

Agregação da Porfirina Aquo-solúvel Meso-tetrakis(4-fenilsulfonato)Porfirina na Presença da Albumina de Soro Bovino

Aggregation of Meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl) Porphyrin in the Presence of Bovine Serum Albumin

Joyce Laura da Silva Gonçalves

Departamento de Química

Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO – Guarapuava, PR

joycelaura2003@yahoo.com.br

Daiana Kotra Deda

Instituto de Química

Universidade Estadual de São Paulo – USP – São Paulo, SP

daianakd@iq.usp.br

Tania Toyomi Tominaga

Departamento de Física

Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO – Guarapuava, PR

ttominaga@unicentro.br

Resumo: O presente trabalho teve como objetivo estudar a interação da porfirina aniônica meso-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirina, $TPPS_4$, com albumina de soro bovino (BSA). Inicialmente estudou-se a influência do pH nas propriedades da porfirina. Através da análise dos espectros de absorção ótica e de dicroísmo circular magnético (DCM), obtidos em função do pH, foi possível caracterizar duas espécies em equilíbrio: as formas protonada (H_4TPPS_4)²⁻ e desprotonada (H_2TPPS_4)⁴⁻, sendo o equilíbrio entre elas atingido em pH 5,1. O estudo da interação da $TPPS_4$ com BSA foi realizado em dois pHs: 4,0 e 9,0, sendo observada uma ligação efetiva entre a porfirina e a proteína em ambos os pHs. Através da análise dos espectros eletrônicos e de DCM, foi possível caracterizar a presença de duas espécies em equilíbrio: as formas não ligada e ligada da porfirina

ao BSA. Entretanto, foi possível identificar a presença de uma terceira espécie em meio ácido, que foi atribuída à formação de agregados de porfirina. Estudos por espectroscopia de fluorescência confirmaram a presença desses agregados e revelaram que tal comportamento depende da concentração de albumina e de fatores eletrostáticos.

Palavras-chave: agregação; BSA; porfirina aquo-solúvel.

Abstract: The present work aims at investigating the interaction of anionic meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin (TPPS₄) with bovine serum albumin (BSA). Initially, pH influence on the properties of porphyrin was studied. Through the analysis of optical absorption and magnetic circular dichroism (MCD) spectra in different pH, it was possible to characterize two species in equilibrium: the protonated (H₄TPPS₄)²⁻ and deprotonated (H₂TPPS₄)⁴⁻ forms, and then pKa 4.7 was obtained. The interaction of TPPS₄ with BSA was carried out in two pH (4.0 and 9.0) and an effective binding between the porphyrin and protein in both pH was observed. The presence of two species non-binding and binding to BSA forms of porphyrin were distinguished using optical spectroscopy and MCD in both pH. Nevertheless, a third species, which was attributed to the formation of porphyrin aggregates, was identified in acid medium when MCD spectra were analyzed. Fluorescence spectroscopy confirmed the presence of these aggregates and the results indicates that this behavior depends on the albumin concentration and electrostatic attraction.

Key words: aggregation; BSA; water-soluble porphyrin.

1 Introdução

As porfirinas e seus derivados constituem uma classe de moléculas que desempenham papéis vitais no funcionamento de muitos sistemas bioquímicos tais como: fotossíntese, transferência de elétrons na cadeia respiratória, transporte e armazenamento de oxigênio [1]. Das várias aplicações das porfirinas e derivados,

uma das mais significativas é a sua utilização na medicina. O estudo das porfirinas e compostos semelhantes como drogas terapêuticas tem crescido nos últimos anos devido a algumas de suas propriedades: alta afinidade pelos tecidos tumorais, atividade fotodinâmica, alta fotoestabilidade, baixa toxicidade e intensa absorção espectral onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes (em torno de 600 nm) [2-7]. Pode-se citar como uma aplicação clínica, a terapia fotodinâmica (TFD), uma modalidade relativamente nova no tratamento de câncer e outras moléstias, tais como degeneração macular da retina e psoríase, que têm como característica comum um crescimento anormal de tecidos [8-11] .

Os compostos porfirínicos têm sido altamente empregados em TFD, entretanto esses tendem a formar agregados sob determinadas condições, podendo alterar seus estados eletrônicos e, dessa forma, suas características energéticas. A formação de agregados também reduz drasticamente a capacidade do composto de gerar oxigênio singlete, espécie responsável pela morte tumoral e, conseqüentemente, a atividade fotodinâmica das porfirinas. Podem ainda provocar o entupimento de artérias, levando o paciente à morte. Dessa forma, para uma maior eficiência, é necessário que o composto se apresente solubilizado e na forma monomérica.

Estudos têm revelado [12,13] que as propriedades dessas porfirinas, inclusive a agregação, são influenciadas por vários fatores, tais como: o meio, força iônica do meio, temperatura, concentração e a presença de macromoléculas e membranas [14]. Como essas drogas são normalmente administradas no paciente por via intravenosa, torna-se relevante prever como suas propriedades serão influenciadas pela presença de estruturas presentes no sangue.

A albumina é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo onde exerce funções de armazenamento e transporte de substâncias, sendo sugerida também a sua importante função como fonte de aminoácidos para diversos tecidos. Devido a sua importância fisiológica e à relativa facilidade com que pode ser isolada e purificada, muitos estudos referentes à sua ligação a diversos compostos têm sido conduzidos. Tais estudos foram ainda mais estimulados com a determinação da estrutura primária da albumina humana e bovina, de modo que a sequência de aminoácidos das duas proteínas difere em alguns aspectos[15]. Brown comparou a

albumina humana e bovina, revelando cerca de 80% de identidade. As diferenças observadas na estrutura são de natureza conservativa, ou seja, um aminoácido hidrofóbico é substituído por outro também hidrofóbico, mantendo, dessa forma, sua característica [16]. Assim, sugere-se que os dados obtidos para a albumina bovina podem ajudar a prever o comportamento da albumina humana [17].

Devido as suas propriedades, como a sua forma moderadamente alongada, alta solubilidade, flexibilidade e estabilidade, inúmeros compostos se ligam reversivelmente à albumina que age como transportador do sistema vascular. Tal flexibilidade permite que os ligantes induzam modificações na configuração da molécula de albumina favorecendo sua acomodação[16].

Muitos estudos têm sido conduzidos no sentido de revelar as consequências da interação de diversas drogas com a albumina, já que as propriedades como distribuição, concentração livre e metabolismo de diferentes fármacos podem mudar significativamente na presença da proteína [18]. Outros estudos investigam a interação de diferentes porfirinas com albumina bovina e humana [19-21], e também de colóides com essas proteínas [22]. Além disso, a forma com que o processo de agregação é concretizado também vêm despertando o interesse dos pesquisadores[23,24]. Especificamente, estudos envolvendo a interação da TPPS₄, utilizando-se albumina como sistema biológico modelo, é amplamente difundido, tendo em vista a abundância desta proteína no plasma sanguíneo e o interesse biológico que ela desperta [19,23]. Em ambos os casos, os resultados mostram que são de importância crucial para o processo de agregação a concentração, o pH do meio e os fatores eletrostáticos. Sendo assim, o estudo da interação das porfirinas com a albumina se torna relevante, visto que **pode dar subsídios importantes para a compreensão da interação dessas drogas com a proteína e da relação dessa interação com a ação farmacológica.**

Para realizar uma avaliação preliminar da potencialidade destes compostos como droga terapêutica, investigou-se a influência do pH e da presença de albumina de soro bovino nas propriedades da porfirina aniônica meso-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirina, TPPS₄. Este estudo foi realizado utilizando-se as técnicas de absorção ótica, fluorescência e dicroísmo circular magnético (DCM).

2 Materiais e métodos

Na realização deste trabalho, utilizou-se a porfirina aniônica meso-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirina, TPPS₄, (Figura 1) da Midcentury Chemical e Albumina de Soro Bovino (BSA, do inglês Bovine Serum Albumin) da INLAB. Todos os reagentes empregados foram de grau analítico e sem nenhuma purificação prévia.

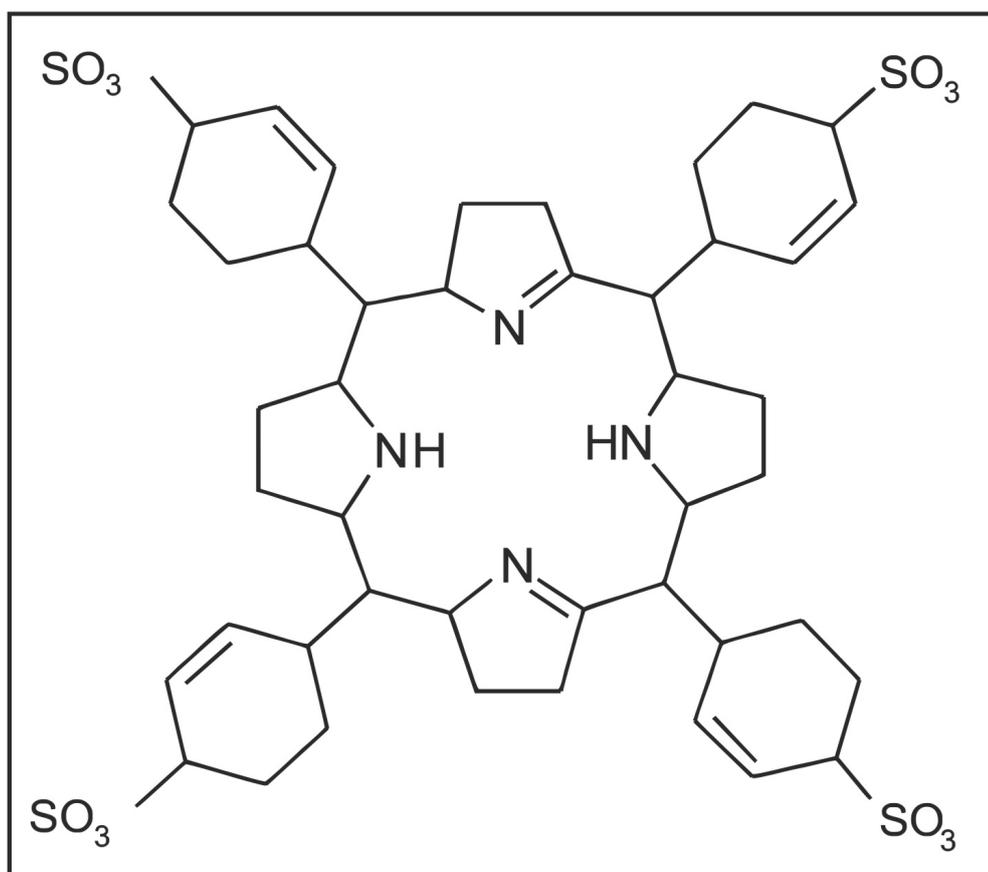


Figura 1. Estrutura da porfirina TPPS₄

Para verificar a influência do pH nas propriedades da porfirina foram realizadas titulações da porfirina em solução tampão (acetato-fosfato de sódio 0,020 mol/L). As titulações foram realizadas, variando-se o pH de 0,5 a 12,5 e utilizando-se soluções de NaOH e HCl em diferentes concentrações, a partir de medidas a cada 0,5 unidades de pH. As mudanças de pH das soluções foram controladas por meio de um pHmetro, equipado com eletrodo de vidro Ag/AgCl.

Posteriormente, realizaram-se titulações da porfirina, em uma concentração fixa de 3.10^{-6} mol/L, em função da concentração de BSA em dois pHs: 4,0 e 9,0 para as medidas de Absorção Ótica e 2 mol/L para os experimentos de fluorescência. Variou-se a concentração de BSA na faixa de 1.10^{-8} mol/L a 1.10^{-6} mol/L para as medidas óticas e na faixa de 1.10^{-7} mol/L a 1.10^{-5} mol/L para as medidas de dicroísmo circular magnético DCM. Dessa forma, obteve-se um conjunto de espectros eletrônicos, de fluorescência e de dicroísmo DCM em cada titulação realizada.

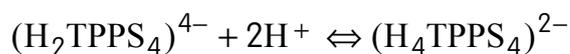
Os espectros eletrônicos, de fluorescência e DCM foram obtidos, respectivamente, em um espectrofotômetro Varian Cary 50 BIO, espectrofluorímetro Jasco FP-777 e Jasco J-720 equipado com um eletroímã (0,86T). As cubetas utilizadas em todos os experimentos foram de quartzo com caminho ótico de um centímetro.

A técnica de fluorescência foi utilizada para monitorar a agregação de porfirinas. Para tal estudo, assumiu-se que apenas a forma monomérica exibe fluorescência e esta é suprimida pela formação de agregados.

Os espectros eletrônicos e de dicroísmo circular magnético foram analisados, utilizando-se o algoritmo Convex Constraint Analysis (CCA) desenvolvido por Perczel et al.[25]. O CCA é um método geral de deconvolução para um conjunto completo de funções que são obtidas pela combinação linear de outras funções. Este programa requer a definição do número de funções base, isto é, é necessário definir o número de componentes puras.

3 Resultados e discussão

A figura 2 mostra alguns dos espectros de MCD da titulação da porfirina aniônica TPPS₄, em acetato-fosfato 0,020 mol/L, em função do pH na faixa de pH de 0,5 a 12,5. A considerável alteração espectral, quando se aumenta o pH, se deve à desprotonação dos nitrogênios pirrólicos do anel porfirínico, tendo como resultado o aumento da carga negativa líquida da molécula [26]. Portanto, esta porfirina se apresenta sob duas formas químicas em equilíbrio:



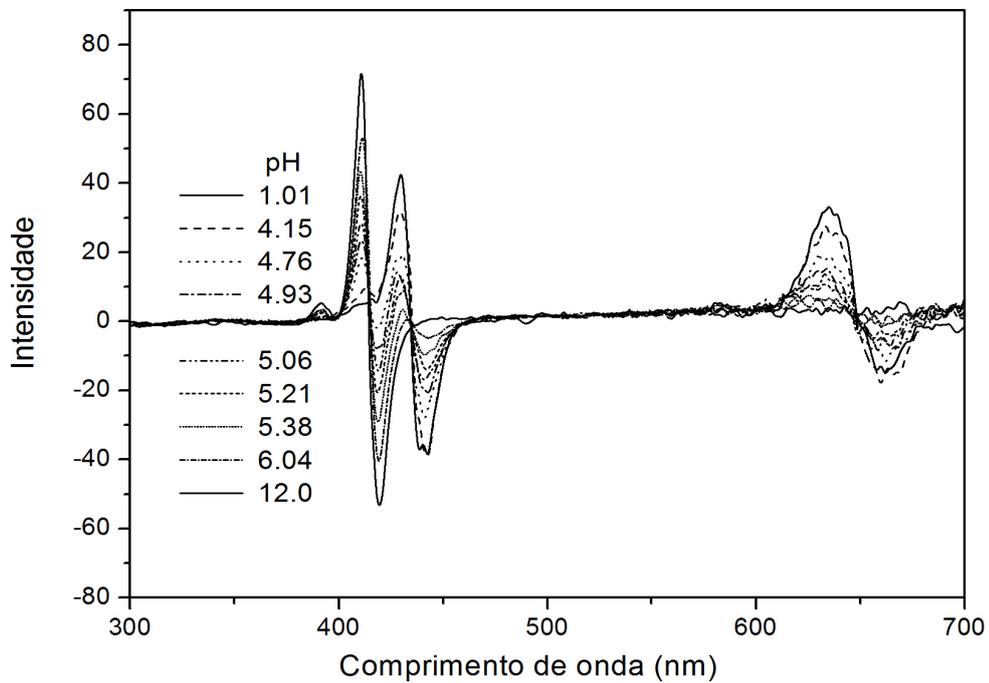


Figura 2. Espectros de DCM da titulação da porfirina $TPPS_4$ em função do pH

Em nossos trabalhos anteriores [7], foi observada uma considerável modificação nos espectros eletrônicos da $TPPS_4$ em função da transição da forma protonada para a desprotonada no intervalo de pH de 0,5 a 13. O espectro eletrônico da forma protonada zwitteriônica $(H_4TPPS_4)^{2-}$ possui banda Soret centrada em 434 nm e a forma desprotonada monomérica $(H_2TPPS_4)^{4-}$ centrada em 413 nm, e o pK de equilíbrio entre as duas espécies foi de 4,7. Dessa forma, o conjunto de espectros experimentais de DCM apresentados na figura 2 foi analisado, considerando-se como sendo resultante da combinação linear de duas componentes puras: a espécie protonada e a desprotonada. Estes dados concordam com os valores obtidos por Escudero et al. [27].

Os espectros óticos mostraram que a forma $(H_2TPPS_4)^{4-}$ exibe características de simetria D_{2h} , caracterizado pelo desdobramento da banda Q (bandas presentes na região espectral de 500 a 700 nm) em quatro picos, mas para pHs ácidos esta simetria aumenta para D_{4h} , caracterizado por dois picos na banda Q. Essas duas novas bandas são associadas à formação de agregados do

tipo J na porfirina protonada[28]. A protonação de dois dos quatro nitrogênios centrais remove a degenerescência das porfirinas base-livre, aumentando dessa maneira a simetria da forma $(H_4TPPS_4)^{2-}$. Neste caso, os espectros de MCD apresentam duas bandas de sinais opostos devido às transições polarizadas em x e y, como pode ser observado na figura 2.

A deconvolução dos espectros de MCD, utilizando-se o CCA, obtidos com a titulação da porfirina, resultou no espectro das duas espécies puras, como pode ser observado na figura 3(a), onde o espectro com linha contínua foi atribuído à forma protonada da porfirina, e o espectro com linha tracejada à forma desprotonada.

As contribuições das duas componentes em cada espectro experimental em função do pH, também, obtidas pelo CCA, estão apresentadas na figura 3b. O ajuste destes dados experimentais, utilizando-se uma função sigmoideal, permitiu a obtenção do valor de pK de 5,1 para a transição da forma protonada para a desprotonada, ou seja, na faixa de pH de 1,0 a 4,0 existe predominantemente a forma protonada e na faixa de pH 6,0 a 13,0 existe predominantemente a forma desprotonada. No pH fisiológico, próximo de pH 7,0, existe a forma predominantemente a forma desprotonada.

A partir destes resultados, realizaram-se os estudos da interação da $TPPS_4$ com a albumina em dois pH fixos: 4,0 e 9,0. Como verificado anteriormente, no pH 4,0 a porfirina se encontra predominantemente na forma protonada e em pH 9,0 na forma desprotonada.

Para a solução de porfirina no pH 4,0, observa-se uma interação efetiva entre a porfirina e a proteína, pois, como pode ser verificado na figura 4a, a adição de albumina provocou mudanças significativas no espectros eletrônicos. A análise desses espectros permitiu identificar a presença de duas espécies (figura 4b): o espectro com a banda Soret com máximo de absorção em 434 nm caracteriza a forma livre da $TPPS_4$ e a centrada em 422 nm a forma ligada ao BSA.

As contribuições das duas componentes em cada espectro experimental em função da concentração da proteína estão apresentadas na figura 4c. Da mesma forma, no pH 9,0, a deconvolução dos espectros eletrônicos obtidos com a titulação da $TPPS_4$ com a albumina revelou a existência de duas espécies em solução, como mostrado na figura 5a. O espectro com o máximo em 413 nm foi

atribuído à forma livre e o com a banda Soret centrada em 423 nm à forma da porfirina ligada à proteína.

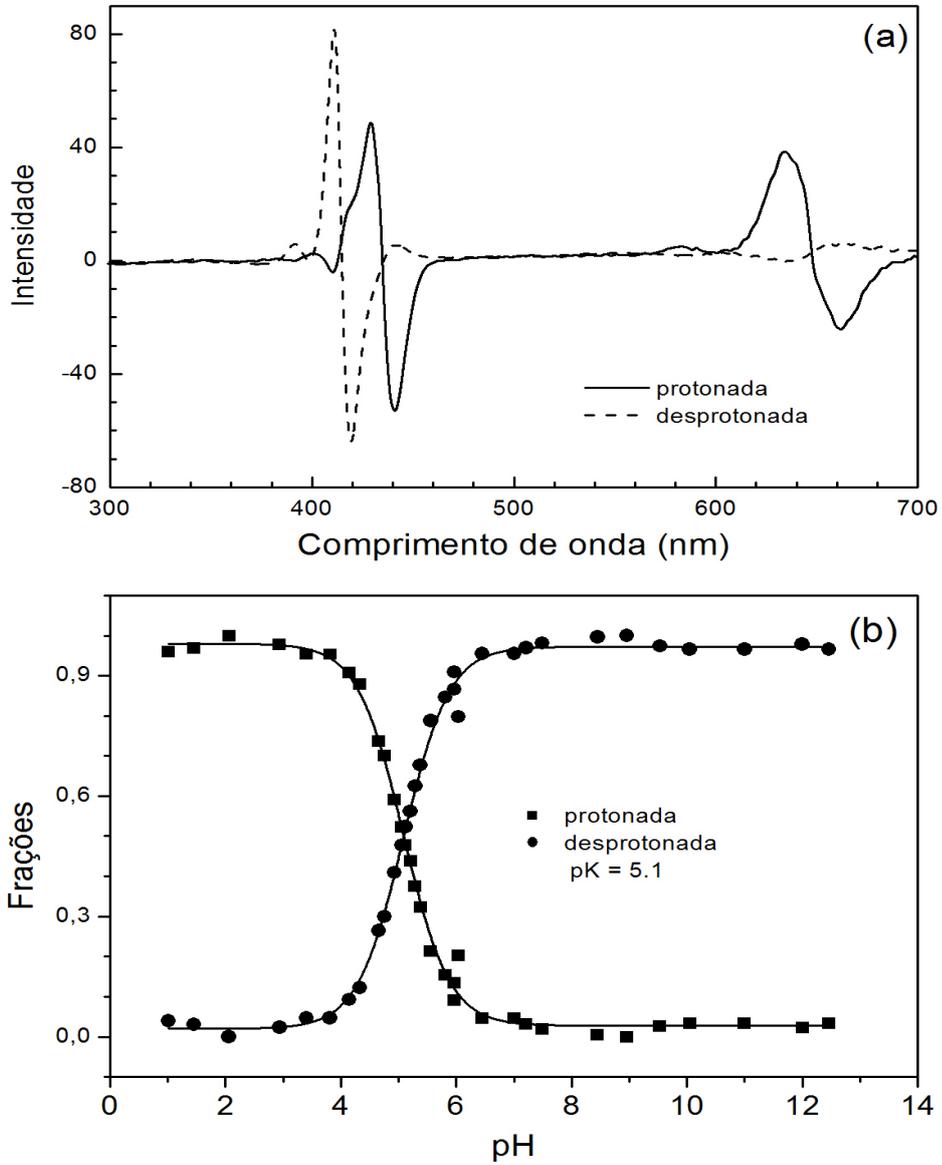


Figura 3. (a) Componentes da deconvolução dos espectros de MCD da porfirina TPPS₄ em solução aquosa. (b) Frações das componentes em função do pH na faixa de pH de 0,5 a 12,5

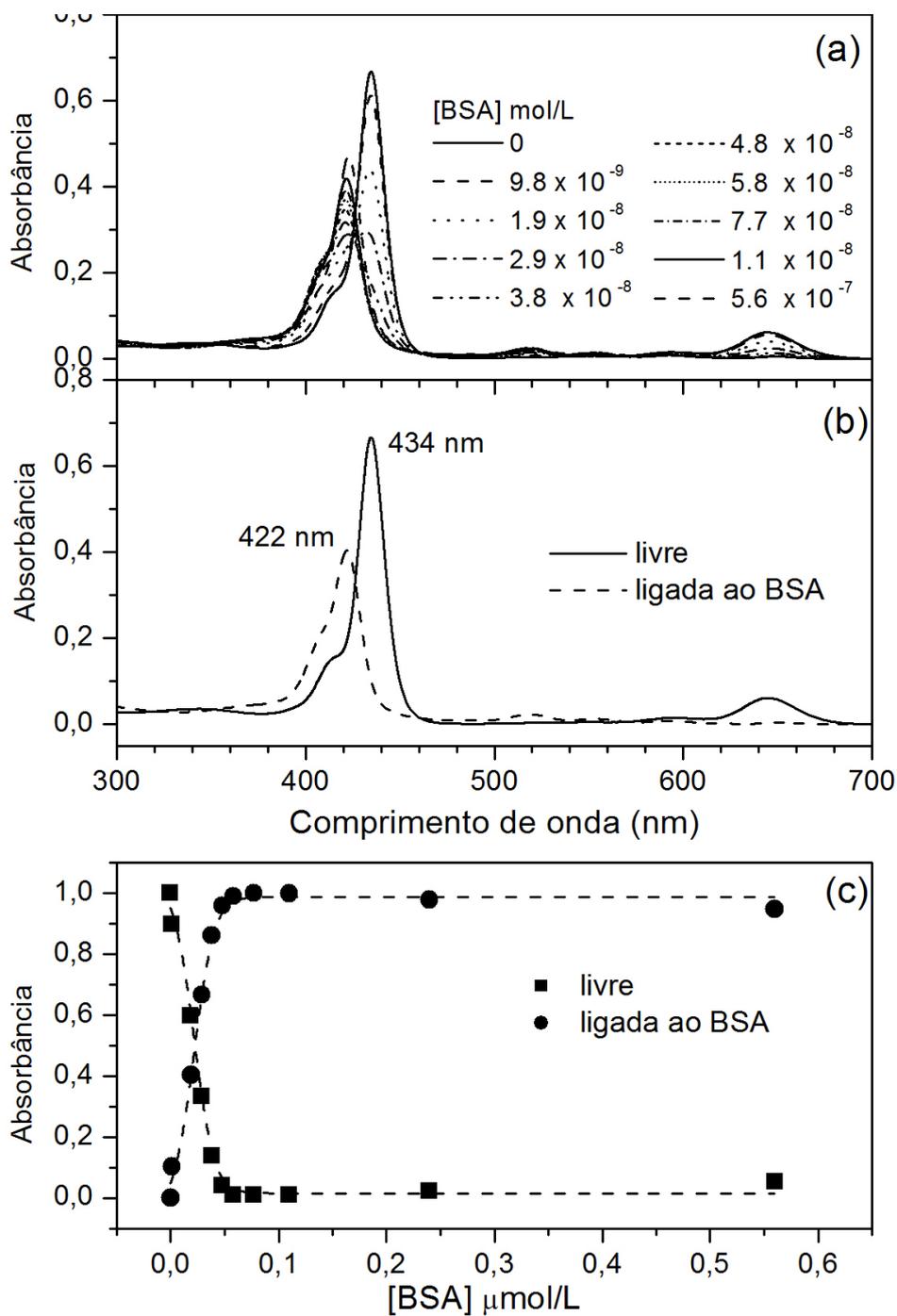


Figura 4. (a) Espectros eletrônicos da TPPS₄ em função da concentração de BSA em pH 4,0. (b) Espectros eletrônicos das formas não ligada e ligada à proteína. (c) Frações das componentes resultantes da deconvolução da porfirina em função do BSA. [TPPS₄] = 3.10⁻⁶ mol/L.

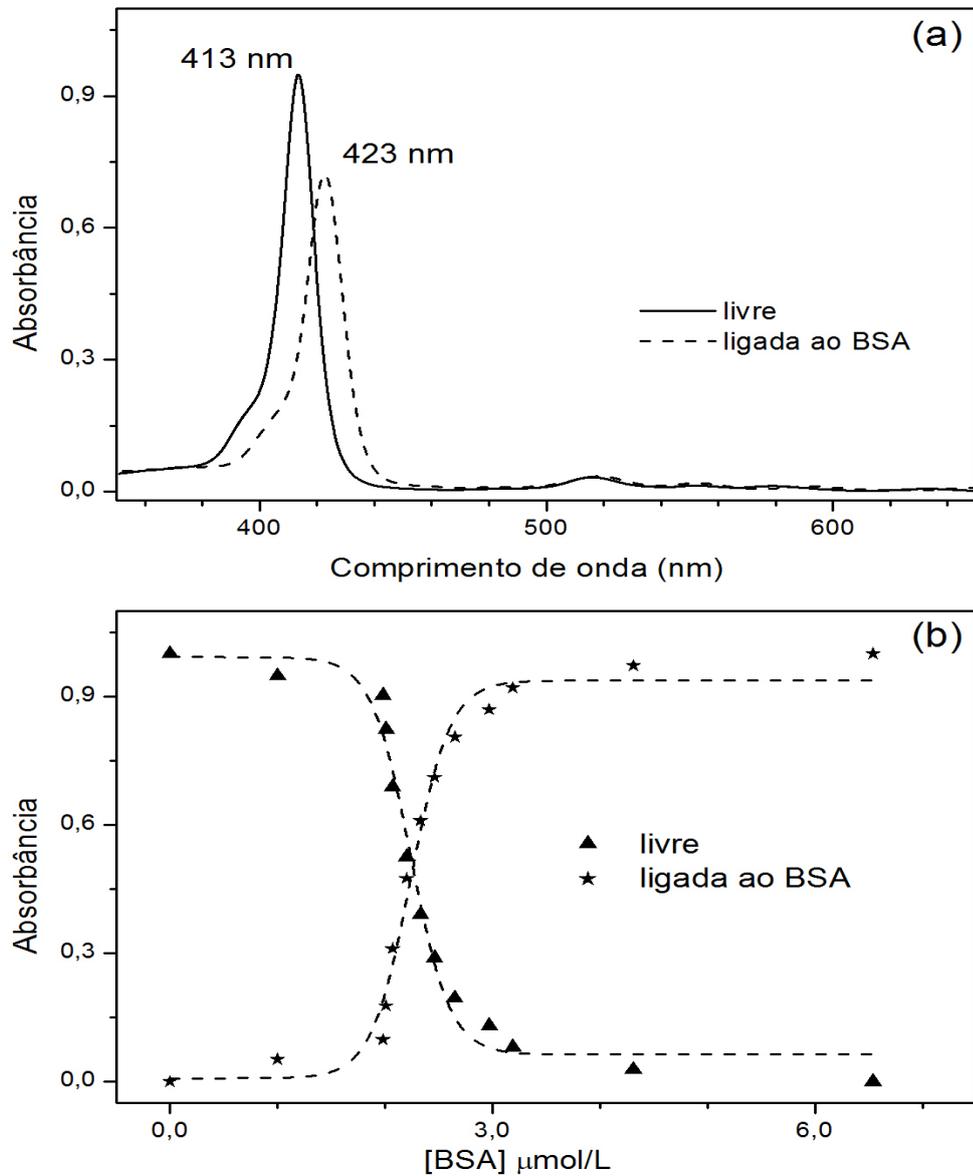


Figura 5. (a) Espectros eletrônicos das formas não-ligada e ligada ao BSA, pH 9,0. (b) Frações das componentes resultantes da deconvolução da porfirina em função do BSA. $[TPPS4] = 3.10^{-6} \text{ mol/L}$

Pode-se observar na figura 5b, que a transição da forma livre da porfirina para a ligada ao BSA para este pH ocorre quando se tem uma concentração de aproximadamente $2,30 \mu \text{ mol/L}$ de BSA presente em solução, ao passo que para o pH 4,0 (figura 4c) esta transição já ocorre quando se tem $0,02 \mu \text{ mol/L}$ de proteína presente.

A análise dos espectros de DCM comprovaram a presença destas duas espécies no pH 9,0 (a forma livre e a forma ligada ao BSA). Entretanto no pH 4,0, a análise do conjunto de espectros de DCM obtidos com a titulação da porfirina (figura 6a) revelou a existência de três espécies em equilíbrio. A deconvolução desse conjunto de espectros permitiu identificar o espectro de cada uma dessas três espécies, sendo o resultado apresentado na figura 6b.

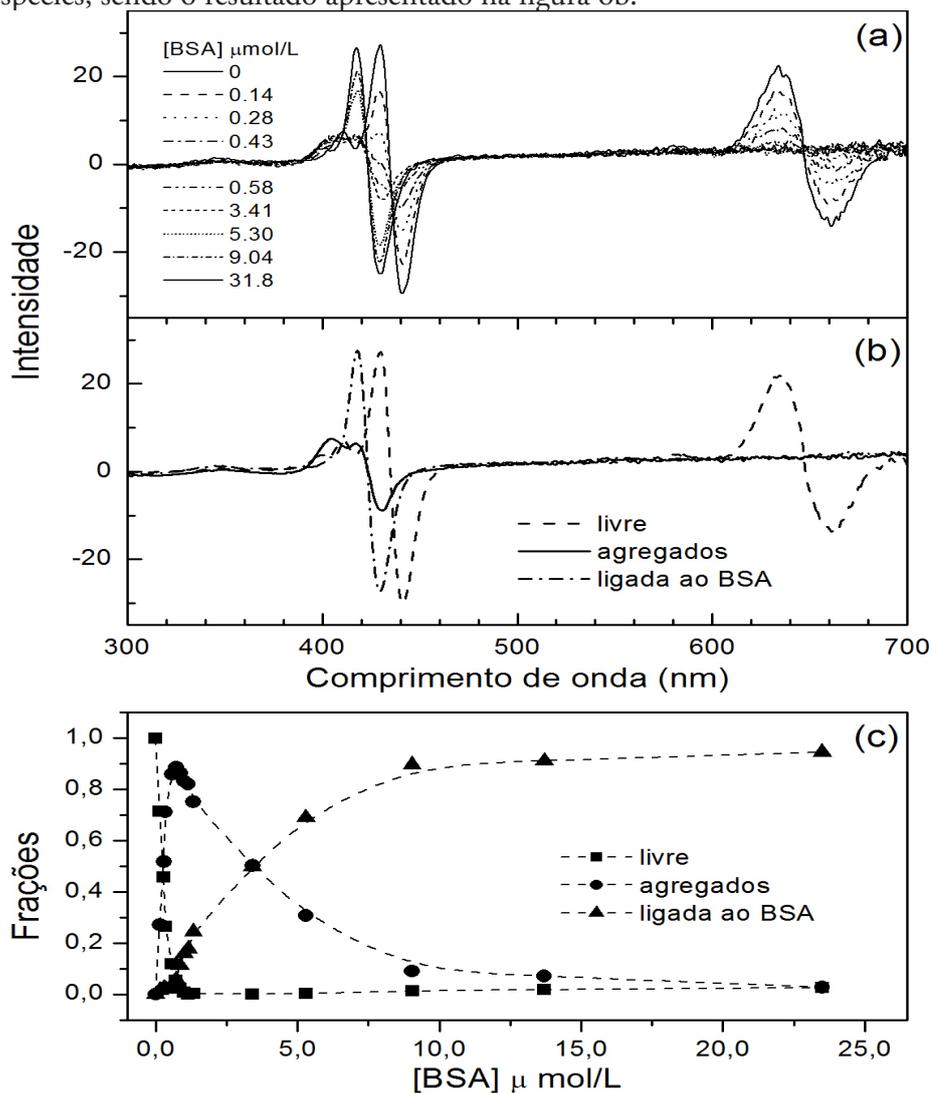


Figura 6. (a) Espectros de DCM obtidos com a titulação da porfirina com BSA em pH 4,0; (b) Espectros das formas livre, agregados e ligada à proteína; (c) Frações das componentes resultantes da deconvolução da porfirina em função do BSA $[TPPS_4] = 3 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$

A ligação da TPPS₄ à proteína em pH 4,0 mostra claramente que existe uma transição da forma livre para a primeira forma ligada e uma transição desta para a segunda forma ligada. A primeira espécie foi atribuída à formação de agregados e a segunda aos monômeros ligados à albumina. Estudos mostram [29] que a presença de polímeros moleculares estimulam a agregação de alguns compostos heterocíclicos, portanto a agregação na presença do BSA não deve ser excluída. Devido à presença da forma zwitteriônica em meio ácido, (H₄TPPS₄)²⁻, podem ocorrer a formação de pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas que estabilizam os agregados [12]. Como não se observou a formação de agregados no pH 9,0, pode-se sugerir que os fatores eletrostáticos influenciam a agregação da porfirina.

A formação destes agregados em pH 4,0 foi comprovada por estudos de fluorescência, já que se admite que esta é característica apenas da forma monomérica, sendo suprimida quando há a formação de agregados. Pôde-se observar através da análise dos espectros de fluorescência que, inicialmente, a fluorescência da TPPS₄ foi suprimida pela presença de pequena quantidade do BSA, sendo, em seguida, recuperada quando uma concentração maior da proteína foi adicionada na solução de porfirina. A figura 7 ilustra este comportamento, de modo que é possível observar que a curva alcança um mínimo nos dois pH. Neste ponto de mínimo a razão BSA/TPPS₄ para o pH 4,0 é de aproximadamente 0,1 e para o pH 9,0 a razão BSA/TPPS₄ nos fornece um valor de aproximadamente 0,4 que é maior que para o pH 4,0. Em seguida, há uma recuperação da fluorescência quando uma concentração maior de albumina é adicionada na solução de porfirina, sugerindo que uma molécula de BSA estaria suprimindo mais de uma molécula de TPPS₄.

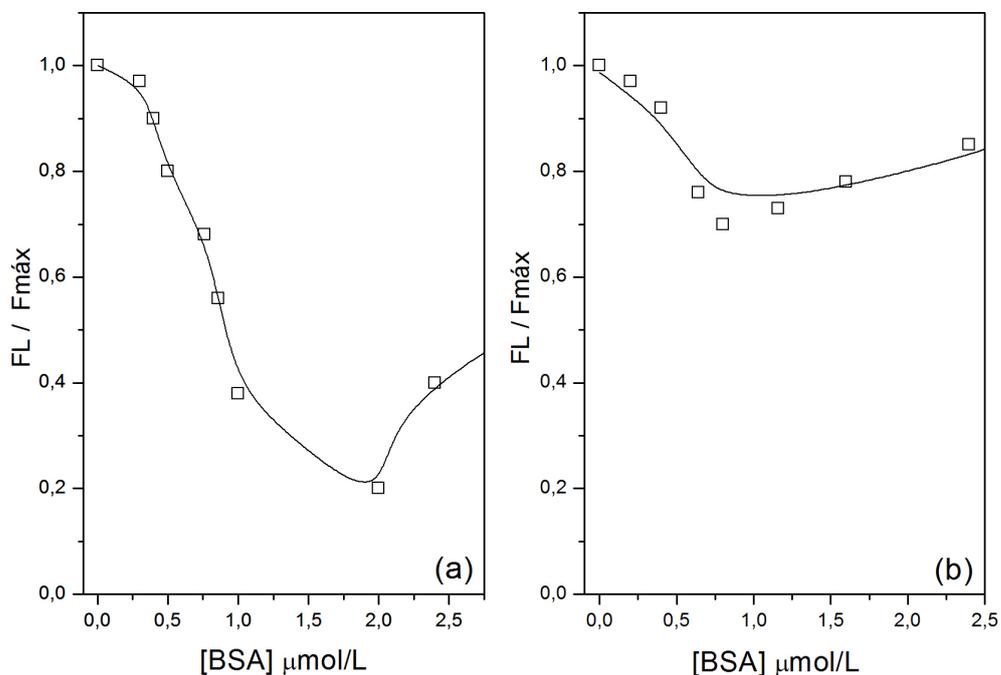


Figura 7. Fluorescência da $TPPS_4$ ($2\mu M$) em função da concentração de BSA. $\lambda_{exc} = 575\text{ nm}$ (pH 4,0), $\lambda_{exc} = 510\text{ nm}$ (pH 9,0)

A análise dos dados de fluorescência indicam que a capacidade de interação da $TPPS_4$ decresce ao passar do pH 4,0 para o pH 9,0, mostrando que a interação eletrostática é fundamental. Considerando que existe cerca de dez sítios de ligação de porfirinas negativas na albumina, pode-se supor que existe uma distribuição das porfirinas negativamente carregadas a estes sítios positivos ou uma associação em alguns poucos sítios, e então nessas condições deverá ocorrer agregação. Estas porfirinas negativas se ligam em sítios de ligação não específicos, ou seja, nos sítios de ligação, por exemplo, de ácidos graxos. E à medida que se aumenta a concentração de albumina na solução, haveria uma redistribuição e estas porfirinas se ligariam nos sítios específicos para porfirinas da albumina, já que possuem uma constante de ligação maior. E para um excesso de albumina restaria apenas a forma monomérica desta porfirina ligada ao BSA.

4 Conclusão

Através da análise dos espectros de Dicroísmo Circular Magnético, obtidos com a titulação da porfirina aniônica TPPS₄ em função do pH, foi possível determinar a presença de duas espécies em equilíbrio na solução. A deconvolução dos espectros permitiu determinar o pK de 4,7 da transição entre as formas protonada e desprotonada da porfirina, cuja presença foi confirmada através da análise dos espectros de DCM que revelaram uma aumento de simetria quando a solução foi acidificada. Escudero et al. [26] encontraram um pK próximo de 5,0 para esta transição utilizando a espectroscopia de Absorção Ótica.

Pôde-se verificar também uma ligação efetiva da porfirina TPPS₄ com a albumina nos dois pHs investigados, tanto os espectros eletrônicos quanto os de DCM foram modificados na presença da proteína. Os resultados experimentais de DCM mostram claramente a formação de agregados da TPPS₄ na presença de BSA no pH 4,0, ao passo que para o pH 9,0 não se observou a formação de agregados. Estes dados foram confirmados com as medidas de fluorescência, que indicaram que a capacidade de interação da TPPS₄ com o BSA decresce ao passar do pH 4,0 para o pH 9,0. Observou-se um ponto de mínimo em ambos os pHs, neste ponto a razão TPPS₄/BSA =10 para o pH 4,0 e para o pH 9,0 TPPS₄/BSA =2,5, bem menor que o pH 4,0. Em seguida, há uma recuperação da fluorescência quando uma concentração maior de albumina é adicionada na solução de porfirina, sugerindo que uma molécula de BSA estaria suprimindo mais de uma molécula de TPPS₄. Estes resultados mostraram que a agregação depende, dentre outros fatores, da concentração de albumina, pH e de fatores eletrostáticos.

5 Referências

- [1] WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E. L. *Principles of Biochemistry*, New York: Academic Press, 1968.
- [2] BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* v.24, n.1 p.19-33, 1995.

- [3] KESSEL, D. Porphyrin localization: A new modality for detection and therapy of tumors *Biochem Pharmacol* v. 33, n. 9, p. 1389- 1393, 1984.
- [4] DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy. *Photochem Photobio* v. 58, n. 6, p. 895-900, 1993.
- [5] HAMBLIN, M. R.; NEWMAN, E. L. New trends in photobiology: On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. *J Photoch Photobio B: Biology*, v. 23, n. 1, p. 3-8, 1994.
- [6] DICKSON, E.F.G.; POTTIER, R.H. On the role of protoporphyrin IX photoproducts in photodynamic therapy. *J Photoch Photobio B: Biology*, v.29, n.1, p.91-93,1995.
- [7] BORISSEVITCH, I. E. et al. Fluorescence and optical absorption study of interaction of two water soluble porphyrins with bovine serum albumin. The role of albumin and porphyrin aggregation. *J Lumin* v. 69, n. 2, p.65-76, 1996.
- [8] MACHADO, A. E. da H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. *Quim Nova*, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.
- [9] SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova*, v. 25 , n. 5, p. 801-807, 2002.
- [10] ALLISON, R. R. PDT frontiers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 6, n. 2, p. 135-136, 2009
- [11] ROBERTSON, C.A.; EVANS, D.H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photoch Photobio B: Biology*, v. 96, n. 1, p.1-8, 2009
- [12] ANDRADE, S. M.; COSTA, S. M. B. Aggregation Kinetics of Meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) Porphine in the Presence of Proteins: Temperature and Ionic Effects. *J Fluoresc* v. 12, n. 1, p. 77-82, 2002.
- [13] YUSHMANOV, V. E. et al. ¹H NMR and electronic Absorption Spectroscopy of Paramagnetic Water-Soluble Meso-Tetraarylsubstituted Cationic and Anionic Metalloporphyrins. *J Inorg Biochem* v. 61, n. 4, p. 233-250, 1996.

- [14] CANNON, J. B. Pharmaceuticals and Drug Delivery Aspects of Heme and Porphyrin Therapy. *J Pharm Sci* v. 82, n. 5, p. 435-446, 1993.
- [15] MELOUN, B.; MORAVEK, L.; KOSTKA, V. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett* v. 58, n. 1-2, p. 134-137, 1975.
- [16] BROWN, J. R. Structural origins of mammalian albumin. *Fed Proc* v. 35, n. 10, p. 2141-2144, 1976.
- [17] KRAGH-HANSEN, U. Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin. *Pharmacological Reviews*, v. 33, n. 1, p. 17-53, 1981.
- [18] FOLEY, M. S. C. et al. Excited triplet state photophysics of the sulphonated aluminium phthalocyanines bound to human serum albumin, *J Photochem Photobiol B: Biology*. v.38, p.10-17, 1997.
- [19] VALANCIUNAITE, J. et al. Spectroscopic study of TPPS₄ nanostructures in the presence of bovine serum albumin. *Photochem Photobiol Sci* v. 5, n. 4, p. 381-388, 2006.
- [20] LI, Q.; SEEGER, S. Deep UV sensing of the interaction of porphyrin with bovine serum albumin protein. *Sensor Actuat B-Chem*, v. 139, n. 1, p. 118-124, 2009.
- [21] MA, H. M. et al Spectroscopic studies on the interaction of a water-soluble cationic porphyrin with proteins. *Spectrochim Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 72, n. 3, p. 465-469, 2009.
- [22] KATHIRAVAN, A.; ANANDAN, S.; RENGANATHAN, R. Interaction of colloidal TiO₂ with human serum albumin: A fluorescence quenching study. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Asp* v. 333, n. 1-3, p. 91-95, 2009.
- [23] GONÇALVES, P. J. et al. Effect of protonation on the photophysical properties of meso-tetra(sulfonatophenyl)porphyrin. *Chem Phys Lett* v. 407, n. 1-3, p. 236-241, 2005.
- [24] AGGARWAL, L. P. F.; BORISSEVICI, I. E. On the dynamics of the TPPS₄ aggregation in aqueous solutions: Successive formation of H and J aggregates. *Spectrochim Acta Part A*, v. 63, n. 1, p. 227-233, 2006.

[25] PERCZEL, A.; PARK, K.; FASMAN, G. D. Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: A practical guide. *Anal Biochem* v. 203, n. 1, p. 83-93, 1992.

[26] PASTERNAK, R. E.; SUTIN, N.; TURNER, D. H. Some very rapid reactions of porphyrins in aqueous solution. *J Am Chem Soc* v. 98, n. 7. p. 1908-1913, 1976.

[27] ESCUDERO, C. et al. Zwitterionic vs porphyrin free-base structures in 4-phenylsulfonic acid meso-substituted porphyrins. *J Porphyr Phthalocya* v. 9, n.12, p.852-863, 2005.

[28] KANO, H.; SAITO, T.; KOBAYASHI, T. Dynamic intensity borrowing in porphyrin J aggregates revealed by sub-5-fs spectroscopy. *J Phys Chem B*. v.105, n.2, p. 413-419, 2001.

[29] STURMER, D. M. Syntheses and Properties of Cyanine and Related Dyes. In: A. Weissberger, E. C. Taylor . *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Vol. 30, Special Topics in Heterocyclic Chemistry. New York, John Wiley & Sons, Inc., : 441-587, 1997