantes cinéticas ($k_{-4} < k_{-3} < k_{-2} \leq k_{-1}$), o que está em acordo com a hipótese da cooperatividade.

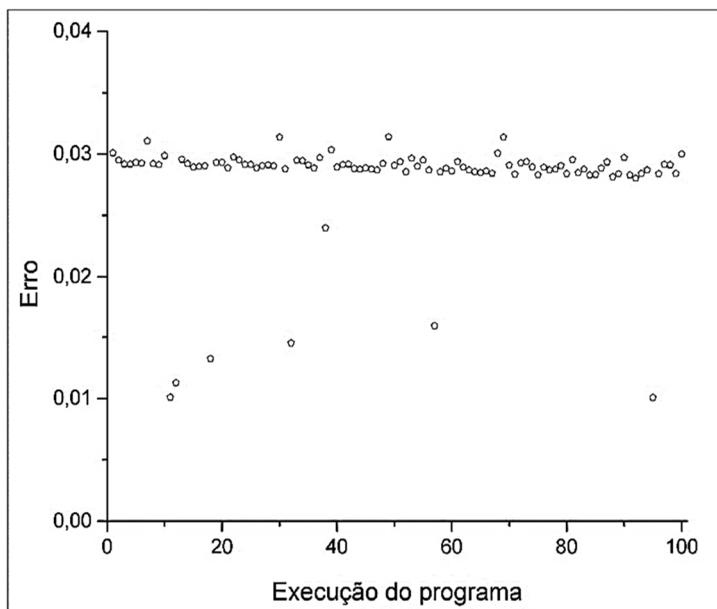
Figura 98 - Valores das constantes cinéticas obtidas após a utilização do método de otimização híbrido.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

O erro obtido utilizando o método de otimização híbrido, apresentado na Figura 99, igualmente parece atingir uma região de mínimo cuja média é 0,029. Esse valor é idêntico ao valor médio de erro encontrado para utilização da busca unidirecional com restrição nos coeficientes intermediários das curvas de calibração.

Figura 99 - Valores dos erros obtidos após a utilização do método de otimização híbrido.



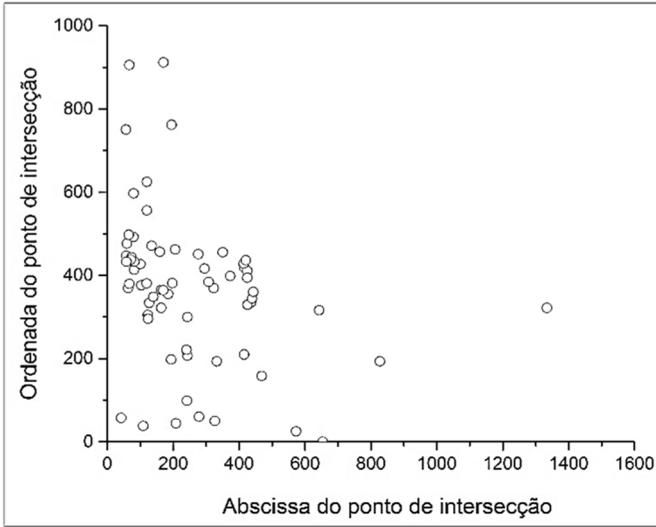
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Conforme exposto anteriormente, uma das possíveis análises de serem feitas com o intuito de sintetizar os resultados é com relação ao espaço de fase. A Figura 100 representa o espaço de fase utilizando somente o algoritmo genético (a) e utilizando o método híbrido (b). É importante perceber, a partir da Figura 100, que o método de algoritmo genético concentra o espaço de fase, o que é resultado da concentração dos parâmetros, conforme já discutido anteriormente.

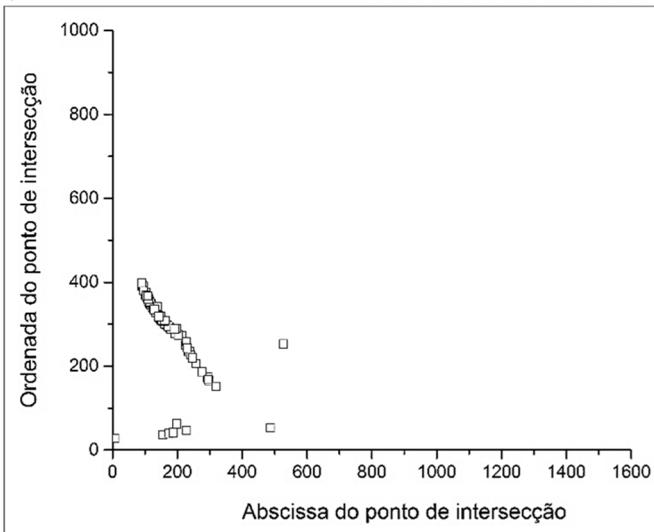
Dos 100 conjuntos avaliados, optou-se por selecionar aqueles cujos valores de k_{-4} estão entre o intervalo de 40 e 60 s^{-1} , o que de fato ocorre com grande parte de todos os resultados obtidos, e que há um ordenamento das constantes cinéticas ($k_{-4} < k_{-3} < k_{-2} < k_{-1}$), que está em acordo com a hipótese da cooperatividade. Para essas condições, tem-se 29 dos 100 pontos avaliados. O espaço de fase para esses pontos pode ser visualizado na Figura 101.

Figura 100 - Espaço de fase obtido pelos métodos: a) algoritmo genético e b) híbrido.

a)



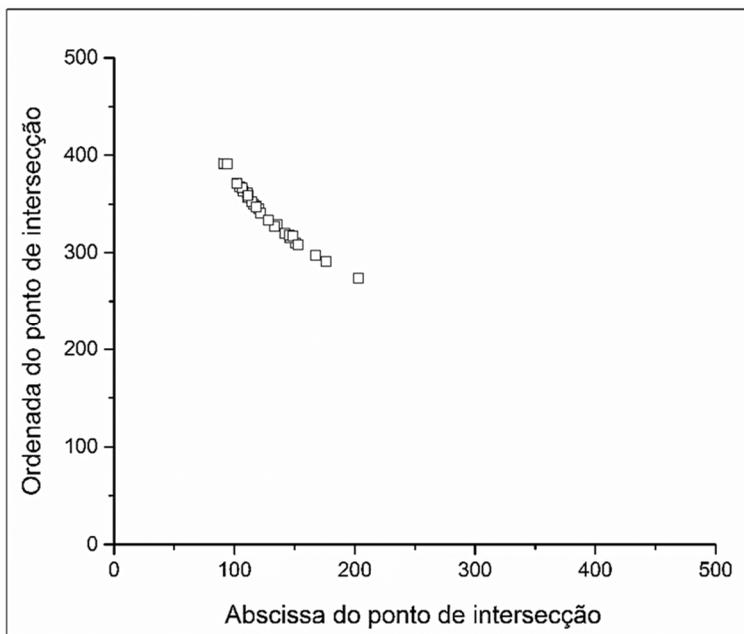
b)



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

A Figura 101 aponta uma região viável para o problema. É interessante destacar que, em sistemas biológicos, é difícil possuir valores absolutos para as constantes cinéticas das reações, uma vez que o sistema deve operar similarmente mesmo quando exposto a situações diferenciadas. Nesse sentido, os resultados obtidos, tanto pelo método algoritmo genético quanto pelo híbrido, em concordância com essa característica dos sistemas biológicos, apontam que não se deva falar em constantes absolutas e sim em regiões viáveis.

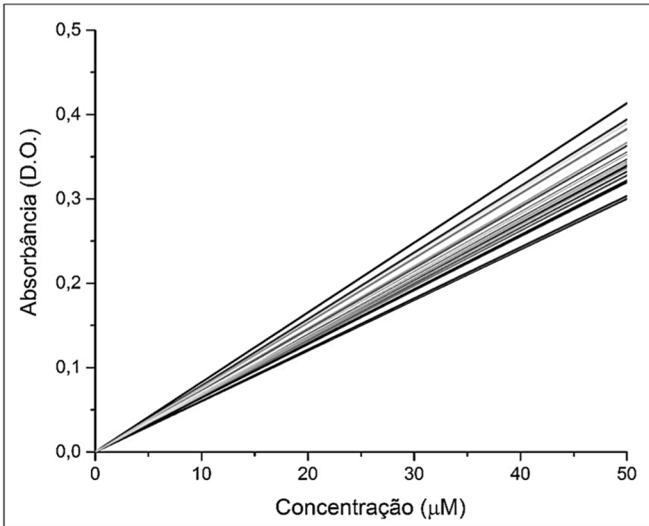
Figura 101 - Espaço de fase obtido a partir do método híbrido considerando apenas os conjuntos que tem ordenamento das constantes cinéticas e valor de k_{-4} entre 40 e 60 s^{-1} .



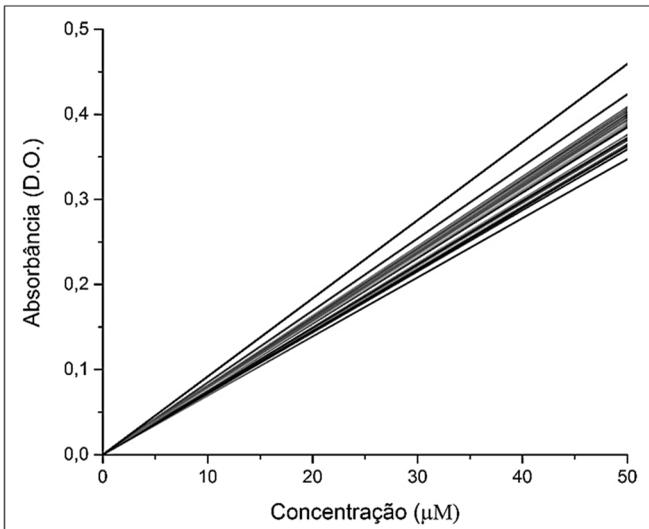
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Conhecendo essa região viável, analisaram-se os 29 resultados obtidos com relação às curvas de absorvância e concentração dos compostos proteicos envolvidos na reação.

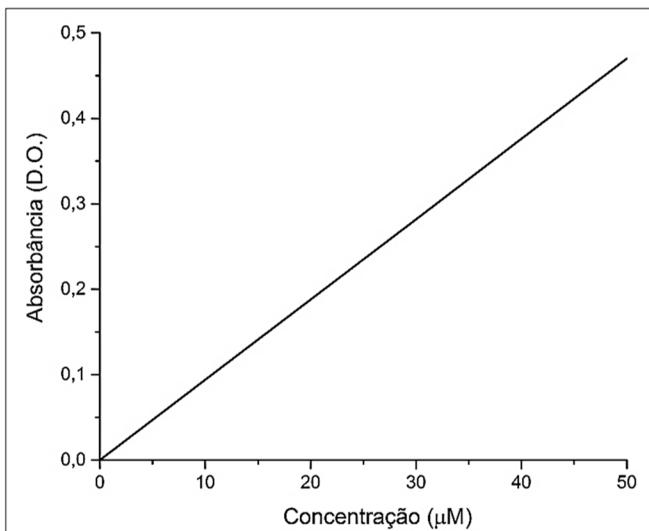
Iniciou-se a análise pelas curvas de calibração para todos os compostos intermediários envolvidos na reação de desoxigenação da oxihemoglobina, que estão todos representados nas Figuras 102 a 104.

Figura 102 - Curvas de calibração da $Hb(O_2)_1$.

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 103 - Curvas de calibração da $Hb(O_2)_2$.

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

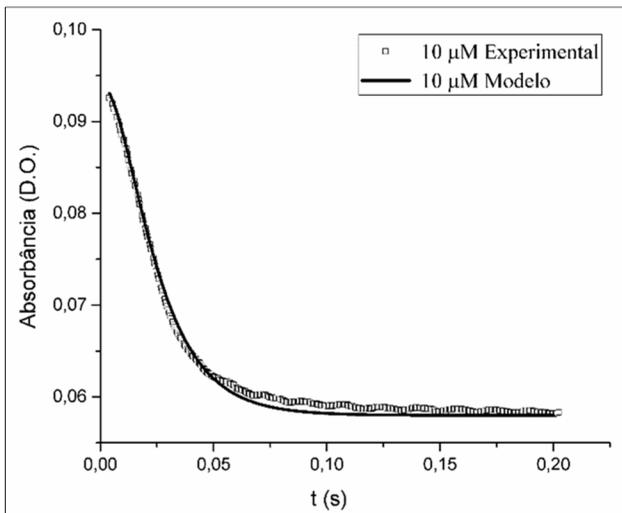
Figura 104 - Curvas de calibração da $Hb(O_2)_3$.

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Os gráficos das Figuras 105 a 109 demonstram a comparação entre os dados de absorbância obtidos experimentalmente e o resultado da absorbância ao se utilizar o modelo matemático para a reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina com o ditionito de sódio para cada uma das concentrações que foram avaliadas de 10; 20; 30; 40 e 50 µM. São apresentados os resultados para os 29 conjuntos obtidos pelo método de otimização híbrido.

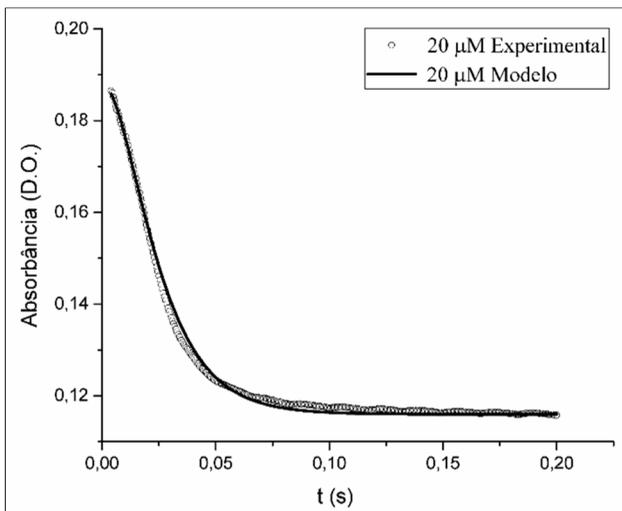
É interessante observar que, apesar de valores distintos para os parâmetros do modelo, todos os conjuntos apresentam o comportamento de absorbância muito similar. Isso já era esperado, uma vez que o erro de todos eles está em torno de 0,029. A partir das Figuras 105 a 109, é possível concluir que o modelo proposto se ajusta bem aos dados experimentais.

Figura 105 - Comparação entre o resultado experimental e o modelo do presente trabalho para concentração de 10 μM (método de otimização híbrido).



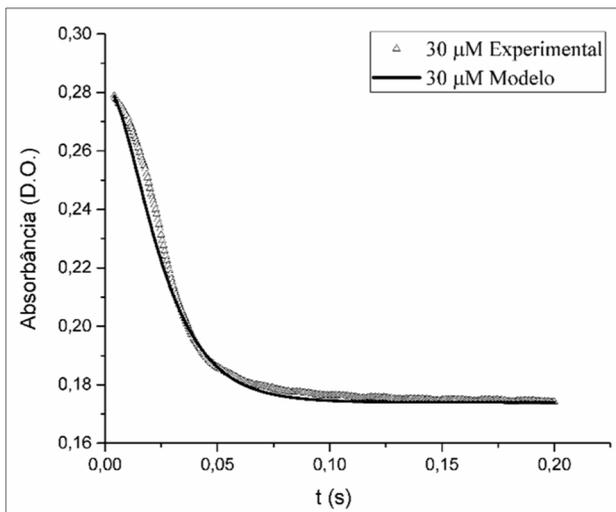
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 106 - Comparação entre o resultado experimental e o modelo do presente trabalho para concentração de 20 μM (método de otimização híbrido).



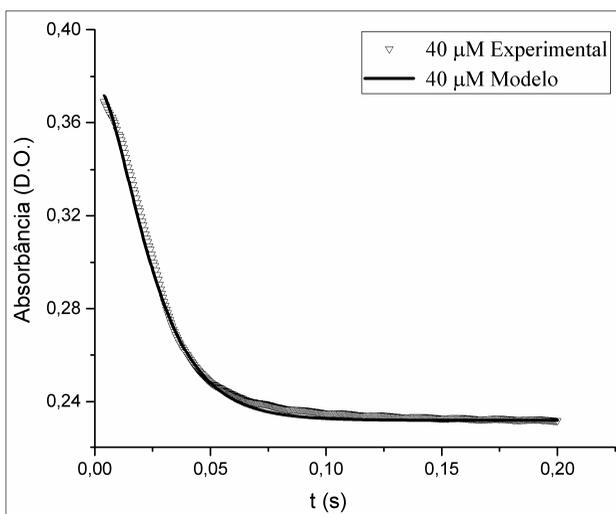
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 107 - Comparação entre o resultado experimental e o modelo do presente trabalho para concentração de 30 μM (método de otimização híbrido).



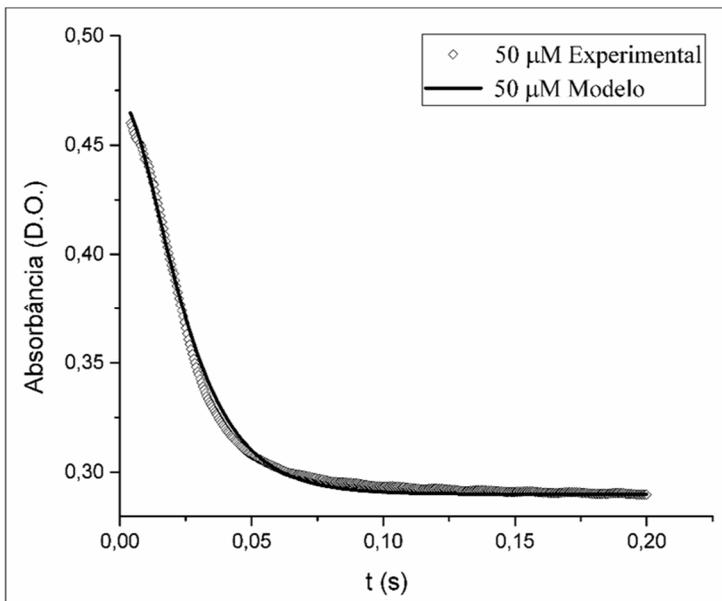
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 108 - Comparação entre o resultado experimental e o modelo do presente trabalho para concentração de 40 μM (método de otimização híbrido).



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 109 - Comparação entre o resultado experimental e o modelo do presente trabalho para concentração de 50 μM .

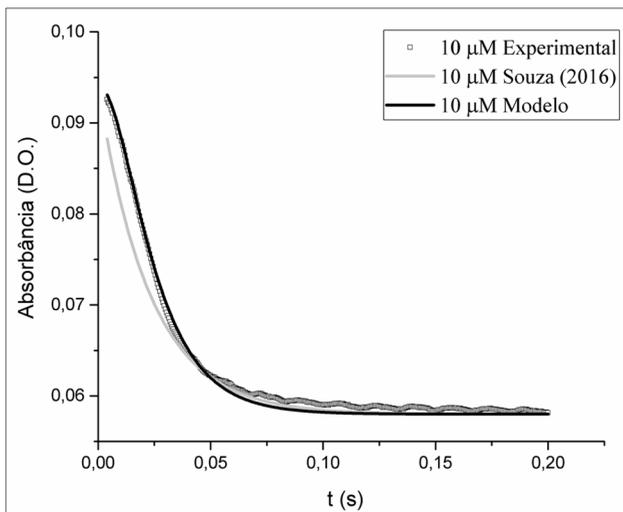


Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

É relevante comparar os resultados aqui obtidos caso fosse utilizada a aproximação de pseudo primeira ordem, comumente utilizada na literatura para esse estudo (DALZIEL; O'BRIEN, 1957; HOLLAND *et al.*, 1985; JIA *et al.*, 2004 e 2013; JORGE *et al.*, 2012). A comparação entre o resultado experimental, o modelo do presente trabalho com os 29 conjuntos de parâmetros obtidos pelo método de otimização híbrido e o modelo de pseudo primeira ordem apresentado por Souza (2016) encontram-se demonstrados nas Figuras 110 a 114.

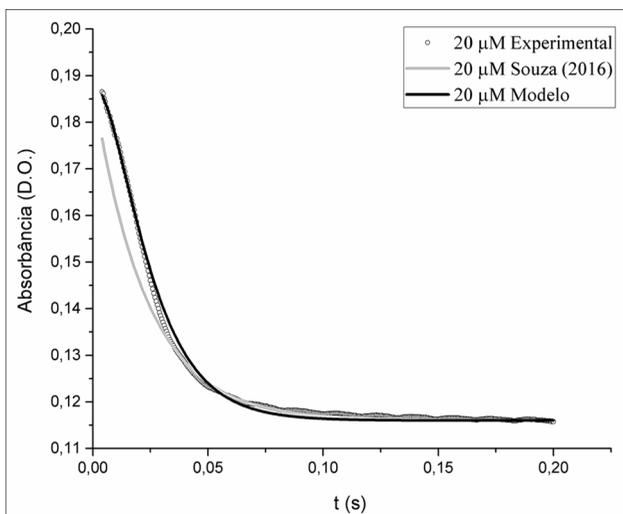
O erro médio obtido pelo método de otimização híbrido é de 0,029. Para o modelo de pseudo primeira ordem esse erro é de 0,18. A principal diferença entre eles se dá no início da reação, cujo comportamento não é bem descrito por uma exponencial decrescente. Apesar de o modelo matemático do presente trabalho necessitar da otimização de sete parâmetros, o erro por ele obtido é significativamente inferior ao do modelo de pseudo primeira ordem.

Figura 110 - Comparação entre o resultado experimental, o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem para concentração de 10 μM .



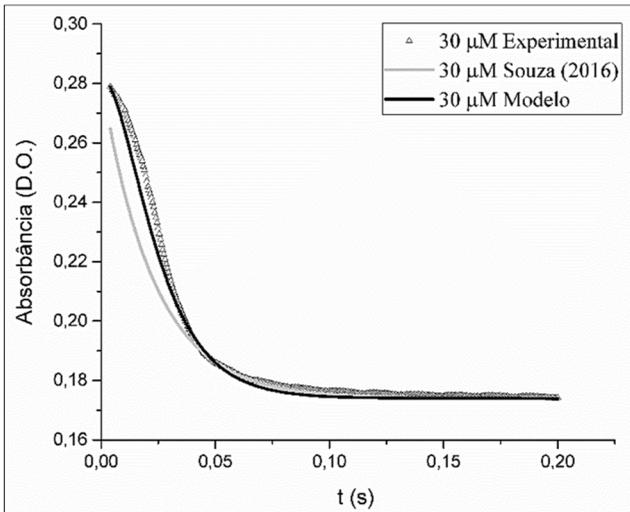
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 111 - Comparação entre o resultado experimental, o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem para concentração de 20 μM .



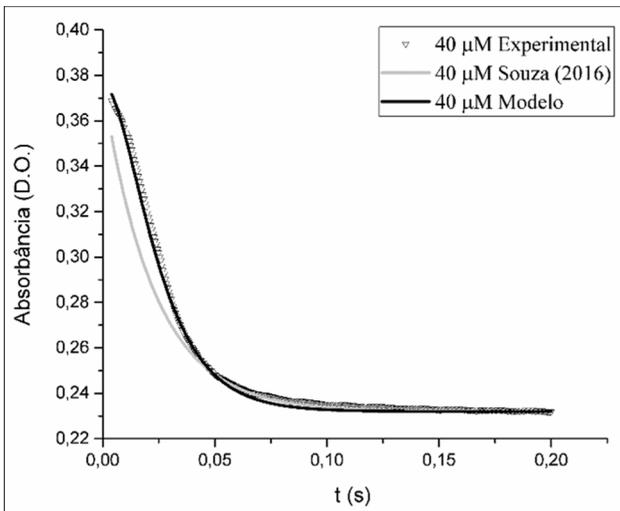
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 112 - Comparação entre o resultado experimental, o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem para concentração de 30 μM .



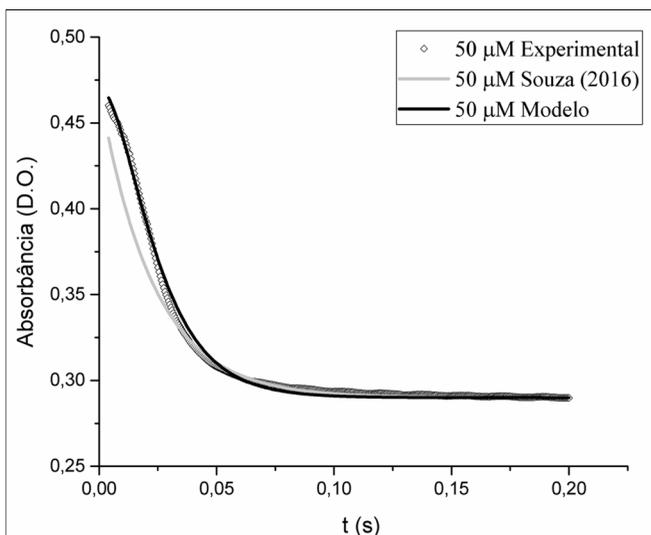
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 113 - Comparação entre o resultado experimental, o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem para concentração 40 μM .



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

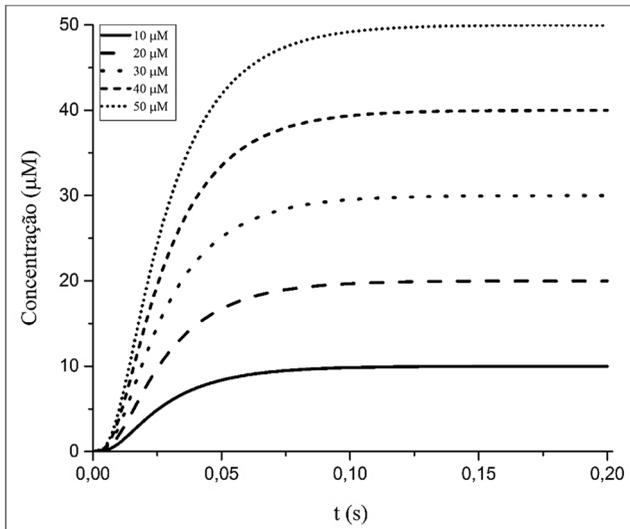
Figura 114 - Comparação entre o resultado experimental, o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem para concentração de 50 μM .



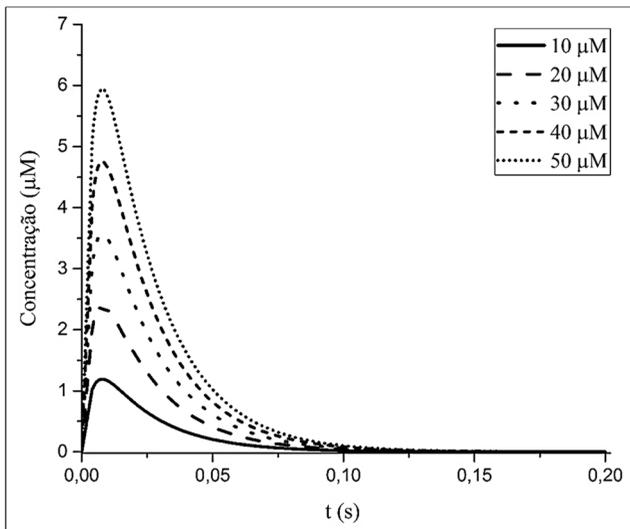
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

É importante mencionar que o erro, assim como o número de constantes a serem otimizadas, não é o único critério para a escolha do modelo mais adequado. É necessário também refletir a respeito das consequências da preferência por esse modelo. Embora o modelo aqui proposto tenha um número significativo de constantes a serem otimizadas, ele é mais adequado que o de pseudo primeira ordem por possibilitar o cálculo das concentrações dos compostos intermediários, além das de oxi-hemoglobina e desoxi-hemoglobina, conforme pode ser visualizado nas Figuras 115 a 119, utilizando o conjunto de número de 29 como exemplo.

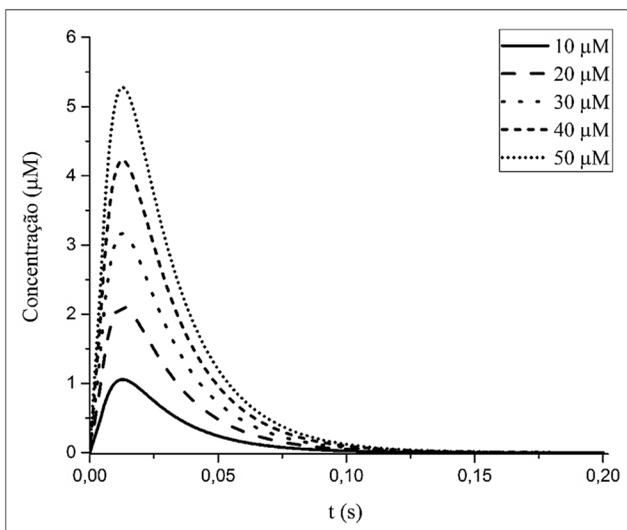
Todas as concentrações representadas nas Figuras 115 a 119 apresentam um comportamento qualitativo e quantitativo coerente. A concentração dos compostos intermediários aumenta e em seguida diminui, pois, os mesmos são reagentes em algumas reações e produtos em outras. A oxi-hemoglobina, por sua vez, só é reagente de uma reação. Portanto, sua concentração somente diminui a partir de um valor inicial. A desoxi-hemoglobina, por outro lado, é somente produto da reação, o que implica apenas em acréscimo de sua concentração a partir do valor inicial, que é zero.

Figura 115 - Concentração da $Hb(O_2)_0$ em função do tempo.

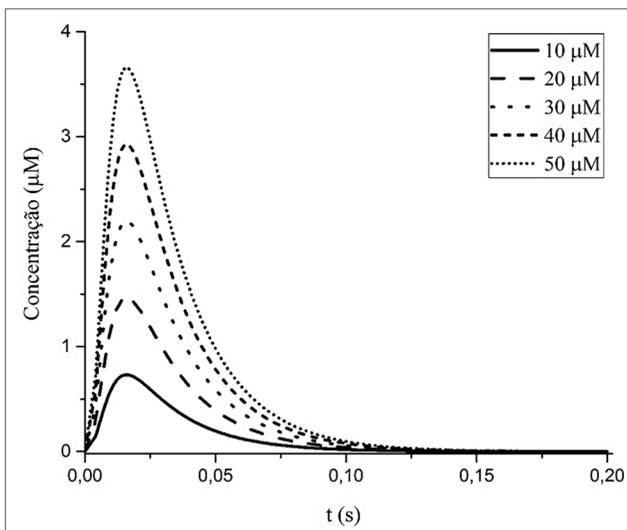
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 116 - Concentração da $Hb(O_2)_1$ em função do tempo.

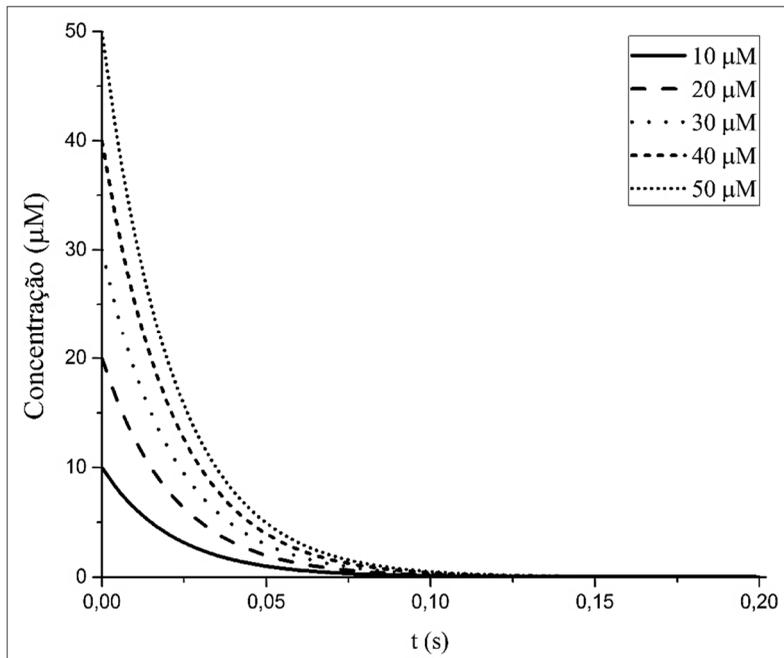
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 117 - Concentração da $Hb(O_2)_2$ em função do tempo.

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 118 - Concentração da $Hb(O_2)_3$ em função do tempo.

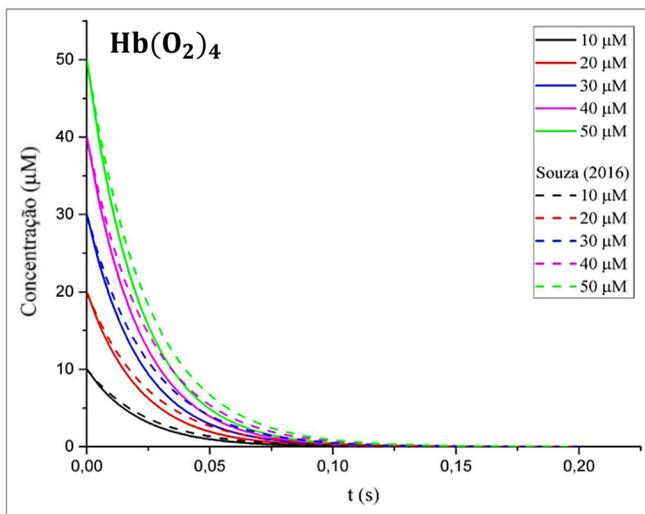
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 119 - Concentração da $Hb(O_2)_4$ em função do tempo.

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

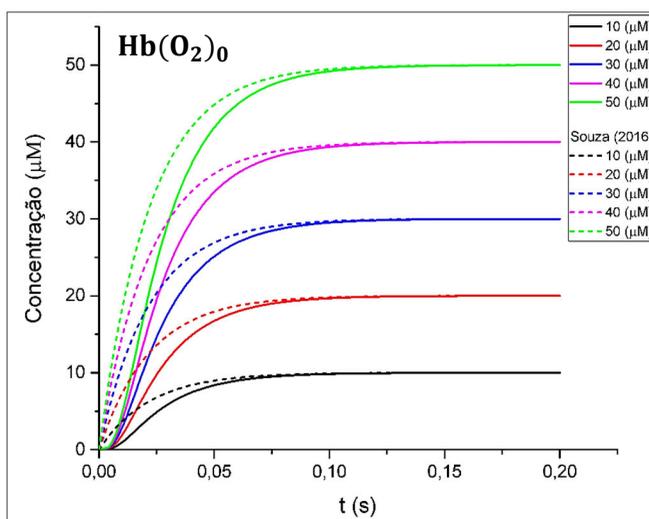
É fundamental destacar que as concepções utilizadas com relação ao modelo determinam o comportamento de cada um dos compostos que interagem quimicamente. Isso pode ser notado a partir da comparação do perfil de concentração obtido a partir do presente trabalho com o obtido utilizando o modelo de pseudo primeira ordem, conforme Figuras 120 e 121. A partir das Figuras 120 e 121, conclui-se que a dinâmica dos compostos está diretamente relacionada ao modelo escolhido. No modelo do presente trabalho, a oxi-hemoglobina decai mais rapidamente porque ela ainda se transformará em três outros compostos antes de se transformar em desoxi-hemoglobina (Figura 120). A desoxi-hemoglobina, por sua vez, será formada mais lentamente no modelo do presente trabalho porque há etapas intermediárias para que a mesma seja produzida (Figura 121).

Figura 120 - Comparação entre as concentrações de oxi-Hb [$Hb(O_2)_4$] utilizando o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

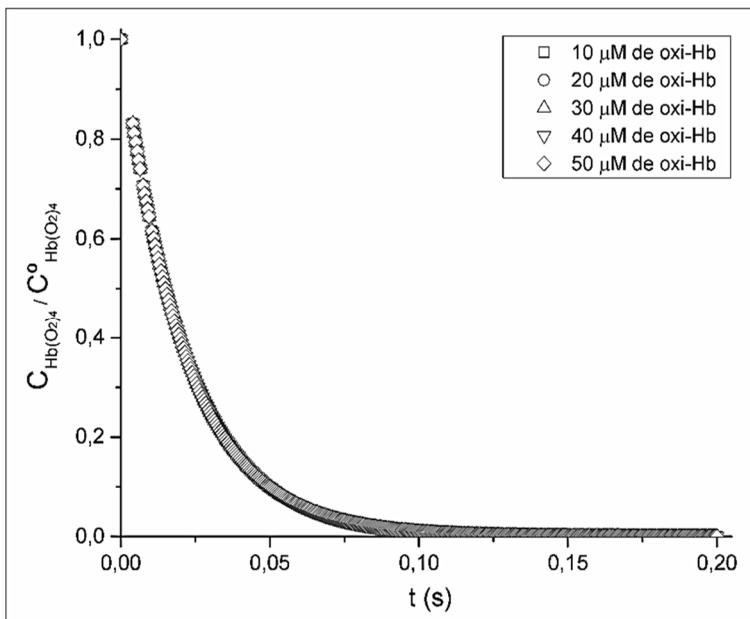
Figura 121 - Comparação entre as concentrações de desoxi-Hb [$Hb(O_2)_0$] utilizando o modelo do presente trabalho e o modelo de pseudo primeira ordem.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Para construir a Figura 122 foi dividido a concentração de oxi-hemoglobina obtida utilizando o modelo matemático proposto neste trabalho pela inicial. Observou-se que há uma curva característica do problema uma vez que todas as linhas se sobrepõem.

Figura 122 - Curva característica do presente trabalho.

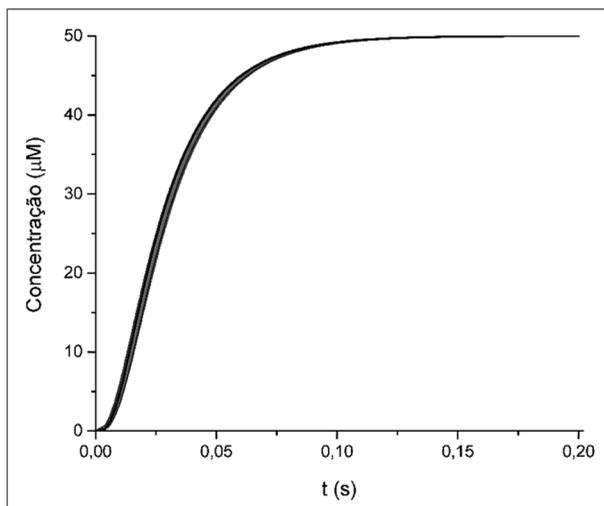


Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

É fundamental analisar o comportamento da concentração de todos os compostos proteicos envolvidos na reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina para os 29 conjuntos selecionados pelo método de otimização híbrido. Esses gráficos podem ser visualizados nas Figuras 123 a 127.

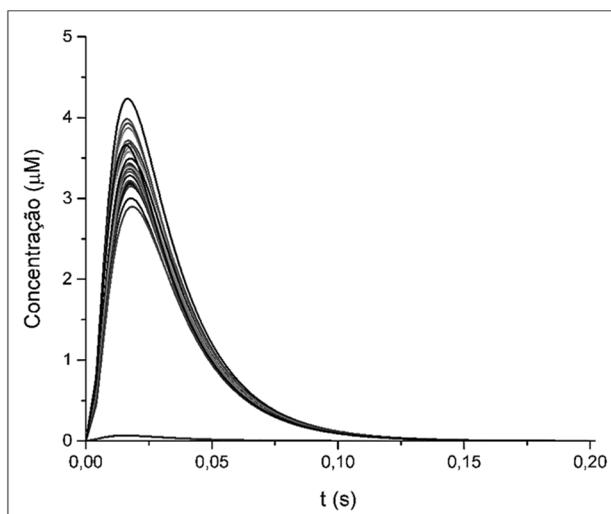
As Figuras 123 a 127 mostram quão importantes são as curvas de calibração para o problema em questão. Os compostos cujas curvas de calibração estão bem definidas experimentalmente, apresentam o mesmo comportamento para todos os conjuntos. Os demais compostos, por outro lado, exibem um comportamento variado.

Figura 123 - Concentração da $Hb(O_2)_0$ em função do tempo para todos os conjuntos viáveis obtidos pelo método híbrido.



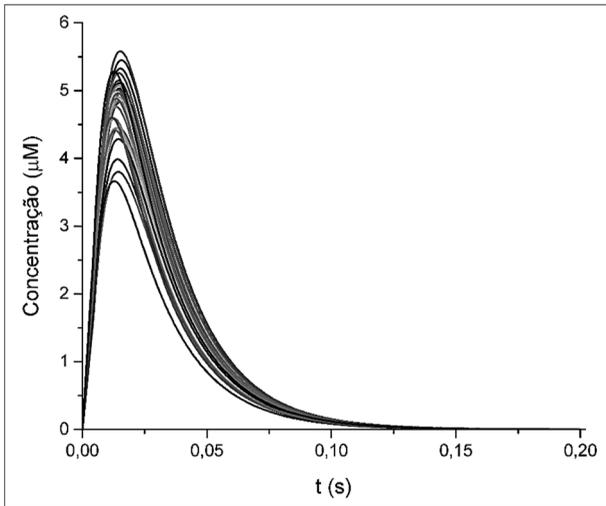
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 124 - Concentração da $Hb(O_2)_1$ em função do tempo para todos os conjuntos viáveis obtidos pelo método híbrido.



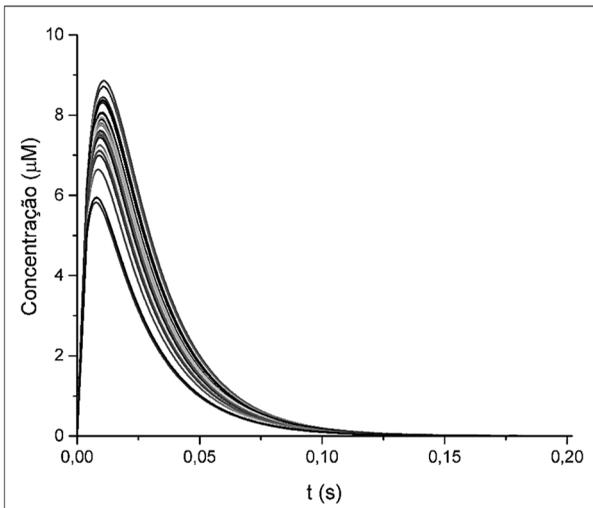
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 125 - Concentração da $Hb(O_2)_2$ em função do tempo para todos os conjuntos viáveis obtidos pelo método híbrido.



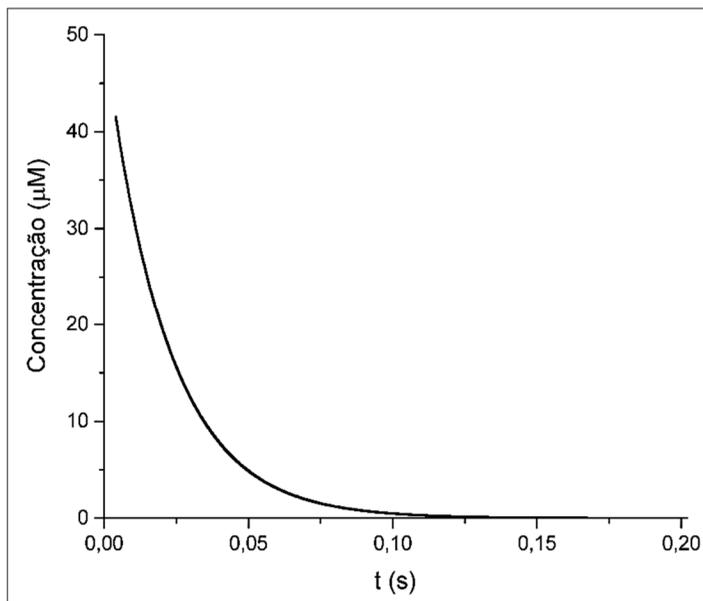
Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 126 - Concentração da $Hb(O_2)_3$ em função do tempo para todos os conjuntos viáveis obtidos pelo método híbrido.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Figura 127 - Concentração da $Hb(O_2)_4$ em função do tempo para todos os conjuntos viáveis obtidos pelo método híbrido.



Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

A fim de comparar os valores dos resultados das constantes do presente trabalho, calculou-se uma média de cada um dos parâmetros dos 29 conjuntos obtidos pelo método de otimização híbrido. Esses valores estão demonstrados na Tabela 7, ao lado dos valores obtidos por Gibson (1970). A comparação com Gibson (1970) é relevante uma vez que esse foi o único pesquisador a estimar as constantes cinéticas para a reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina.

Os valores escolhidos para as constantes cinéticas diferem daqueles encontrados por Gibson (1970) em função de o mesmo ter como função objetivo a curva de saturação da hemoglobina, além do fato do tempo morto do presente trabalho ser significativamente menor.

Tabela 7 - Comparação entre os valores médios obtidos para os parâmetros do modelo do presente trabalho comparados com as constantes cinéticas obtidas por Gibson (1970).

Coefficiente	Valor otimizado	Valores de Gibson (1970)
k_{-1}	385,7 s ⁻¹	1900 s ⁻¹
k_{-2}	296,0 s ⁻¹	158 s ⁻¹
k_{-3}	198,1 s ⁻¹	539 s ⁻¹
k_{-4}	46,6 s ⁻¹	50 s ⁻¹
a_1	0,0069 μM ⁻¹	-
a_2	0,0078 μM ⁻¹	-
a_3	0,0094 μM ⁻¹	-

Fonte: Desenvolvida pela autora (2016).

Tempos mortos menores possibilitam uma avaliação mais detalhada do início da reação, permitindo uma análise cinética minuciosa. A fim de ilustrar a relevância do tempo morto do presente trabalho, podem-se visualizar os valores utilizados por demais pesquisadores na Tabela 8.

Tabela 8 - Representação dos valores do tempo morto utilizado na literatura em comparação com o presente trabalho.

AUTORES	TEMPO MORTO (ms)
Gibson (1970)	1,2
Johnson, Adamson e Mauk (1998)	1,5
Gelderman <i>et al.</i> (2010)	1,3
Jia <i>et al.</i> (2013)	1,3
Presente trabalho	0,4

Fonte: Desenvolvido pela autora (2016).

Apesar das constantes cinéticas diferirem das encontradas por Gibson (1970), seus valores são bastantes coerentes. As relações entre as constantes estão em acordo com a hipótese da cooperatividade. Além disso, a única constante que é comparável à de Gibson (1970), k_{-4} , é da ordem de grandeza da constante para o modelo de pseudo primeira ordem, o que é adequado também em função de esse parâmetro controlar a velocidade mais lenta da reação.

5 CONCLUSÃO

A utilização do agente redutor ditionito de sódio tanto na coluna cromatográfica (redução da meta-hemoglobina em oxi-hemoglobina) quanto na reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina (*SFM 4000/S*), contribuiu para a obtenção de bons resultados finais, juntamente com outras metodologias, viabilizando a validação do presente trabalho. Além disso, o *SFM 4000/S* forneceu uma automação apropriada, beneficiando a aquisição de dados fidedignos com a garantia de um tempo morto na ordem de 0,4 ms, possibilitando uma análise minuciosa da etapa inicial da reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina.

Concluiu-se que a parte dinâmica da reação ocorre realmente muito rápido, em menos de 0,2 s, comprovando que essa é a etapa de interesse para efetuar a otimização das constantes cinéticas e dos coeficientes intermediários das curvas de calibração. A partir dos resultados da otimização obtidos pelos métodos de busca unidirecional, algoritmo genético e híbrido (combinação dos dois anteriores), foi possível afirmar que não há um conjunto de parâmetros específicos que satisfazem o problema, mas sim uma região viável. Essa região viável é caracterizada por uma sequência no ordenamento das constantes cinéticas em que $k_{-4} < k_{-3} < k_{-2} < k_{-1}$ e por valores de k_{-4} obtidos em um intervalo entre 40 a 60 s⁻¹. A análise a partir de um espaço de fase permitiu enxergar a região viável, que está em acordo com o princípio da cooperatividade (ordenamento das constantes cinéticas), além de apresentar valores de k_{-4} , constante que controla a velocidade da etapa mais lenta da reação, na ordem de 46,6 s⁻¹, corroborando com resultados apontados na literatura para a constante do modelo de pseudo primeira ordem.

Foi demonstrado que o modelo de pseudo primeira ordem, amplamente utilizado na literatura, apresenta um erro maior quando comparado com o modelo que considera as quatro etapas da reação. Ainda foi possível estimar no presente trabalho as concentrações dos compostos proteicos intermediários, o que não é possível com o modelo anteriormente citado.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como a hemoglobina é uma macromolécula que pode ser amplamente pesquisada, segue abaixo algumas sugestões para serem concretizadas posteriormente em trabalhos futuros:

1. efetuar a desoxigenação da hemoglobina em um ambiente hermeticamente fechado para depois efetuar o procedimento de oxigenação da desoxi-hemoglobina pelo método de mistura rápida com fluxo interrompido;
2. propor as constantes cinéticas de todas as etapas da reação que considere a oxigenação e a desoxigenação;
3. realizar o experimento de desoxigenação modificando a temperatura, a fim de estudar a influência que a mesma provoca nos parâmetros cinéticos;
4. fazer uma análise comparativa com a metodologia proposta nesse trabalho para determinação das constantes cinéticas utilizando outros métodos como flash-fotólise, radiólise pulsada, fotólise de femtosegundo e impulso de Raman (Figura 13), que também permitem avaliar as reações de oxigenação e desoxigenação.

REFERÊNCIAS

- ADAIR, G. S. The Hemoglobin System VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *Journal Biological Chemistry*, v. 63, p. 529-545, 1925.
- ALAYASH, A.I. Blood substitutes: why haven't we been more successful? Review. *Trends in Biotechnology*, v. 32, n. 4, p. 177-185, 2014.
- ANJOS, M. F. Optimization and Engineering. *International Multidisciplinary Journal to Promote Optimization Theory & Applications in Engineering Sciences*. Springer US, v. 17, p. 359–384, 2016.
- ANTONINI, E.; BRUNORI, M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. Amsterdam: North Holland, 1971.
- ARORA, J. S. Introduction to optimum design. 2nd ed. Elsevier Inc., 2004.
- ASSEDELFT, O. W; ZIJLSTR, W. G. Extinction coefficients for use in equations for the spectrophotometric analysis of haemoglobin mixtures. *Analytical Biochemistry*, v. 69, p. 43-48, 1975.
- BARATA-SILVA, C.; SANTOS, A. T. P.; GOUVÊA, B. A. V.; LARENTISA, A. L.; MOREIRA, J. C.; SARCINELLIA, P. N. Adaptação da metodologia de análise de metemoglobina como biomarcador de efeito da exposição ao agrotóxico diflubenzuron. *Química Nova*, v. 38, n. 4, p. 533-537, 2015.
- BATISTELA, V. R., TESSARO, A. L.; SOARES, R. R. S.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N. Um aparato para monitorar reações rápidas: Um stopped flow artesanal de baixo custo. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 1101-1105, 2006.
- BENAMOR, A.; AL-MARRI, M. J.; KHRAISHEH, M.; NASSER, M. S.; TONTIWACHWUTHIKUL, P. Reaction kinetics of carbon dioxide in aqueous blends of N-methyldiethanolamine and glycine using the stopped flow technique. *Journal of Natural Gas Science and Engineering*, v. 33, p. 186-195, 2016.

BENESCH, R.; BENESCH, R. E.; ENOKI, Y. The interaction of hemoglobin and its subunits with 2,3-diphosphoglycerate. *Biochemistry*, v. 61, p. 1102-1106, 1968.

BERGER, R. L.; ANTONINI, E.; BIWNOVI, M.; WYMAN, J.; ROSSI-FANELLI, A. Observations on the kinetics of the reaction of hemoglobin with oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 242, p. 4841-4843, 1967.

BERGER, R. L. Some problems concerning mixers and detectors for stopped flow kinetic studies. *Biophysical Journal*, v. 24, n.01, p. 2-20, 1978.

BIO-LOGIC SCIENCE INSTRUMENTS. Biokine Software User's Manual. França. Science Instruments, versão 4.74, p. 1-158, 2014.

BLAU, C. A.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Hemoglobin switching and its clinical implications. *Current Opinion in Hematology*, v. 1, n. 2, p.136-42, 1994.

BOHR, C.; HASSELBALCH, K.; KROGH, A. Concerning a biologically important relationship. the influence of the carbon dioxide content of blood on its oxygen binding. *Skand Arch Physiol*, v. 16, p. 401-412, 1904.

BRINDELL, M.; STAWOSKA, I.; ORZEL, Ł.; LABUZ, P.; STOCHEL, G.; ELDIK, R. V. Application of high pressure laser flash photolysis in studies on selected hemoprotein reactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1784, p.1481-1492, 2008.

BRITAIN, T.; SIMPSON, R. An Analysis of the stopped-flow kinetics of gaseous ligand uptake and release by adult mouse erythrocytes. *Biochemical Journal*, v. 260, p.171-176, 1989.

BUCCI E. Thermodynamic approach to oxygen delivery in vivo by natural and artificial oxygen carriers. *Biophysical Chemistry*, v. 142, p. 1-6, 2009.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. 1 ed. W.B. Saunders Company, 1986.

CLARKE, RONALD J.; KHALID, MOHAMMED A. A. Pumps, Channels and Transporters: Methods of Functional Analysis. BOOKS AND SOFTWARE IN REVIEW, Ed. Wiley, p. 1-488, 2015.

CLEMENTI, M. E.; CONDÒ S. G.; CASTAGNOLA, M.; GIARDINA, B. Hemoglobin function under extreme life conditions. *European Journal of Biochemistry. Review* 15, v. 223, n. 2, p. 309-317, 1994.

CHANCE, B. The accelerated flow method for rapid reactions. Part II. Design, construction and tests. I. Apparatus Construction. *Journal of the Franklin Institute*, v. 229, p. 737-766, (see p 745), 1940.

CHANCE, B. Optical method. *Biophysical Chemistry*, v. 20, p. 1-28, 1994.

CHANCE, B. The stopped-flow method and chemical intermediates in enzyme reactions – a personal essay. *Photosynthesis Research*, v. 80, p. 387-400, 2004.

CHENG, Y.; LIN, H.; XUE, D.; LI, R.; WANG, K. Lanthanide ions induce hydrolysis of hemoglobin-bound 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG), conformational changes of globin and bidirectional changes of 2,3-DPG-hemoglobin's oxygen affinity. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1535, p. 200-216, 2001.

COIN, J. T.; OSLON, J. S. The rate of oxygen uptake by human red blood cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 254, n.04, p. 1178-1190, 1979.

CUI, Z.; WU, B.; QU, S. Combining nonmonotone conic trust region and line search techniques for unconstrained optimization. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, n. 8, v. 235, p. 2432-2441, 2011.

DALZIEL, K.; O'BRIEN, J. R. P. Side reactions in the deoxygenation of dilute oxyhaemoglobin solutions by sodium dithionite. *Biochemical Journal*, v. 67, p. 119-124, 1957.

DARWIN, C. On the origin old species: by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life. *Fictionwise Classic* : London, 1859.

DASH, R. K.; BASSINGTHWAIGHTE, J.B. Simultaneous blood–tissue exchange of oxygen, carbon dioxide, bicarbonate, and hydrogen ion. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 34, n. 7, p. 1129–1148, 2006.

DAVIS, L. Adapting operator probabilities in genetic algorithms: proceedings of the third international conference on genetic algorithms. San Mateo, p. 61-69, 1989.

DIXON, H. B. F.; MCINTOSH. Reduction of methaemoglobin in haemoglobin samples using gel filtration for continuous removal of reaction products. *Nature*, v. 213, p. 399-400, 1967.

DIXON, H. B. F. Gel filtration of haemoglobin. *Biochemical Education*, v. 13, p. 4, 1985.

DRABKIN, D. L. The standardization of hemoglobin measurement. *The American journal of the medical sciences*, v. 215, p. 110, 1948.

DRABKIN, D. L. *The Journal of Biological Chemistry*, p. 185-231, 1950.

EATON, W. A.; HENRY, E. R.; HOFRICHTER, J., BETTATI, S.; VIAPPIANI, C.; MOZZARELLI, A. Evolution of allosteric models for hemoglobin. *IUBMB Life*, v. 59, p. 586–599, 2007.

EDGAR, T. F.; HIMMELBLAU, D. M.; LASDON, L. S. *Optimization of Chemical Processes*. McGraw Hill, second edition, p. 1-643, 2001.

ELMER, J.; BUEHLER, P. W.; JIA, Y.; WOOD, F.; HARRIS, D. R.; ALAYASH, A. I.; PALMER, A. F. Functional comparison of hemoglobin purified by different methods and their biophysical implications. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 106, n. 1, p. 76-85, 2010.

ELMER, J.; HARRIS, D.; PALMER, A. F. Purification of hemoglobin from red blood cells using tangential flow filtration and immobilized metal ion affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 879, n. 2, p. 131-138, 2011.

FERREIRA, I. E. P.; TRINCA, L. A.; FERREIRA, C. P. Delineamentos experimentais eficientes para estudos de cinética química. *Química Nova*, v. 37, n. 4, p. 589-596, 2014.

FRESKGARD, P. O.; BERGENHEM, N.; CARLSSON, U. Versatile stopped-flow apparatus with adjustable pistons. *Analytica Chimica Acta*, v. 269, p. 143-148, 1992.

GELDERMAN, M. P.; YAZER, M. H.; JIA, Y.; WOOD, F.; ALAYASH, A. I.; VOSTAL, J. G. Serial oxygen equilibrium and kinetic measurements during RBC storage. *Transfusion Medicine*, v. 20, p. 341-345, 2010.

GEO, S. G.; ALLAHVERDYAN, A. E.; GEVORGYAN, D. S.; HU, CHIN-KUN. Thermal-induced force release in oxyhemoglobin. *Nature*, v. 5, p. 13064, 2015.

GEVORKIAN, S. G.; ALLAHVERDYAN, A. E.; GEVORGYAN, D. S.; CHIN-KUN, H. Thermal-induced force release in oxyhemoglobin. *Scientific reports*, v. 5, p. 13064, 2015.

GIBB, B.C. Supramolecular stereochemistry. *Journal of Supramolecular Chemistry*, v. 2, p. 123-131, 2002.

GIBSON, Q. H. Stopped flow apparatus for the study of rapid reactions. *Discussions of the Faraday Society*, v. 17, p. 137-139, 1954.

GIBSON, Q. H.; MILNES L. Apparatus for rapid and sensitive spectrophotometry. *Biochemical Journal*, v. 91, p. 161-171, 1964.

GIBSON, Q. H.; HASTINGS, J. W.; GREENWOOD, C. On the Molecular Mechanism of Bioluminescence, Ii. Light-Induced Luminescence. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 53, p. 187-195, 1965.

GIBSON, Q. H. The reaction of oxygen with hemoglobin and the kinetic basis of the effect of salt on binding of oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 245, p. 3285, 1970.

GIBSON, Q. H. Hemoglobin Kinetics - A Retrospect. In *Selected Topics in the History of Biochemistry Personal Recollections*. G. Semenz, and A. J. Turner, Amsterdam: Elsevier, p 101-197, 2004.

GOLDBERG, D. E. Genetic Algorithms in search, optimization, and machine learning. Reading, MA: Addison-Wesley, 1989.

GONÇALVES, P. J.; BORISSEVITCH, I. E.; ZÍLIO, S.C. Effect of protonation on the singlet–singlet excited-state absorption of meso-tetrakis (p-sulphonatophenyl) porphyrin. *Chemical Physics Letters*, v. 469, n. 4-6, p. 270-273, 2009.

GRILLO, I. Applications of stopped-flow in SAXS and SANS. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 14, p. 402–408, 2009.

HARTRIDGE, H.; ROUGHTON, F. J. W. A Method of measuring the velocity of very rapid chemical reactions. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 104, p. 376-394, 1923.

HARVEY, R. A.; BORCHERDT, W. O. Variable Ratio Stopped-flow Mixing Device. *Anal. Chem.*, v. 44, n. 11, p. 1926-1928, 1972.

HAUPT, R. L.; HAUPT, S. E. *Practical genetic algorithms*. 2nd ed, John Wiley & Sons, Inc., 1998.

HIGGS, D. R., ENEGEL, J. D., STAMATOYANNOPOULOS, G. Thalassaemia. *Lancet*, v. 379, p. 373–383, 2012.

HILL, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *The Journal of Physiology*, v. 40, IV, 1910.

HOLLAND, J. H. *Adaptation in Natural and Artificial Systems*. Ann Arbor: University of Michigan Press, 1975.

HOLLAND, R.A.B.; SHIBATA, H.; SCHEID, P.; PIIPER, J. Kinetics of O₂ uptake and release by red cells in stopped-flow apparatus: effects of unstirred layer. *Respiration Physiology*, v. 59, 71-91, 1985.

IVORRAA, B.; MOHAMMADIB, B.; RAMOSA, A. M. A multi-layer line search method to improve the initialization of optimization algorithms. *European Journal of Operational Research*, v. 247, p. 711–720, 2015.

IZMAILOV, A.; SOLODOV, M. *Otimização: Métodos Computacionais*, v. 2 e Volume 1: Condições de otimalidade, v. 1, IMPA, Rio de Janeiro, 2007.

JIA, Y; WOOD, F.; MENU, P.; FAIVRE, B.; CARON, A.; ALAYASH A. I. Oxygen binding and oxidation reactions of human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1672, p. 164– 173, 2004.

JIA, Y; WOOD, F.; BUEHLER, P.W.; ALAYASH, A. I. Haptoglobin preferentially binds β but not α subunits cross-linked hemoglobin tetramers with minimal effects on ligand and redox reactions. *PLOS One*, v. 8, n. 3, p. e59841, 2013.

JENSEN B.; STORZ J. F.; FAGO A. Bohr effect and temperature sensitivity of hemoglobins from highland and lowland deer mice. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 195, p. 10-14, 2016.

JOHNSON, M. B.; ADAMSON J. G.; MAUK, A.G. Functional comparison of specifically cross-linked hemoglobins biased toward the R and T States. *Biophysical Journal*, v. 75, p. 3078-3084, 1998.

JORGE, S. E. D. C.; PETRUK, A. A.; KIMURA, E. M.; OLIVEIRA, D. M.; CAIRE, L.; SUEMASU, C. N.; SILVEIRA, P. A. A.; ALBUQUERQUE, D. M.; COSTA, F. F.; SKAF, M. S.; MARTÍNEZ, L.; SONATI, M. F. Hb S-São Paulo: A new sickling hemoglobin with stable polymers and decreased oxygen affinity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 519, n. 1, p. 23-31, 2012.

KLOTZ, I. M. Hemoglobin-Oxygen equilibria: retrospective and phenomenological perspective. *Biophysical Chemistry*, v. 100, p. 123– 129, 2003.

KIRKPATRICK, S., C. D.; GELATT, J.R.; VECCHI, M. P. Optimization by simulated annealing. *Science*, v. 220, p. 671–680, 1983.

KHORASSANI, S. M. H; EBRAHIMI, A.; MAGHSOODLOU, M. T.; SHAHRAKI, M.; PRICE, D.; PAKNAHAD, A. A novel high performance stopped-flow apparatus equipped with a special constructed mixing chamber containing a plunger under inert condition with a very short dead-time to investigate very rapid reactions. *Arabian Journal of Chemistry*, p. 1-12, 2011.

LAMBETH, D. O.; PALMERS G. The Kinetics and mechanism of reduction of electron transfer proteins and other compounds of biological interest by dithionite. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 246, n. 17, p. 6095-6103, 1973.

LEOW, M. K. Configuration of the hemoglobin oxygen dissociation curve demystified: a basic mathematical proof for medical and biological sciences undergraduates. *Advances in Physiology Education*, v. 31, p. 198–201, 2007.

LEPESHKEVICH, S. V.; GILEVICH, S. N.; PARKHATS, M. V.; DZHAGAROV, B. M. Molecular oxygen migration through the xenon docking sites of human hemoglobin in the R-state. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1864, p. 1110-1121, 2016.

LI H., WEI X., ZHANG Y., XU Y., KAI LU, LI C., YAN Y. Rapid and sensitive detection of hemoglobin with gold nanoparticles based fluorescence sensor in aqueous solution. *Journal of Alloys and Compounds*, p. 31843-31846, 2016.

LORENZI, T. F. *Manual de hematologia: propedêutica e clínica*. Ed. Guanabara Koogan, quarta edição, p. 1-710, 2006.

MCKENNA, C. E.; GUTHEIL, W. G.; SONG, W. A method for preparing analytically pure sodium dithionite. Dithionite quality and observed nitrogenase-specific activities. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1075, n. 1, p. 109-117, 1991.

MOREIRA, L.M.; MORAES, P.C.G.; MENDONÇA, J.P.R.F.; GUIMARÃES, L.; LYON, J.P.; AIMBIRE, F.; POLI, A.L.; IMASATO, H. Hemoglobina extracelular gigante de *glossoscolex paulistus*: um extraordinário sistema supramolecular hemoproteico. *Química Nova*, v. 34, n. 1, p. 119-130, 2011.

MULQUINEY, P.J.; KUCHEL, P.W. Model of 2,3-biphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: computer simulation and Metabolic Control Analysis. *Biochemical Journal*, v. 342, p. 597-604, 1999.

NAOUM, P. C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M. S. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, v. 26, n. 1, p. 19-22, 2004.

NAPOLITANO, L.M. Hemoglobin-based oxygen carriers: first, second or third generation? Human or bovine? Where are we now? *Critical Care Clinics*, v. 25, n. 2, p. 279-301, 2009.

OKONJO K. O. Bohr effect of hemoglobins: Accounting for differences in magnitude. *Journal of Theoretical Biology*, v. 380, p. 436–443, 2015.

PEÑUELA, O. A. Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica*, v. 36, n. 03, 2005.

PERCY, M. J., LAPPIN, T. R. Recessive congenital methaemoglobinaemia: cytochrome b (5) reductase deficiency. *British Journal of Haematology*, v. 141, n. 3, p. 298-308, 2008.

PEI, Y.; ZHU, D. Local convergence of a trust-region algorithm with line search filter technique for nonlinear optimization. *Applied Mathematics and Computation*, v. 273, p. 797-808, 2016.

PEINTLER, G.H.; NAGY A.; HORVÁTH A. K.; KÖRTVÉLYESI T.; NAGYPÁL I. Improved calibration and use of stopped-flow instruments. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 2, p. 2575-2586, 2000.

PERUTZ, M. F. Structure of hemoglobin. *Nature (London)*, v. 185, p. 416-422, 1960.

PERUTZ, M. F. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Annual Review of Biochemistry*, v. 48, p.327-386, 1979.

PERUTZ, M. F. Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *Annual Review of Physiology*, v. 52, p. 1-25, 1990.

PERUTZ, M. F., WILKINSON, A. J., PAOLI, M., DODSON, G. G. The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v. 27, p. 1-34, 1998.

PORTER, G.; NORRISH, R.D.W. *Nature*, v. 164, p. 658, 1949.

RAO, SINGIRESU S. *Engineering optimization: theory and practice*. 4th ed, John Wiley & Sons. Inc., 2009.

REN, Z. Reverse Engineering the cooperative machinery of human hemoglobin. *PLOS one*, v. 8, n. 11, p. e77363, 2013.

ROSELL, F. I.; MAUK, A. G. Photochemical reagents for the study of metalloproteins by flash photolysis. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 255, p. 737-756, 2011.

SASAGAWA, K.; IMAI, K.; KOBAYASHI, M. Influence of allosteric effectors and temperature on oxygen binding properties and bohr effect of bovine hemoglobin. *Zoological Science*, v. 23, p. 565-572, 2006.

SAWICKI, C.A., GIBSON, Q.H. Quaternary conformational changes in human oxyhemoglobin studied by laser photolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 252, p. 5783-5788, 1977.

SEMA, T.; NAAMI, A.; LIANG, Z.; SHI, H.; RAYER, A.V.; SUMON, K.Z.; WATTANAPHAN, P.; HENNI, A.; IDEM, R.; SAIWAN, C.; TONTIWACHWUTHIKUL, P. Part 5b: solven chemistry: reaction kinetics of CO₂ absorption into reactive amine solutions. *Carbon Manag.*, v. 3, p. 201-220, 2012.

SOUZA, M. P. Protocolo experimental para o estudo da cinética de desoxigenação da hemoglobina pelo método de fluxo interrompido. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

SOWOLE, M. A.; VUONG, S.; KONERMANN L. Interactions of hemoglobin and myoglobin with their ligands CN⁻, CO, and O₂ monitored by electrospray ionization-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2015.

STORZ, J. F.; MORIYAMA, H. Mechanisms of hemoglobin adaptation to high altitude hypoxia. *High altitude Medicine & Biology*, v. 09, n. 02, p. 148 – 156, 2008.

STEWART, A. J.; OUELLET, L. A Stopped-Flow Mixing Device for the Spectrophotometric Study of Rapid Reactions. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 37, n. 4, p. 744-750, 1959

TAKAYANAGI, M.; KURISAKI, I.; NAGAOKA, M. Non-site-specific allosteric effect of oxygen on human hemoglobin under high oxygen partial pressure. *Scientific Reports* 4, article number: 4601, 2014.

THOMAS, C.; LUMB, A. B. Physiology of haemoglobin. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, v. 12, n. 05, p. 251-256, 2012.

TSURUGA, M.; MATSUOKA, A.; HACHIMORI, A.; SUGAWARA, Y.; SHIKAMA, K. The molecular mechanism of autoxidation for human oxyhemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 15, p. 8607–8615, 1998.

VIEIRA, D. A. G.; LISBOA, A. C. Line search methods with guaranteed asymptotical convergence to an improving local optimum of multimodal functions. *European Journal of Operational Research*, n. 1, v. 235, p. 38–46, 2014.

VOET, D.; VOET, J. C.; PRATT, C. W. *Biochemistry*. John Wiley e Sons (Artmed), 4 ed., p. 182-195, 2014.

WALTEMATH, C.L. Oxygen, uptake, transport, and tissue utilization. *Journal: Anesthesia and Analgesia*, v. 49, n.01, p. 184-20, 1970.

WARANG, P.P.; KEDAR, P.S.; SHANMUKAIAH, C.; GHOSH, K.; COLAH R.B. Clinical spectrum and molecular basis of recessive congenital methemoglobinemia in India. *Clinical Genetics*, v. 87, n. 1, p. 62-67, 2015.

WEBER, R.E. Use of ionic and zwitterionic (Tris/BisTris and HEPES) buffers in studies on hemoglobin function. *The American Physiological Society*, p. 1611-1615, 1992.

WEBER, R.E.; FAGO, A.; MALTE, H.; STORZ, J. F.; GORR, T. A. Lack of conventional oxygen-linked proton and anion binding sites does not impair allosteric regulation of oxygen binding in dwarf caiman hemoglobina. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 305, p. R300-R312, 2013.

WIREKO, F. C.; ABRAHAM, D. J. The Crystal state binding of dithionite to deoxy-hemoglobin. *Protein Engineering*, v. 5, n. 1, p. 3-5, 1992.

YANG, N.; ZHANG, S.; KUO, P.; QU, M.; FANG, J.; LI, J.; HUA, Z. Photo-dissociation quantum yields of mammalian oxyhemoglobin investigated by a nanosecond laser technique. *Research Communications*, v. 353, p. 953–959, 2007.

YONETANI, T.; PARK S.; TSUNESHIGE, A.; IMAI, K.; KANAORI, K. Global allostery model of hemoglobin: modulation of O_2 affinity, cooperativity, and bohr effect by heterotropic allosteric effectors. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 34508-34520, 2002.

YONETANI, T.; LABERGE, M. Protein dynamics explain the allosteric behaviors of hemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1784, n. 9, p. 1146–1158, 2008.

YONETANI, T.; KANAORI, K. How does hemoglobin generate such diverse functionality of physiological relevance? *Biochimica et Biophysica Acta*, p. 1873–1884, 2013

APÊNDICE A – Procedimento experimental

1) META-HEMOGLOBINA (DIXON & MCINTOSH, 1967)

De acordo com o fabricante Sigma-Aldrich 20 mg de meta-hemoglobina humana devem ser dissolvidas em 1 mL de água destilada qsp. A diluição foi feita pesando 200 mg de meta-hemoglobina para 10 mL de água destilada qsp, conforme descrito.

20 mg = 0,02 g MetaHb ----- 1mL água ou tampão

2) REDUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA META-HEMOGLOBINA EM OXI-HEMOGLOBINA (DIXON & MCINTOSH, 1967)

a) a redução da meta-Hb e sua posterior purificação para oxi-Hb foi realizada em coluna cromatográfica de filtração em gel de exclusão chamado Sephadex G-25. O Sephadex G-25 é fornecido como um pó seco e deve ser reidratado com excesso de tampão em um bquer de 50 mL antes de inserir na coluna cromatográfica de vidro com 2 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento. Foi pesado 14 g de Sephadex G-25 para o preparo de aproximadamente 23 cm de resina na coluna seguindo as instruções do fabricante. A separação dos componentes é realizada pela resina Sephadex G-25, onde as moléculas pequenas (fosfatos orgânicos) ficam aderidas nos poros e as grandes (oxi-hemoglobina) são eluídas pela coluna como é previsto pela técnica.

b) deve-se reequilibrar o pH utilizando uma solução de 100 mL do tampão Hepes sódico-ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1 sal sódico pH 7,4 ($C_8H_{18}N_2O_4S$) contendo 0,1 mL de heparina, até que o pH de entrada seja o mesmo de saída. Após eluir todo o tampão aplicou-se 2 mL de ditionito de sódio ($Na_2S_2O_4$) acrescido de 1 mL de tampão. Em seguida, foi inserido 10 mL da solução de meta-Hb para descer na coluna por ação da gravidade. Após o término de todo o procedimento deve-se lavar a resina de Sephadex G-25 com uma solução de hidróxido de sódio 0,2 M (NaOH) e depois com água destilada. Para que a coluna nunca seque sempre se deve deixa-la hidratada com água destilada.

c) o tampão (fase móvel) deve ser aplicado aos poucos para a meta-Hb entrar em contato com o ditionito de sódio, mantendo um fluxo contínuo da fase móvel até o final de toda eluição. Após a aplicação da meta-Hb na coluna, iniciou-se a coleta da mesma desprezando-se o início e o final da

amostra de oxi-Hb eluída. Toda a amostra de oxi-Hb recolhida foi submetida à diálise por 24 h sob agitação e refrigeração constante para concluir a confirmação de seu grau de pureza e retirar totalmente o excesso de ditionito de sódio.

d) a oxi-Hb foi quantificada pelo método de Drabkin. A redução da meta-Hb para sua forma oxigenada foi comprovada pelo espectro de absorção dentro da faixa de 390 a 650 nm, de acordo com a literatura.

Cálculo do tampão HEPES 50 mM pH 7,4

$$m \text{ (g)} = PM \text{ (g/mol)} \cdot V \text{ (L)} \cdot M$$

$$m = 260,29 \text{ g/mol} \cdot 0,5 \text{ L} \cdot 0,05 \text{ M}$$

$$m = 6,5 \text{ g}$$

$$6,5 \text{ g} \text{ ----} 100\% \text{ grau de pureza}$$

$$x \text{ g} \text{ ----} 97\% \text{ grau de pureza}$$

$$x = 6,38 \text{ g de HEPES para } 500 \text{ mL água destilada qsp}$$

Cálculo do NaOH 0,2 M

$$m \text{ (g)} = PM \text{ (g/mol)} \cdot V \text{ (L)} \cdot M$$

$$m = 40 \text{ g/mol} \cdot 0,5 \text{ L} \cdot 0,2 \text{ M}$$

$$m = 4 \text{ g}$$

$$4 \text{ g} \text{ -----} 100\% \text{ grau de pureza}$$

$$x \text{ g} \text{ -----} 97\% \text{ grau de pureza}$$

$$x = 3,88 \text{ g de NaOH para } 500 \text{ mL água destilada qsp}$$

3) DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA LIVRE (DRABKIN, 1948 e 1950)

O método para determinação da hemoglobina em amostras de sangue total da Labtest é por reação colorimétrica de ponto final. O ferro (Fe^{2+}) do grupo heme da hemoglobina, oxi-hemoglobina e carboxi-hemoglobina é oxidado ao estado férrico (Fe^{3+}) pelo ferricianeto formando hemiglobina (Hi), que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemiglobina (HiCN). Esse produto resultante é mensurado por absorbância em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 no comprimento de onda de 540 nm.

Amostras	Teste
Reagente de cor	5,0 mL
Sangue total	0,02 mL ou 20 µl
Padrão	0,02 mL ou 20 µl

Depois de misturar todos os reagentes, deve-se esperar 5 min. Mensurar as absorvâncias em 540 nm, acertando o zero com reagente de cor. O valor da concentração obtido em g/dL foi calculado utilizando o fator de calibração com o “padrão de hemoglobina da Labtest” de 10 g/dL.

Cálculo:

O cálculo deve ser feito utilizando o produto do “padrão de hemoglobina da Labtest”.

$$\text{Hemoglobina} \left(\frac{\text{g}}{\text{dL}} \right) = 10 \cdot \frac{\text{Absorvância do teste}}{\text{Absorvância do padrão}}$$

4) PREPARAÇÃO DA HEMOGLOBINA DESOXIGENADA (HOLLAND *et al*, 1985; DIXON & MCINTOSH, 1967)

- a) Após amostra de oxi-Hb ser purificada e estabelecido o valor de sua concentração, foram iniciados os experimentos de desoxigenação no equipamento *SFM 4000/S* pelo método de mistura rápida com fluxo interrompido. Foram utilizadas quatro seringas de 10 mL novas e estéreis para o procedimento, inserindo a amostra de oxi-Hb na posição 4 do equipamento para ser analisada. Na posição 1 e 2 foram colocadas as seringas contendo tampão Hepes e na posição 3 a seringa com o agente redutor ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).
- b) Pesar 0,075 g de ditionito de sódio 8,6 mM (PM = 174,11) e dissolver em 50 ml de tampão Hepes qsp. Colocar a solução na seringa de 10 ml para ser utilizada no equipamento na posição 3. Utilizar essa solução para desoxigenar a oxi-Hb que foi purificada.
- c) Ajustar o equipamento *MOS/200* na faixa de absorvância em 415 nm (região da banda de *Soret*), efetuar 20 disparos para cada concentração de oxi-Hb a ser avaliada e analisar todos os resultados obtidos pelos gráficos de absorvância em função do tempo (s).

APÊNDICE B – Programa computacional

```

!*****
! Programa para determinar melhores constantes cinéticas
! Programa desenvolvido por Adriana Teixeira, Thais A.P. Bartié
! Leonel Teixeira Pinto
!*****
MODULE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER,
  PARAMETER::n_pontos=391,n_conjuntos=50,n_tentativas=100,n_teste
s=10
  INTEGER, PARAMETER:: Nmax_time = 20000

  !INTEGER, PARAMETER::teste_calibracao =1 !Encontra valores
entre oxi e desoxi
  !INTEGER, PARAMETER::teste_calibracao =2 !Encontrar valores
livremente
  !INTEGER, PARAMETER::teste_calibracao =3 !Ordem crescente
  INTEGER, PARAMETER::teste_calibracao =4 !Restrição
  INTEGER::n_experimentos
  REAL*8 ::Concentracao_inicial(100),Absorbancia(100,n_pontos),&
tempo_experimental (100, n_pontos), total_time
  REAL*8
  ::der_HB(100,5,Nmax_time),C_HB(100,5,Nmax_time+1),Abs_modelo,
  REAL*8 ::k(7,n_conjuntos),coeficiente(5), erro(n_conjuntos),
erro_pseudo
  REAL*8 ::k_inferior, k_superior, intervalo_k, a_inferior,
a_superior,& intervalo_a, k_pseudo
  REAL*8 ::delta_t,
error_evolution(n_tentativas),erro_acumulado(n_tentativas)
  REAL*8 ::erro_acumulado_melhores(n_tentativas)
  REAL*8 ::theoretical_curve_pseudo(100, n_pontos+1),
theoretical_curv(100, n_pontos+1)
  REAL*8 ::Concentracao(5,100,n_pontos+1),
Concentracao_pseudo(5,100,n_pontos+1)
END MODULE VarGlob
! -----
PROGRAM Hb_Ox_constantes
  USE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER ::
i,j,m,nt,n_conjuntos_acasalamento,n_trocas,n_ii,nnn,n_exp,teste
  REAL*8 :: ran, aux1, aux2(7), delta, ks_minimos(101,7)
  CHARACTER:: square*3
! -----
! Le arquivos com as concentrações iniciais e os dados
experimentais
! -----
  CALL dados_iniciais ()
  CALL dados_experimentais ()
! -----
! Definição dos parâmetros numéricos
! -----

```

```

CALL parametros_numericos ()
! -----
! Cria os arquivos
! -----
OPEN(200, file = "Constantes_030.txt")
DO i = 1, n_testes ; WRITE(square,'(i3)') i
OPEN(200+i, file = "erros_030"//square//".txt"); ENDDO
DO i = 1, n_testes ; WRITE(square,'(i3)') i
OPEN(300+i, file = "curvas_finais_030"//square//".txt");
ENDDO
DO i = 1, n_testes ; WRITE(square,'(i3)') i
OPEN(400+i, file = "Concentração B(1)_030"//square//".txt")
OPEN(500+i, file = "Concentração B(2)_030"//square//".txt")
OPEN(600+i, file = "Concentração B(3)_030"//square//".txt")
OPEN(700+i, file = "Concentração B(4)_030"//square//".txt")
OPEN(800+i, file = "Concentração B(5)_030"//square//".txt")
ENDDO
! -----
DO teste = 1, n_testes
50 write(*,*) teste
! -----
! Cálculo dos primeiros coeficientes
! -----
DO m = 1, n_conjuntos
CALL calculo_k (m); ENDDO
! -----
! Looping das tentativas
! -----
DO nt = 1, n_tentativas
write(*,*) nt
! -----
! Resolve o modelo com os valores de K estimados e calcula o
erro
! -----
DO m = 1, n_conjuntos
CALL equacoes_modelo(m, 1); ENDDO
! -----
! Ordena os valores do erro, do menor para o maior
! -----
1 n_trocas = 0
DO n = 1, n_conjuntos-1
aux1 = erro(n+1)
DO j=1,7;aux2(j) = k(j,n+1); ENDDO
IF ( erro(n) .GT. aux1 ) THEN
n_trocas = n_trocas + 1
! -----
erro(n+1) = erro(n)
DO j=1,7;k(j,n+1) = k(j,n); ENDDO
! -----
erro(n) = aux1
DO j=1,7;k(j,n) = aux2(j); ENDDO
! -----
ENDIF
ENDDO

```

```

      IF (n_trocas.GT.0) GOTO 1
      error_evolution(nt) = erro(1)
      DO ii=1,7; ks_minimos(nt,ii) = k(ii,1); ENDDO
! -----
! cria nova geração por crossover - ACASALAMENTO - parâmetros
cinéticos
! -----
      n_conjuntos_acasalamento= n_conjuntos/5 ; nnn = 3
      DO n = 1, nnn
      DO i = 1,2
      k(i, n+n_conjuntos_acasalamento) = k(i, n)
      k(i, n+n_conjuntos_acasalamento + nnn) = k(i, n+nnn)
      k(i+2, n+n_conjuntos_acasalamento) = k(i+2, n+nnn)
      k(i+2, n+n_conjuntos_acasalamento + nnn) = k(i+2, n)
      ENDDO
      ENDDO
! -----
! cria nova geração por crossover - ACASALAMENTO - parâmetros
curva de calibração
! -----
      k(5, n_conjuntos_acasalamento + 2*nnn+1) = k(5, 8)
      k(6, n_conjuntos_acasalamento + 2*nnn + 1) = k(6, 7)
      k(7, n_conjuntos_acasalamento + 2*nnn + 1) = k(7, 7)
      k(5, n_conjuntos_acasalamento + 2*nnn + 2) = k(5, 8)
      k(6, n_conjuntos_acasalamento + 2*nnn + 2) = k(6, 8)
      k(7, n_conjuntos_acasalamento + 2*nnn + 2) = k(7, 7)
      k(5, n_conjuntos_acasalamento + 2*nnn + 3) = k(5, 9)
      k(6, n_conjuntos_acasalamento + 2*nnn + 3) = k(6, 10)
      k(7, n_conjuntos_acasalamento + 2*nnn + 3) = k(7, 9)
      k(5, n_conjuntos_acasalamento + 2*nnn + 4) = k(5, 10)
      k(6, n_conjuntos_acasalamento + 2*nnn + 4) = k(6, 9)
      k(7, n_conjuntos_acasalamento + 2*nnn + 4) = k(7, 10)
! -----
! prepara as regiões 3 e 4 para fazer mutação
! -----
      DO n = 1, 2*n_conjuntos_acasalamento
      DO i = 1,7
      k(i,n+2*n_conjuntos_acasalamento) = k(i,n)
      ENDDO
      ENDDO
! -----
! cria geração mutante com os melhores e os filhos
! -----
      delta = 0.30D00
      DO n = 2*n_conjuntos_acasalamento+1,
4*n_conjuntos_acasalamento
      DO i = 1,7
      CALL RANDOM_NUMBER(ran)
      IF (ran.LE.delta) THEN
      IF (i .LE. 4) k(i,n) = k_inferior + ran * intervalo_k
      IF (i .GT. 4) k(i,n) = a_inferior + ran * intervalo_a
      ENDIF
      ENDDO
      ENDDO

```

```

! -----
! cria novos k para as últimas Nk5 posições da geração
! -----
      DO n = 4*n_conjuntos_acasalamento+1,
5*n_conjuntos_acasalamento
          CALL calculo_k (n)
      ENDDO
! -----
      ENDDO
! -----
! SALVA
! -----
      CALL equacoes_modelo(1, 2)
      DO n_exp = 1, n_experimentos
          IF (Concentracao(1,n_exp,n_pontos).LT.
0.9D00*Concentracao_inicial(n_exp)) THEN
write(*,*)Concentracao(1,n_exp,n_pontos), &
Concentracao_inicial(n_exp)
GO TO 50
          ENDIF
      ENDDO
write(200,7) delta, teste, erro(1), (k(i,1), i=1,7)
      DO nt = 1, n_tentativas
WRITE(200+teste,8) nt,error_evolution(nt), &
(ks_minimos(nt,ii),ii=1,7)
      ENDDO
      DO i = 1, n_pontos
WRITE(300 + teste, 9) tempo_experimental(1,i), &
(Absorbancia (n_exp, i) n_exp=1,n_experimentos) &
(theoretical_curv(n_exp, i), n_exp=1,n_experimentos)
      ENDDO
      DO j = 1, n_pontos
WRITE(400+teste,10) tempo_experimental(1,j) &
(Concentracao(1,n_exp, j), n_exp=1,n_experimentos)
WRITE(500+teste,10) tempo_experimental(1,j), &
(Concentracao(2,n_exp, j), n_exp=1,n_experimentos)
WRITE(600+teste,10) tempo_experimental(1,j), &
(Concentracao(3,n_exp, j), n_exp=1,n_experimentos)
WRITE(700+teste,10) tempo_experimental(1,j) &
(Concentracao(4,n_exp, j), n_exp=1,n_experimentos)
WRITE(800+teste,10) tempo_experimental(1,j) &
(Concentracao(5,n_exp, j), n_exp=1,n_experimentos)
      ENDDO
! -----
ENDDO
! -----
! Modelo de pseudo primeira ordem
! -----
      CALL modelo_pseudo (2)
      DO i = 1, n_testes
WRITE(200+i,*) "erro_pseudo", erro_pseudo
      ENDDO
! -----
7 format(f4.1, i2, 7(e13.6,""), e13.6)

```

```

8 format(i4, 7(e13.6,""), e14.6)
9 format(f13.5,"", 9(f12.6, " "), f12.6)
10 format(f13.5,"", 4(f12.6, " "), f12.6)
! -----
END

SUBROUTINE dados_iniciais
  USE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER :: i
! -----
  OPEN (1, file="Concentracoes_iniciais.txt")
  READ(1,*) ; READ(1,*) n_experimentos
  DO i = 1, n_experimentos
    READ(1,*) Concentracao_inicial(i)
    C_HB(i,1,1) = 0.0D00 ; C_HB(i,2,1) = 0.0D00;
C_HB(i,3,1) = 0.0D00
    C_HB(i,4,1) = 0.0D00 ; C_HB(i,5,1) =
Concentracao_inicial(i)
  ENDDO
! -----
END

SUBROUTINE dados_experimentais( )
  USE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER :: i, j
  REAL*8 :: total_time_teste
  CHARACTER :: square*3
! -----
  total_time = 4.0D00
  DO i = 1, n_experimentos
    WRITE(square,'(i3)') i
    OPEN(i+1, file = "Experimento"//square//".txt")
    READ(i+1,*)
    DO j = 1, n_pontos
      READ(i+1,*) tempo_experimental(i,j), Absorbancia(i,j) &
tempo_experimental(i,j) = tempo_experimental(i,j)
    ENDDO
    total_time_teste = tempo_experimental(i,n_pontos)
    IF (total_time_teste .LT. total_time) total_time =
total_time_teste
  ENDDO
! -----
END

SUBROUTINE parametros_numericos ( )
  USE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER :: m
! -----
  k_inferior=0.0D00 ; k_superior=4.0D03 ; intervalo_k
=k_superior-k_inferior
  coeficiente(1) = 0.0058D00; coeficiente(5) = 0.0094D00

```

```

      IF (teste_calibracao.EQ.1.OR.teste_calibracao.EQ.3.OR.
         teste_calibracao .EQ.4) THEN
a_inferior = coeficiente(1); a_superior = coeficiente(5)
      ENDIF
      IF (teste_calibracao .EQ. 2) THEN
         a_inferior = 0.0000D00; a_superior = 1.5000D00
      ENDIF
      intervalo_a = a_superior - a_inferior
      coeficiente(1) = a_inferior ; coeficiente(5) = a_superior
      k_pseudo = 45.4D00 ; delta_t = total_time / Nmax_time
! -----
END

```

```

SUBROUTINE calculo_k (m)
  USE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER :: i,m
  REAL*8  :: ran
! -----
  DO i = 1,4
     CALL RANDOM_NUMBER(ran) ; k(i,m) = k_inferior + ran *
intervalo_k
  ENDDO
  DO i = 5,7
     IF (teste_calibracao .EQ.1) THEN
CALL RANDOM_NUMBER(ran);k(i,m)= a_inferior + ran * intervalo_a
     ENDIF
     IF (teste_calibracao .EQ.2) THEN
CALL RANDOM_NUMBER(ran);k(i,m)= a_inferior + ran * intervalo_a
     ENDIF
     IF (teste_calibracao .EQ.3) THEN
1      CALL RANDOM_NUMBER(ran)
        IF (i .EQ. 5 .AND. ran .EQ. 0.0D00) GO TO 1
        k(i,m) = a_inferior + ran * intervalo_a
        IF (i .NE. 5) THEN
           IF (k(i,m) .LT. k(i-1,m)) GO TO 1
        ENDIF
     ENDIF
     IF (teste_calibracao .EQ.4) THEN
2      CALL RANDOM_NUMBER(ran) ; k(i,m) = a_inferior +
ran * intervalo_a
        IF (k(i,m) .LE. coeficiente(1) + (i-5)*intervalo_a/3
.OR. k(i,m) .GE. coeficiente(1) + (i-4)*intervalo_a/3) GO TO 2
     ENDIF
  ENDDO
! -----
END

```

```

SUBROUTINE equacoes_modelo(m, j)
  USE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER :: n, n_exp, n_tempo, i, m, j
  REAL*8  :: tempo_modelo(2), aux1
  REAL*8  :: C_HB_int(5), Abs_int

```

```

! -----
  erro(m) = 0.0D00
  DO i = 2, 4 ; coeficiente(i) = k(i+3,m) ; ENDDO
! -----

      DO n_exp = 1, n_experimentos
        n_tempo = 1
        DO n = 1, Nmax_time
          tempo_modelo(1) = (n-1)*delta_t
          tempo_modelo(2) = tempo_modelo(1) + delta_t
          der_HB(n_exp,1,n) = k(1,m)*C_HB(n_exp,2,n)
          der_HB(n_exp,2,n) = -k(1,m)*C_HB(n_exp,2,n) +
k(2,m)*C_HB(n_exp,3,n)
          der_HB(n_exp,3,n) = -k(2,m)*C_HB(n_exp,3,n) +
k(3,m)*C_HB(n_exp,4,n)
          der_HB(n_exp,4,n) = -k(3,m)*C_HB(n_exp,4,n) +
k(4,m)*C_HB(n_exp,5,n)
          der_HB(n_exp,5,n) = -k(4,m)*C_HB(n_exp,5,n)
          DO i = 1, 5
            C_HB(n_exp,i,n+1) = C_HB(n_exp,i,n)+der_HB(n_exp,i,n)*delta_t
          ENDDO
          IF (tempo_modelo(2) .GE.
tempo_experimental(n_exp,n_tempo)) THEN
            aux1 = tempo_experimental(n_exp,n_tempo)-tempo_modelo(1)
            Abs_modelo = 0.0D00
            DO i = 1,5
              C_HB_int(i)=(C_HB(n_exp,i,n+1)-C_HB(n_exp,i,n)) &
                *aux1/delta_t +
C_HB(n_exp,i,n)
              Abs_int = coeficiente(i)*C_HB_int(i)
              Abs_modelo = Abs_modelo + Abs_int
            ENDDO
            erro(m) =erro(m)+(Abs_modelo-Absorbancia(n_exp,n_tempo))**2
            IF (j.EQ.2) THEN
              theoretical_curv(n_exp, n_tempo) = Abs_modelo
              DO i =1,5
                Concentracao(i,n_exp, n_tempo) = C_HB_int(i)
              ENDDO
            ENDIF
            n_tempo = n_tempo + 1
          ENDDIF
        ENDDO
      ENDDO
! -----
END

SUBROUTINE modelo_pseudo (j)
  USE Varglob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER :: n, n_exp, j, n_tempo
  REAL*8 :: tempo_modelo(2), aux1
  REAL*8 :: C_HB_int(5)
! -----
  erro_pseudo = 0.0D00
! -----

```

```

DO n_exp = 1, n_experimentos
  n_tempo = 1
  DO n = 1, Nmax_time
    tempo_modelo(1) = (n-1)*delta_t
    tempo_modelo(2) = tempo_modelo(1) + delta_t
    der_HB(n_exp,5,n) = -k_pseudo*C_HB(n_exp,5,n)
    C_HB(n_exp,5,n+1) = C_HB(n_exp,5,n)+der_HB(n_exp,5,n)*delta_t
    C_HB(n_exp,1,n+1) = C_HB(n_exp,5,1) - C_HB(n_exp,5,n+1)
    IF (tempo_modelo(2) .GE.
tempo_experimental(n_exp,n_tempo)) THEN
      aux1 = tempo_experimental(n_exp,n_tempo)-tempo_modelo(1)
      C_HB_int(1) = (C_HB(n_exp,1,n+1) - &
      C_HB(n_exp,1,n))*aux1/delta_t + C_HB(n_exp,1,n)
      C_HB_int(5) = (C_HB(n_exp,5,n+1) - &
      C_HB(n_exp,5,n))*aux1/delta_t + C_HB(n_exp,5,n)
      Abs_modelo = coeficiente(1)*C_HB_int(1) + &
      coeficiente(5)*C_HB_int(5)
      erro_pseudo = erro_pseudo + (Abs_modelo - &
      Absorbancia(n_exp,n_tempo))**2
      IF (j.EQ.2) THEN
        theoretical_curve_pseudo(n_exp, n_tempo)= Abs_modelo
        Concentracao_pseudo(1,n_exp, n_tempo) = C_HB_int(1)
        Concentracao_pseudo(5,n_exp, n_tempo) = C_HB_int(5)
      ENDIF
      n_tempo = n_tempo + 1
    ENDIF
  ENDDO
ENDDO
! -----
END

MODULE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER,PARAMETER::n_pontos=391,n_conjuntos=272,Nmax_time=2000,
  n_parametros=7
  INTEGER ::n_experimentos, N_interations
  REAL*8 :: Absorbancia (100, n_pontos), tempo_experimental
  (100, n_pontos)
  REAL*8 :: der_HB(100,5,Nmax_time), C_HB(100,5,Nmax_time+1),
  Abs_modelo
  REAL*8 :: k(7,n_conjuntos), coeficiente(5),
  erro(n_conjuntos), delta_t
  REAL*8 :: theoretical_curv(100,n_pontos+1), Concentracao(5,
  100, n_pontos+1)
  REAL*8 :: Concentracao_inicial(100),total_time,a_inferior,
  a_superior, dif_a
  INTEGER :: i_conta_1, i_conta_2, IiterF, IiterP, i_convergencia,
  n_calculos_V
  REAL*8 :: valor_inicial_parametros(n_parametros),
  parametro(n_parametros), &
  valor_final_parametro(n_parametros)
  REAL*8 :: alfa_inicial, passo_inicial1, passo_inicial2,
  passo_inicial, alfa
  REAL*8 :: Erro1 , Erro2

```

```

REAL*8  :: V, V_inicial
INTEGER, PARAMETER :: n_tentativas = 10, NxN = 0, NyN = 272
REAL*8  :: VV(NyN), XX1(NyN,n_parametros)
END MODULE VarGlob
! -----
PROGRAM OTIMIZA01
  USE VarGlob
  USE Functions
  IMPLICIT NONE
  INTEGER i, j
  CALL dados_iniciais( )
  CALL dados_experimentais( )
  OPEN(n_experimentos+2, file =
"00000_random/x01_menores_erros_parametros_40.000f 0.10.txt")
  CALL constantes ( )
  CLOSE (n_experimentos+2)
  CALL inicializa_metodo_busca( )
  N_interations = 0
  DO j = 1, n_conjuntos
    N_interations = 0
    i_convergencia = 0
    DO i = 1, n_parametros
      valor_inicial_parametros(i) = k(i,j)
    ENDDO
    CALL executa_busca_altemada( j )
  ENDDO
! -----
! usado quando o programa é executado uma única vez para NyN
dados iniciais
! e os resultados gravados no mesmo arquivo.
! NyN = 0, esta estrutura não é executada.
! OPEN(20,file="subdiretorio/nome do arquivo.txt")
! -----
      IF (NyN.GT.0) THEN
OPEN(20,file="00000_random/x01_menores_erros_parametros_40.000f
0.10b.txt")
DO i = 1,NyN ; WRITE(20,21) i, erro(i), (XX1(i,j),j=1,7) ;
write(*,*) i ; ENDDO
      ENDF
! -----
21 FORMAT(i5,"",f14.8,"",4(f12.5,""),2(f12.8,""),f12.8)
END

SUBROUTINE inicializa_metodo_busca( )
  USE VarGlob
  IMPLICIT NONE
! -----
! Método de Busca Unidirecional :dimensionamento das variaveis
e parametros
! alfa_inicial = coeficiente de contração ou expansão do passo i
! passo_inicial = tamanho inicial do passo
! Erro1, Erro2=criterios para o valor da função e incremento
nos valores dos parametros i

```

```

! IterP, IterF = numero maximo de iteracoes para cada busca e
de iteracoes totais
  alfa_inicial = 5.0D-1 ; passo_inicial1 = 1.0D00 ; ;
passo_inicial2 = 1.0D-4
  Erro1 = 1.0D-10 ; Erro2 = 1.0D-8 ; IterP = 200 ; IterF =
300
END

SUBROUTINE executa_busca_alemada( n )
  USE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER j, n, nn_tenta_aqui, nnnn, n_lixo1, n_lixo2, j1, i,
N1(7), LOCAL
  REAL*8
  aux1,aux2,beta,diferenca,F1,F2,parametro_aux,parametro_aux1,
X1(6,8)
! -----
  n_lixo1 = 30 ; n_lixo2 = 20
  Do j = 1,n_parametros
  parametro(j) = valor_inicial_parametros(j)
  EndDo
  i_conta_1 = 1
  CALL PROBLEMA( n )
  V_inicial = V
! -----
  Do j1 = 1, n_experimentos
  IF (C_HB(j1,1,Nmax_time+1) .LT. C_HB(j1,5,1)*0.01 .OR. &
C_HB(j1,1,Nmax_time+1) .GT. C_HB(j1,5,1)*200.5) THEN
  WRITE(*,*) j1, "caiu fora " ; GO TO 110 ; ENDIF
  EndDo
! -----
1  Continue
  i_convergencia = 0
  aux1 = 0
  N_interations = N_interations + 1
114 FORMAT(i5, ", ", 7(e14.4, ", "), e14.4)
! -----
  DO j = 1, n_parametros
    LOCAL = 0
    i_conta_2 = 1
    CALL PROBLEMA( n )
    F1 = V
    alfa = alfa_inicial
2  CONTINUE
    parametro_aux = parametro(j)
    nn_tenta_aqui = 0
    nnnn = 0
4  CONTINUE
    If (j .LE. 4) passo_inicial = passo_inicial1
    If (j .GT. 4) passo_inicial = passo_inicial2
    parametro_aux1 = parametro(j) + alfa*passo_inicial
! -----
    IF (parametro_aux1 .LE. 0) THEN
    alfa = alfa/2.D0; nn_tenta_aqui=nn_tenta_aqui+1;nnnn =nnnn + 1

```

```

                If (nn_tenta_aqui .GT. n_lixo2) THEN
                    alfa = - alfa ; nn_tenta_aqui = 0 ; LOCAL = 6 ;go
to 200 ; ENDIF
                If (nnnn.EQ.n_lixo1) THEN; LOCAL = 5; go to 200; ENDIF
                    GO TO 4
                ENDIF
! -----
! Estrutura para restringir coeficientes angulares dentro dos
limites definidos
! -----
                IF (j .GT. 4) THEN
                    a_inferior = coeficiente(1) + (j-5)/3 * dif_a
                    a_superior = coeficiente(1) + (j-4)/3 * dif_a
                    IF (parametro_aux1 .LE. a_inferior .OR. parametro_aux1
                    .GE. a_superior) THEN
                        alfa = alfa /2.D0 ; nn_tenta_aqui =
                        nn_tenta_aqui + 1 ; nnnn = nnnn + 1
                        If (nn_tenta_aqui .GT. n_lixo2) THEN
                            alfa = - alfa ; nn_tenta_aqui = 0 ; LOCAL = 6 ;go
                            to 200 ; ENDIF
                        If (nnnn.EQ.n_lixo1)THEN ;LOCAL=5; go to 200 ; ENDIF
                            GO TO 4
                        ENDIF
                    ENDIF
                ENDIF
! -----
                parametro(j) = parametro(j) + alfa*passo_inicial
                If (n_calculos_V.GE.n_lixo2) then; LOCAL = 7; go to 200; endif
                CALL PROBLEMA( n )
                    F2 = V
                    diferenca = F2 - F1
                    i_conta_2 = i_conta_2 + 1
                    IF(diferenca.LT.0.) diferenca = - diferenca
! -----
! A diferenca e' muito pequena. Mantenha valor e saia
! -----
                If (diferenca .LE. Erro1 ) Then
                    parametro(j) = parametro_aux
                    i_convergencia = 1
                    LOCAL = 8
                    GOTO 3
                Endif
! -----
! OK. Esta e' a direcao certa! Acelere!
! -----
                If (F2 .LT. F1 ) Then
                    F1 = F2
                    aux1 = 1
! -----
! Numero maximo de iteracoes. Saia
! -----
                If (i_conta_2.GE.IterP)Then; i_convergencia=3; LOCAL=1; GOTO 3
                EndIf
! -----
                alfa = 2.0 * alfa

```

```

    GOTO 2
  Endif
! -----
  parametro(j) = parametro_aux
! -----
! Numero maximo de iteracoes. Saia
! -----
  If (i_conta_2.GE.IterP)Then; i_convergencia=3; LOCAL=2;GOTO 3;
EndIf
! -----
  alfa = - alfa / 2.0
  beta = alfa
  If (beta.LT.0.) beta = - beta
! -----
! Voce está no mesmo ponto. Saia
! -----
  If (beta.LE.Erro2)Then; i_convergencia=2; LOCAL=3; GOTO 3;
Endif
! -----
  GOTO 2
3  continue
200 CONTINUE
  EndDo
! -----
  i_conta_1 = i_conta_1 + 1
! -----
! Busca minimo ao menos duas vezes
! -----
  If (aux1.EQ.0.and.aux2.EQ.0)Then; aux2=1; GOTO 1; Endif
! -----
! Convergiu ou e' inutil continuar
! -----
  If (aux1.EQ.0.and.aux2.EQ.1 ) Then ; GOTO 100 ; Endif
! -----
! Atingiu IterF. Termina sem sucesso
! -----
  If (i_conta_1.GE.IterF)Then; i_convergencia=4; GOTO 100; EndIf
! -----
  GOTO 1
! -----
100 Continue
  Do j = 1,n_parametros
  valor_final_parametro(j) = parametro(j)
  write(*,*) i_convergencia, n, j, valor_final_parametro(j)
  EndDo
! -----
! usado quando o programa é executado diversas vezes mas os
! resultados
! gravados juntos no mesmo arquivo. NxN é o número da execução.
! NxN = 0, esta estrutura não é executada.
! NxN = 1, o arquivo é criado, mas está vazio
! NxN > 1, o arquivo já existente é lido, fechado e depois
reinizializado,
! recolocando os resultados que existiam e incluindo os novos

```

```

! -----
      IF (NxN.GT.0) THEN
        OPEN(20,file="subdiretorio/nome do arquivo.txt")
DO i = 1,NxN - 1 ; READ(20,*) N1(i), (X1(i,j),j=1,7+1); ENDDO
        OPEN(20,file="subdiretorio/nome do arquivo.txt")
DO i = 1,NxN - 1; WRITE(20,21) N1(i), (X1(i,j),j=1,7+1); ENDDO
WRITE(20,21) NxN, 10*V, (valor_final_parametro(j),J=1,7)
      ENDIF
! -----
! usado quando o programa é executado uma única vez para NyN
dados iniciais
! e os resultados gravados no mesmo arquivo.
! NyN = 0, esta estrutura não é executada.
! -----
      IF (NyN.GT.0) THEN
        WRITE(*,*) "LOCAL = ", LOCAL
DO j = 1,7; XX1(n,j) = valor_final_parametro(j); ENDDO
      ENDIF
! -----
21 FORMAT(i5," ",",",5(f12.5," ","),2(f12.6," ","),f12.6)
! -----
110 Continue
END

MODULE Functions
CONTAINS
  character(len=20) function str(k)
  integer, intent(in) :: k
  write (str, *) k
  str = adjustl(str)
  end function str
END MODULE Functions

SUBROUTINE dados_iniciais ( )
  USE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER :: n_exp
! -----
  OPEN (1, file="000_Concentracoes_iniciais.txt")
  READ(1,*)
  READ(1,*) n_experimentos
  DO n_exp = 1, n_experimentos
  READ(1,*) Concentracao_inicial(n_exp)
    C_HB(n_exp,1,1) = 0.0D00
    C_HB(n_exp,2,1) = 0.0D00
    C_HB(n_exp,3,1) = 0.0D00
    C_HB(n_exp,4,1) = 0.0D00
    C_HB(n_exp,5,1) = Concentracao_inicial(n_exp)
  ENDDO
  CLOSE(1)
! -----
END

```

```

SUBROUTINE dados_experimentais( )
  USE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER   :: n_exp, n
  REAL*8    :: total_time_teste
  CHARACTER :: square*3
! -----
  total_time = 4.0D00
  DO n_exp = 1, n_experimentos
    WRITE(square,'(i3)') n_exp
    OPEN(n_exp+1, file = "Experimento"//square//".txt")
    READ(n_exp+1,*)
    DO n = 1, n_pontos
      READ(n_exp+1,*) tempo_experimental(n_exp,n), Absorbancia(n_exp,n)
      tempo_experimental(n_exp,n) = tempo_experimental(n_exp,n)
    ENDDO
    CLOSE(n_exp+1)
    total_time_teste = tempo_experimental(n_exp,n_pontos)
  IF (total_time_teste .LT. total_time) total_time = total_time_teste
  ENDDO
  delta_t = total_time / Nmax_time
  coeficiente(1) = 0.0057D00; coeficiente(5) = 0.0094D00
  dif_a = coeficiente(5) - coeficiente(1)
! -----
  END
SUBROUTINE constantes( )
  USE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER i,i1,j
  REAL*8  kk1
! -----
! PARA LEITURA DOS CINCO MELHORES CONJUNTOS
! -----
  DO j = 1, n_conjuntos
    READ(n_experimentos+2,*) i1, kk1, (k(i,j),i=1,7)
    write(*,*) j, (k(i,j),i=1,4)
  ENDDO
! -----
  END
SUBROUTINE PROBLEMA( j )
  USE VarGlob
  IMPLICIT NONE
  INTEGER :: n, n_exp, n_tempo, i, j
  REAL*8  :: aux1, k1(4)
  REAL*8  :: C_HB_int(5), Abs_int, tempo_modelo(2), Hemoglobina
! -----
  erro(j) = 0.0D00
  DO i = 2, 4 ; coeficiente(i) = parametro(i+3) ; ENDDO
  DO i = 1,4 ; k1(i) = parametro(i) ; ENDDO
! -----
  Hemoglobina = 0.0D00

```

```

DO n_exp = 1, n_experimentos
  n_tempo = 1
  DO n = 1, Nmax_time
    tempo_modelo(1) = (n-1)*delta_t;tempo_modelo(2) = tempo_modelo(1)
+ delta_t
    der_HB(n_exp,1,n) = k1(1)*C_HB(n_exp,2,n)
    der_HB(n_exp,2,n) = -k1(1)*C_HB(n_exp,2,n) + k1(2)*C_HB(n_exp,3,n)
    der_HB(n_exp,3,n) = -k1(2)*C_HB(n_exp,3,n) + k1(3)*C_HB(n_exp,4,n)
    der_HB(n_exp,4,n) = -k1(3)*C_HB(n_exp,4,n) + k1(4)*C_HB(n_exp,5,n)
    der_HB(n_exp,5,n) = -k1(4)*C_HB(n_exp,5,n)
    DO i = 1, 5
      C_HB(n_exp,i,n+1) = C_HB(n_exp,i,n) + der_HB(n_exp,i,n)*delta_t
    ENDDO
    IF (tempo_modelo(2) .GE. tempo_experimental(n_exp,n_tempo)) THEN
      aux1 = tempo_experimental(n_exp,n_tempo) - tempo_modelo(1)
      Abs_modelo = 0.0D00
      DO i = 1,5
        C_HB_int(i) = (C_HB(n_exp,i,n+1) - C_HB(n_exp,i,n))*aux1/delta_t
      + C_HB(n_exp,i,n)
        Abs_int = coeficiente(i) * C_HB_int(i)
        Abs_modelo = Abs_modelo + Abs_int
      ENDDO
      erro(j) = erro(j) + (Abs_modelo - Absorbancia(n_exp,n_tempo))**2
      theoretical_curv(n_exp, n_tempo) = Abs_modelo
      DO i =1,5
        Concentracao(i,n_exp, n_tempo) = C_HB_int(i)
      ENDDO
      n_tempo = n_tempo + 1
    ENDDIF
  ENDDO
  Hemoglobina = Hemoglobina + C_HB(n_exp,1,Nmax_time+1)
  ENDDO
  V = erro(j)
! -----
END

```