



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Estudo das Interações de Moléculas Orgânicas com Imunoglobulinas G

Fábio de Castro Bezerra

Fábio de Castro Bezerra

**Estudo das Interações de Moléculas Orgânicas
com Imunoglobulinas G**

Orientador: *Prof. Dr. Pablo José Gonçalves*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do título de Mestre em Física.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Bezerra, Fábio de Castro
Estudo das Interações de Moléculas Orgânicas com Imunoglobulinas
G [manuscrito] / Fábio de Castro Bezerra. - 2015.
x, 60 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Pablo José Gonçalves.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Física (IF) , Programa de Pós-Graduação em Física, Goiânia, 2015.
Bibliografia.
Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Porfirinas. 3. Imunoglobulinas G. 4.
Fluorescência. 5. Herpesvírus bovino. I. Gonçalves, Pablo José, orient.
II. Título.

Agradecimentos

- ✚ À Deus por ter me mantido com saúde e disposição para o trabalho.
- ✚ À minha esposa Fernanda pela paciência e compreensão em todos os momentos em que estive me dedicando a este trabalho.
- ✚ À minha filhinha Ester que é a razão de todo o meu esforço.
- ✚ À toda a minha família, especialmente aos meus pais que sempre me encorajaram a prosseguir.
- ✚ Ao professor Pablo José Gonçalves pela paciência, confiança em mim depositada, pelas discussões e grandes ensinamentos durante a realização deste trabalho.
- ✚ À todos os colegas de grupo pelas inúmeras contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.
- ✚ Ao professor Guilherme e toda a sua equipe pela participação direta no desenvolvimento deste trabalho.
- ✚ Ao Instituto de Física de UFG pela oportunidade de crescimento pessoal.
- ✚ À FAPEG pela bolsa de pesquisa.

Resumo

Este trabalho teve por objetivo estudar a interação entre moléculas orgânicas e anticorpos visando seu uso em sistemas de entrega de fármacos e diagnóstico fluorescente. Foram investigadas moléculas orgânicas de porfirinas e anticorpos reativos a Herpesvírus bovino, micro-organismo amplamente disseminado em rebanhos de corte e leite. Para o desenvolvimento deste projeto foram empregadas técnicas espectroscópicas de absorção UV/Vis, emissão fluorescente e espalhamento ressonante. Os resultados obtidos apresentaram indícios de que a ligação entre as porfirinas e os anticorpos ocorre. As constantes de ligação associadas à essa interação sugeriram alta afinidade das porfirinas pelos anticorpos. As investigações da conformação dos anticorpos indicaram que a sua estrutura enovelada não é significativamente afetada pelas porfirinas e os estudos de Transferência de Energia Ressonante de Förster sugeriram que esse mecanismo pode ser o principal responsável pela supressão da fluorescência dos anticorpos pelas porfirinas.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Novas armas no combate a micro-organismos	1
1.2	Inativação Fotodinâmica de Micro-organismos	2
1.3	Moléculas Orgânicas Fotossensíveis	4
1.4	Imunoglobulinas G	6
1.5	“Drug Delivery”: uma proposta para o problema do alvo na PDI.....	6
1.6	Imunoconjugado como ferramenta de inativação e diagnóstico BoHV	8
1.7	O Papel da Física.....	9
2	Objetivos	10
3	Materiais e Métodos	11
3.1	Materiais	11
3.1.1	Fotossensibilizadores	11
3.1.2	Anticorpos	12
3.2	Técnicas experimentais	13
3.2.1	Modelo fotofísico	14
3.2.2	Espectroscopia de absorção	16
3.2.3	Espectroscopia de fluorescência	18
3.2.4	Anisotropia de fluorescência	20
3.2.5	Espalhamento ressonante de luz	21
3.3	Metodologia	22
3.3.1	Rendimento quântico de fluorescência	22
3.3.2	O efeito de filtro interno	23
3.3.3	Preparação das amostras de IgG.....	24
3.3.4	Preparação das amostras de porfirinas.....	25
3.3.5	Monitoramento dos espectros de absorção e fluorescência	25
3.3.6	Aparato experimental	25
4	Resultados e discussões	27
4.1	Investigação da formação de complexos entre as porfirinas e IgG	27
4.2	Estudo da conformação dos anticorpos	32
4.3	Avaliação da afinidade das porfirinas por IgG	39

4.4	Transferência de energia ressonante de Förster	45
5	Conclusões.....	50
6	Perspectivas futuras	52
7	Referências	53

Lista de Figuras

Figura 1: Mecanismos de ação da PDI [17].....	3
Figura 2: Estrutura do núcleo de porfirinas [23].....	4
Figura 3: Espectro de absorção óptica de uma porfirina mostrando a banda de Soret a) e as bandas Q b)	5
Figura 4: Representação esquemática da ação fotodinâmica do imunoconjugado. Adaptado de [13].....	7
Figura 5: Estruturas das porfirinas a) TPPS e b) TMPyP.....	11
Figura 6: Estrutura esquemática de um anticorpo. Nessa figura estão representados os domínios variáveis das cadeias leves (light - V_L) e pesados (heavy - V_H) bem como os domínios constantes das cadeias leves (light - C_L) e pesadas (heavy - C_H). Estão representados também as porções Fab (região de reconhecimento da IgG pelas células do sistema imune) e Fc (região de reconhecimento do antígeno). Adaptado de [54].....	13
Figura 7: Diagrama de Jablonski mostrando: A (Absorção), CI (Conversão Interna), RV (Relaxamento Vibracional), F (fluorescência), CIS (Cruzamento Intersistemas) e P (fosforescência). Adaptado de [56].....	15
Figura 8: Atenuação do feixe de luz pela amostra [57].....	16
Figura 9: Diagrama esquemático do funcionamento de um espectrofotômetro [57].	18
Figura 10: Diagrama esquemático do funcionamento de um espectrofluorímetro [57].....	19
Figura 11: Diagrama esquemático da medida de anisotropia. Adaptado de [61].	20
Figura 12: Esquema de uma aplicação da técnica de espalhamento de luz. O reconhecimento do antígeno pelos anticorpos acoplados aos nanobastões, promove um aumento das dimensões das partículas da amostra, provocando, dessa forma, um aumento na intensidade da luz espalhada. Adaptado de [68].	22
Figura 13: Representação da luz incidindo sob um ângulo de 90° com a face da cubeta. Modificado de [61].	24
Figura 14: a) Espectros de absorção da solução de IgG com o acréscimo da concentração de TMPyP até $7,5 \mu\text{M}$ b) Detalhe das alterações ocorridas nas bandas Q (normalizadas em 519 nm) da TMPyP na presença de IgG c) Detalhe da absorção na banda da IgG (280 nm).	28

Figura 15: a) Espectros de absorção da solução de IgG com o acréscimo da concentração de TPPS até 7,5 μ M, b) Detalhe das alterações ocorridas nas bandas Q (normalizadas em 517 nm) da TPPS na presença de IgG c) Detalhe da absorção na banda da IgG (280 nm).	30
Figura 16: Espectros de absorção (A) e emissão (E) dos aminoácidos aromáticos em solução aquosa e pH 7. Adaptado de [61].	31
Figura 17: Espectros de emissão do anticorpo na presença de concentrações crescentes de a) TMPyP e b) TPPS, c) curvas de saturação das supressões de fluorescências de IgG por TPPS e TMPyP.	34
Figura 18: Efeito da exposição do triptofano no espectro de emissão. A perda da estrutura enovelada da proteína, isto é, a maior exposição dos resíduos de triptofano provoca um deslocamento das bandas de emissão para o vermelho, além de uma forte mudança no perfil das bandas de emissão. Adaptado de [61].	35
Figura 19: Espectros de espalhamento na presença e na ausência de a) TMPyP e b) TPPS.	38
Figura 20: Espectros de supressão de fluorescência com os respectivos gráficos de Hill para a) TMPyP e b) TPPS.	43
Figura 21: Representação esquemática da excitação dos resíduos de triptofano (a), as relaxações vibracionais (b), emissão fluorescente do triptofano (c) e a emissão do receptor (d). Adaptado de [99].	47
Figura 22: Sobreposições espectrais entre a emissão da IgG e o espectro de absorção molar das porfirinas a) TMPyP e b) TPPS.	48

Lista de abreviaturas

PBS: *Phosphate buffered saline* – Tampão fosfato salino

PDT: *Photodynamic Therapy* – Terapia fotodinâmica

PDI: *Photodynamic Inactivation* – Inativação fotodinâmica

FS: Fotossensibilizador

TPPS: *meso-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirina*

TMPyP: *meso-tetrakis(4-metilpiridil)porfirina*

IgG: Imunoglobulina G

BoHV: Herpesvirus bovino

IBR: Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

IPV: Vulvovaginite Pustular Infecciosa

CDRs: *Complementarity Determining Regions* – Regiões determinantes de complementaridade

C_L: Cadeia leve

C_H: Cadeia pesada

UV/Vis: Ultravioleta/Visível

FRET: *Förster resonance energy transfer* - Transferência de Energia Ressonante de Förster

1 Introdução

1.1 Novas armas no combate a micro-organismos

Há muito tempo, o controle de micro-organismos vem sendo uma preocupação constante para as civilizações. Ao longo de nossa história, parte significativa de muitas culturas foi destruída por doenças causadas por micro-organismos. Atualmente, o controle desses patógenos tem ocupado posição de destaque em pesquisas na área farmacológica. Podemos citar, por exemplo, o advento dos fármacos antibióticos que obtiveram um grande sucesso no combate a enfermidades microbianas nos últimos 50 anos. Entretanto, observações mais recentes vêm indicando que alguns patógenos já apresentam resistência a determinados antibióticos [1, 2]. Nesse sentido, se torna evidente a necessidade de investimentos na busca por formas alternativas de combate a micro-organismos patógenos.

A luta contra esses patógenos e outras moléstias (câncer, problemas dermatológicos e outros) utilizando radiação eletromagnética e moléculas orgânicas fotossensíveis tem sido responsável pelo desenvolvimento de novas técnicas que se mostram cada vez mais promissoras [3]. Um trabalho pioneiro, considerado marco histórico, foi publicado por Raab em 1900, onde foi demonstrada a morte de micro-organismos quando expostos à luz solar e ao ar na presença de alguns corantes [4]. Três anos após a publicação dos trabalhos de Raab, Tappenier e Jesionek apresentaram a inviabilização de células tumorais pela ação da luz na presença do corante eosina [5]. Após um longo período sem contribuições significativas nesta área, a pesquisa sobre o efeito fotodinâmico de moléculas orgânicas aplicado à inativação de micróbios tem atraído novamente a atenção de muitos pesquisadores nas últimas décadas [6 - 9].

A aplicação do efeito fotodinâmico na inviabilização de células está estabelecida em uma forma terapêutica conhecida como Terapia Fotodinâmica (PDT – *Photodynamic Therapy*). A PDT tem obtido êxito no tratamento de câncer e nos últimos anos tem sido aplicada para o controle e combate de fungos e outros micro-organismos [3, 10, 11]. Além de matar micro-organismos de forma eficaz, a ação fotodinâmica pode ser uma solução interessante para o problema de resistência adquirida. O termo frequentemente empregado para identificar a ação fotodinâmica aplicada em micro-organismos é “Inativação Fotodinâmica” (PDI - *Photodynamic Inactivation*) [3].

Outra proposta que vem ganhando destaque na medicina moderna é a utilização de sistemas de entrega dirigida de fármacos, o qual visa aumentar a seletividade na distribuição de fármacos bem como na ação farmacocinética, reduzindo seus efeitos colaterais [12]. Dentre os diversos sistemas de entrega de fármacos que vem sendo elaborados e apresentados na literatura, o uso de anticorpos para vetorização dos medicamentos a alvos específicos tem obtido sucesso, especialmente em trabalhos que utilizam anticorpos reativos a antígenos expressos por células tumorais [13 - 16]. Dessa forma, a ideia central do presente trabalho é investigar a formação de complexos de anticorpos reativos ao micro-organismo Herpesvirus Bovino com fotossensibilizadores (FS) visando uma forma alternativa de diagnóstico e o aumento da seletividade da ação fotodinâmica na inativação desse vírus.

1.2 Inativação Fotodinâmica de Micro-organismos

De uma forma geral, a ação fotodinâmica consiste na combinação de uma molécula orgânica fotossensível, oxigênio molecular (abundante em material biológico) e luz visível. O mecanismo da ação fotodinâmica está apresentado na Figura 1. Quando irradiada por luz com um comprimento de onda específico, a molécula orgânica fotossensibilizadora em seu estado

fundamental (S_0) sofre uma transição eletrônica para um estado excitado (S_1). A relaxação do estado excitado (S_1) pode ocorrer por processos radiativos (fluorescência) e não radiativos via conversão interna ou cruzamento intersistemas. Neste último, a molécula sofre uma inversão de spin eletrônico formando o estado tripleto (T_1).

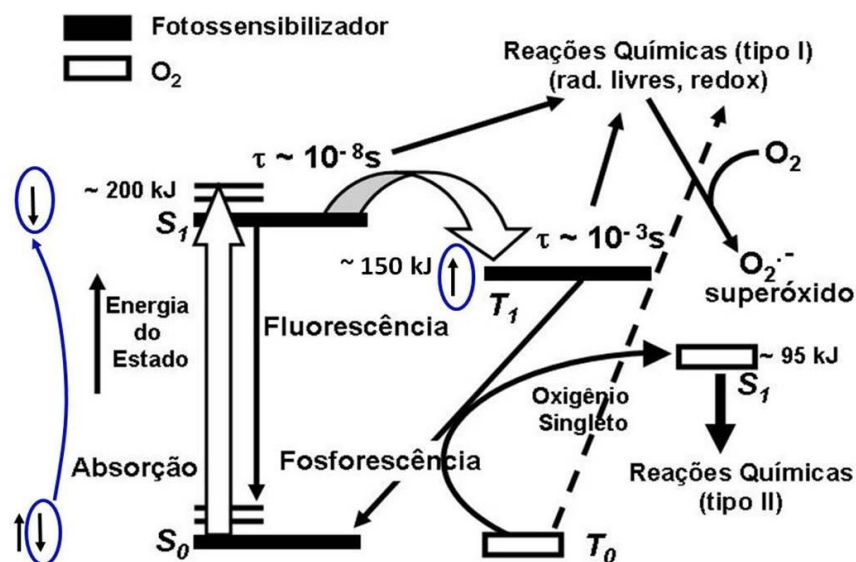


Figura 1: Mecanismos de ação da PDI [17].

Estando ainda no estado excitado (S_1) ou (T_1), a molécula pode perder elétrons para moléculas em sua vizinhança gerando, dessa forma, espécies reativas capazes de provocar morte celular [18]. A inviabilização celular que ocorre através da ação dessas espécies reativas é conhecida como mecanismo do tipo I. No processo de relaxação do estado tripleto para o fundamental, o FS pode fornecer energia para o oxigênio molecular, em seu estado fundamental tripleto, formando uma espécie altamente reativa, o oxigênio singleto, que também pode provocar a morte de células [19]. A atividade citotóxica relacionada com essa via de desativação do FS é conhecida como mecanismo do tipo II.

Apesar dos mecanismos I e II serem capazes de inviabilizar células, a atividade citotóxica tem sido atribuída principalmente ao mecanismo do tipo II [20]. Os mecanismos de ação da PDI

(tipos I e II) faz dessa terapia uma técnica interessante no combate às possíveis adaptações genéticas que deixam as células ou os micro-organismos mais resistentes aos fármacos tendo em vista a diversidade de alvos moleculares dentro da célula [21].

1.3 Moléculas Orgânicas Fotossensíveis

Porfirinas são moléculas orgânicas que desempenham um papel fundamental na natureza. Constituem, por exemplo, a clorofila, importante no processo fotossintético das plantas, e o grupo heme que está associado a estrutura da hemoglobina, responsável pelo transporte e armazenamento do oxigênio molecular nos animais [22]. Possuem em sua estrutura um macrociclo contendo quatro anéis pirrólicos que lhe proporcionam uma extensa conjugação π , conforme apresentado na Figura 2.

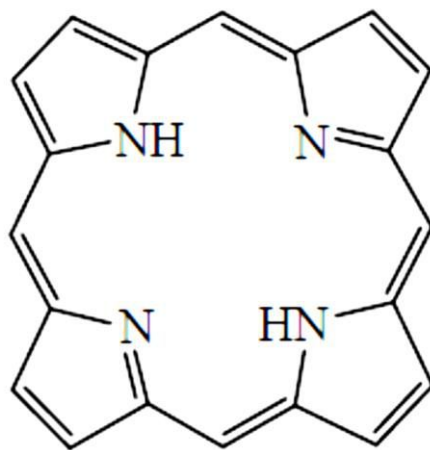
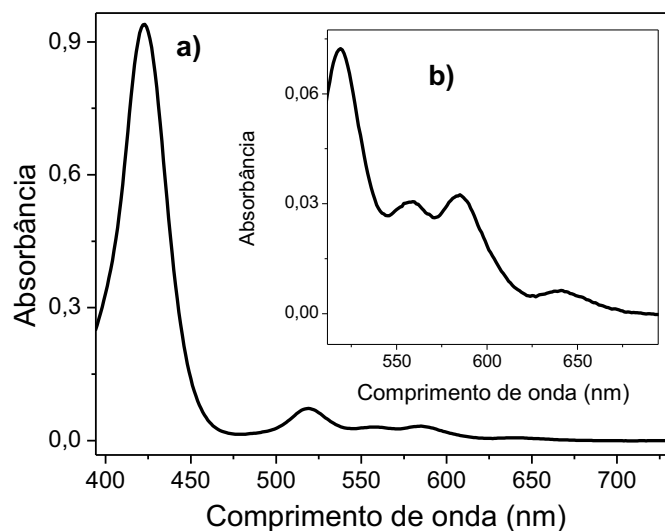


Figura 2: Estrutura do núcleo de porfirinas [23].

As porfirinas são caracterizadas por uma intensa absorção na região próxima de 400 nm denominada banda de Soret ou banda B (Figura 3a), e outras quatro bandas entre 500-650 nm conhecidas como bandas Q (Figura 3b). Embora os picos das bandas Q sejam bem menos intensos que o pico da banda B, muitas aplicações são conduzidas usando fonte de luz vermelha

entre 620 e 635 nm, dentro da “janela terapêutica”, onde ocorre uma maior penetração da luz em tecidos vivos [24].



*Figura 3: Espectro de absorção óptica de uma porfirimina mostrando a banda de Soret **a)** e as bandas Q **b)**.*

As porfirinas e derivados de hematoporfirinas já vêm sendo comumente empregadas na PDT com boa eficiência [25, 26] e são consideradas fotossensibilizadores de primeira geração. Essas moléculas apresentam alta eficiência de formação de estados tripleto e de formação de oxigênio singlete e ainda possuem fluorescência quando excitadas com luz na região do visível ou do ultravioleta próximo [25].

Outra classe de moléculas fotossensíveis de origem sintética e de estrutura próxima às porfirinas são as ftalocianinas. Essas moléculas têm recebido atenção para aplicações em PDT/PDI nos últimos anos devido à sua estabilidade, não-toxicidade no escuro e boa penetrabilidade nas membranas celulares [27], além de possuir uma intensa absorção na região de 600 – 800 nm, na janela terapêutica [28, 29].

1.4 Imunoglobulinas G

Tradicionalmente as proteínas do soro sanguíneo são divididas em albuminas e globulinas. Os anticorpos são encontrados no grupo das globulinas juntamente com as lipoproteínas (proteínas responsáveis pelo transporte de lipídeos). Os anticorpos também são denominados Imunoglobulinas (Ig) ressaltando a função que eles desempenham no sistema imunológico [30]. As imunoglobulinas são classificadas de acordo com sua estrutura em IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, sendo que a IgG é a classe de moléculas de anticorpo mais abundante do soro sanguíneo [30]. A estrutura da IgG, anticorpo de interesse nesse trabalho, será discutida com mais detalhes adiante.

Os anticorpos estão presentes nos vertebrados e desempenham papel crucial na resposta imunológica contra todo tipo de patógenos infecciosos e até mesmo contra substâncias estranhas não-infecciosas [30]. Circulam pelos organismos dos vertebrados livres ou conectados às membranas dos linfócitos B (células produtoras de anticorpos) e são capazes de aderir precisamente a alvos específicos conhecidos como antígenos, que podem ser vírus, bactérias, toxinas, dentre outros.

1.5 “Drug Delivery”: uma proposta para o problema do alvo na PDI

A maioria dos fármacos frequentemente empregados não possui alvo específico o que pode levar a efeitos colaterais. Os sistemas de *drug delivery* são construídos para direcionar o fármaco ao alvo desejado, reduzindo tais efeitos. O direcionamento dos fármacos para locais específicos aumenta o controle sobre sua liberação o que também permite maior eficácia no tratamento com menores dosagens [31]. A ideia de se obter um sistema que possa guiar fármacos a alvos específicos foi levantada por Paul Erlich no início do século passado [32] e

diversas propostas de nanoestruturas carreadoras têm sido apresentadas nas últimas décadas [33 - 35].

As moléculas orgânicas fotossensíveis apresentam certa seletividade e, em aplicações oncológicas, têm sido explorada sua afinidade por células que se dividem rapidamente [36]. É esperado que, quando isolados, nem a luz nem os agentes fotossensíveis sejam tóxicos, mas quando combinados acabem danificando o alvo desejado podendo atingir algumas das células vizinhas. A elaboração de um sistema imunoconjugado combinando agentes fotossensíveis e anticorpos pode ajudar a resolver parte desses problemas. Afinal, os anticorpos são capazes de aderir a alvos específicos com elevada precisão e ao transportarem os fotossensibilizadores, esses compostos ficam aderidos apenas ao alvo, o que reduziria ou impediria os danos as células vizinhas (Figura 4).



Figura 4: Representação esquemática da ação fotodinâmica do imunoconjugado. Adaptado de [13].

Atualmente já existem alguns trabalhos que demonstram a viabilidade do acoplamento de fotossensibilizadores com anticorpos ou fragmentos de anticorpos específicos contra receptores de células tumorais [37 - 39]. Existem também muitos estudos *in vivo* que vêm comprovando o aumento da seletividade da ação fotodinâmica de moléculas fotossensíveis

quando acopladas com anticorpos utilizados na terapia contra o câncer [13, 40]. No entanto, não existem relatos do acoplamento de fotossensibilizadores com anticorpos reativos a Herpesvirus Bovino (BoHV), patógeno de interesse para saúde animal.

1.6 Imunoconjugado como ferramenta de inativação e diagnóstico BoHV

O BoHV, pertencente à família dos herpesvirus, é responsável por muitos prejuízos econômicos para a pecuária leiteira e de corte, além de representar um obstáculo no comércio internacional de animais vivos e seus subprodutos [41]. A infecção provocada pelo BoHV atinge, dentre outros órgãos, os tratos respiratório e genital dos bovinos, sendo caracterizada, principalmente, por duas manifestações clínicas: Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV). A infecção respiratória muitas vezes evolui para quadros respiratórios graves e a contaminação genital pode causar, dentre outros sintomas, infertilidade nas fêmeas [42]. Uma forma de transmissão importante ocorre através da cópula ou por inseminação artificial, sendo que nessa última o sêmen ocupa posição de destaque na disseminação do vírus [43].

Diante disso, a investigação da incorporação de FS em anticorpos visa a obtenção imunoconjugados capazes de inativar o BoHV presente em material biológico ou subprodutos de origem animal. Esses imunoconjugados mostram-se como potencial sistema de *drug delivery* que pode permitir que a inativação fotodinâmica proporcionada pelos FS seja específica para o BoHV presente em material biológico.

As técnicas de diagnóstico do BoHV utilizadas atualmente ocorrem através da detecção do vírus, ensaios moleculares para detecção do DNA viral, pela detecção dos componentes virais ou imunoglobulinas geradas pela infecção do patógeno e por meio de testes sorológicos [44]. Espera-se que a caracterização fotofísica dos imunoconjugados realizadas nesse trabalho

possa fornecer suporte para a implementação de uma abordagem de baixo custo de diagnóstico e que, em tese, deve aumentar a sensibilidade e especificidade relativamente aos testes sorológicos utilizados atualmente.

1.7 O Papel da Física

Historicamente a Física vem fornecendo enormes contribuições para as áreas de saúde através do desenvolvimento de tecnologias que auxiliam tanto no diagnóstico com no tratamento de muitas doenças. O conhecimento da Física sobre a estrutura da matéria e a sua interação com a radiação eletromagnética tem promovido nas últimas décadas um importante avanço na medicina. Além das tradicionais radioterapia e radiodiagnóstico, podemos citar, a revolução introduzida pelo LASER nas cirurgias mais delicadas, em procedimentos oftalmológicos, na eliminação de cálculos renais e desobstrução de artérias [45] e no tratamento de câncer via PDT.

Portanto, a proposta desse trabalho é utilizar os conceitos físicos sobre propriedades ópticas de moléculas orgânicas fotossensíveis para subsidiar a utilização dos imunocorregulados em sistemas biológicos. Para dar suporte, diversos conceitos e metodologias da Físico-química serão empregados. A investigação mais detalhada desses imunocorregulados abrange ainda diversas áreas do conhecimento, tais como, Medicina Veterinária Preventiva, Imunologia e Farmacologia, Bioquímica e Biologia Molecular e Biofísica. Desta forma, a execução deste trabalho exige um esforço de caráter multidisciplinar. À Física cabe oferecer um conjunto de técnicas e metodologias que permitem investigar as propriedades fotofísicas desses complexos, avaliar sua eficiência e viabilidade, propor sistemas mais eficientes e novas metodologias ou desenvolvimento de novas tecnologias.

2 Objetivos

Este projeto de pesquisa tem por objetivo estudar a incorporação de moléculas orgânicas em anticorpos, visando seu uso como sistema de entrega de fármacos (*drug delivery*) e fotodiagnóstico de patógenos.

Especificamente, serão avaliadas as moléculas orgânicas de porfirinas: *meso*-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirina (TPPS) e *meso*-tetrakis(4-metilpiridil)porfirina (TMPyP). Os anticorpos a serem estudados são reativos a Herpesvirus bovino (BoHV), um vírus presente em rebanhos bovinos de praticamente todo o mundo [41]. Para o desenvolvimento deste trabalho serão empregadas técnicas espectroscópicas de absorção UV/Vis, emissão fluorescente, anisotropia de fluorescência e espalhamento ressonante. Como objetivos específicos iremos avaliar a incorporação das porfirinas TMPyP e TPPS em anticorpos através:

1. Do monitoramento as alterações dos parâmetros fotofísicos (espectros de absorção e emissão fluorescente) devido a incorporação dos FS nos anticorpos;
2. Das constantes de ligação e coeficientes de Hill obtidos a partir dos dados de supressão de fluorescência associada a formação de complexos;
3. Do estudo de Transferência de Energia Ressonante de Förster (FRET) na ligação entre o anticorpo e as porfirinas.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Fotossensibilizadores

Foram utilizadas neste trabalho as porfirinas *meso*-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirina (TPPS) e *meso*-tetrakis(4-metilpiridil)porfirina (TMPyP) adquiridas comercialmente.

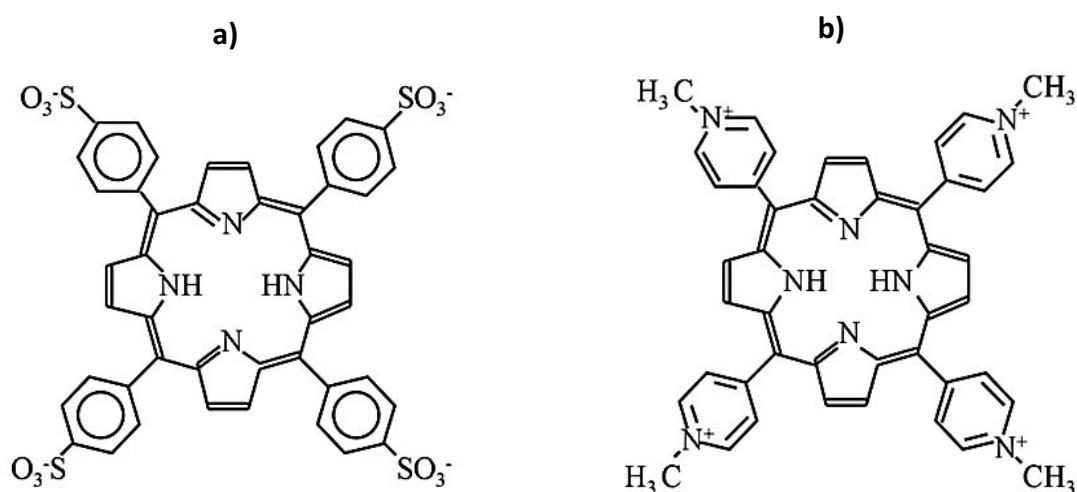


Figura 5: Estruturas das porfirinas **a)** TPPS e **b)** TMPyP.

A porfirina TPPS (Figura 5 **a**) é um composto aniônico, de origem sintética, com boa solubilidade em meio aquoso e que tem sido empregada com sucesso em Terapia Fotodinâmica [46, 47]. A TPPS apresenta a possibilidade de protonação em seu anel central quando se encontra em ambiente ácidos, com pH menores que 4,0 [17]. Em sua forma não protonada possui altos rendimentos quânticos de formação de estado tripleto ($\varphi_T = 0,78$) [48] e de produção de oxigênio singlete ($\varphi_{^1\text{O}_2} = 0,62$) [49], características importantes para os objetivos desse trabalho.

A porfirina TMPyP (Figura 5 b) possui caráter catiônico e além de possuir estabilidade para um intervalo extenso de pH, apresenta boa solubilidade e baixa tendência para agregação tanto em meio aquoso quanto em solventes orgânicos [50]. Essa porfirina também apresenta alto rendimento quântico de formação de oxigênio singleto ($\phi_{^1O_2} = 0,77$) [51]. O potencial fototóxico da TMPyP tem sido aplicado com sucesso na inativação de fungos e outros micro-organismo, como bactérias Gram-negativas sendo a sua natureza catiônica decisiva nesse processo [52, 53].

3.1.2 Anticorpos

A IgG, representada esquematicamente na Figura 6, isótipo de anticorpo utilizado neste trabalho, é constituída por uma estrutura básica simétrica formada por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas também idênticas, onde, ao longo de toda a sua estrutura existem unidades homólogas repetidas denominadas *domínios do anticorpo*. Tanto a cadeia leve quanto a pesada possuem uma região aminoterminal, que participa do reconhecimento antigênico, e uma região carboxiterminal que está associada principalmente ao reconhecimento do anticorpo pelas células do sistema imune.

É possível observar poucas alterações na estrutura molecular fora das regiões de reconhecimento antigênico (domínios constantes C_H e C_L) de anticorpos reativos para determinado antígeno. Por outro lado, existe uma enorme variabilidade na conformação molecular dos locais de ligação ao antígeno (domínios variáveis V_H e V_L). A hipervariabilidade dessas regiões, também denominadas “*Complementarity Determining Regions – (CDRs)*” confere aos anticorpos o poder de reconhecer qualquer corpo estranho ao organismo [30].

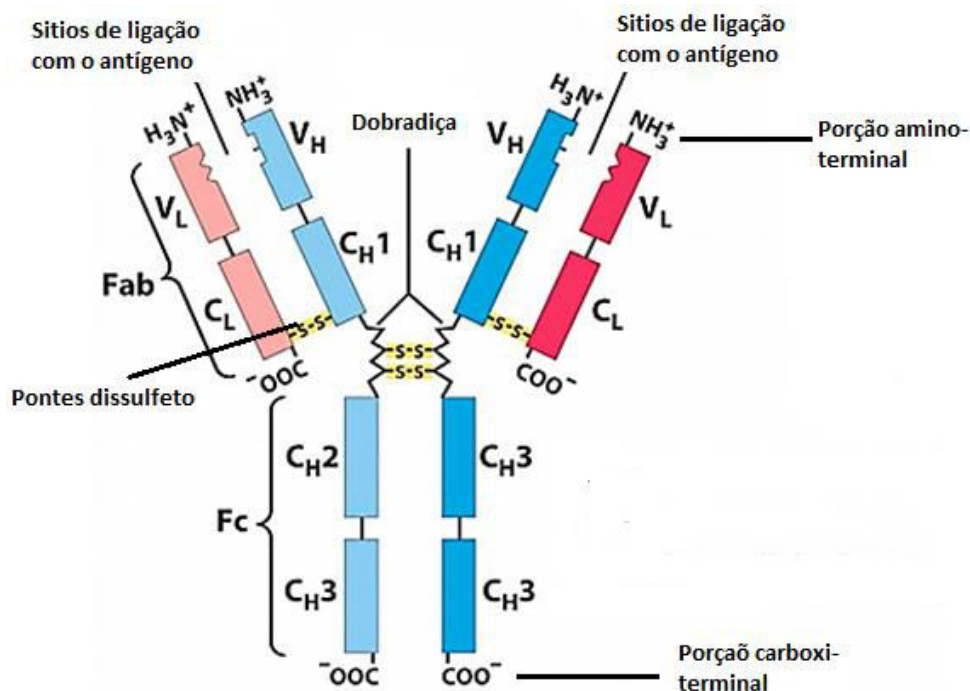


Figura 6: Estrutura esquemática de um anticorpo. Nessa figura estão representados os domínios variáveis das cadeias leves (light - V_L) e pesadas (heavy - V_H) bem como os domínios constantes das cadeias leves (light - C_L) e pesadas (heavy - C_H). Estão representados também as porções Fab (região de reconhecimento da IgG pelas células do sistema imune) e Fc (região de reconhecimento do antígeno). Adaptado de [54].

Os anticorpos empregados nesse projeto são reativos à BoHV. Eles foram selecionados e purificados pelo grupo do Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

3.2 Técnicas experimentais

Quando ocorre a incidência de radiação eletromagnética sobre uma amostra, podem ocorrer diversos processos, tais como absorção, o espalhamento e a reflexão. A parte da radiação que incide na amostra e é absorvida, pode provocar uma transição eletrônica, excitando as moléculas do material irradiado. Utilizando as técnicas de espectroscopia de absorção, podemos quantificar a radiação absorvida em função do comprimento de onda. Após

a absorção a molécula pode perder seu excesso de energia na forma de fótons, fluorescência e fosforescência, que podem ser avaliadas através da técnica de espectroscopia luminescente. As espectroscopias de absorção e emissão fluorescente fornecem valiosas informações tanto sobre a estrutura molecular do material em análise quanto sobre suas interações com outros sistemas. Para compreensão desses mecanismos será apresentado um modelo na próxima seção.

3.2.1 Modelo fotofísico

O ponto de partida para o conhecimento das características de moléculas orgânicas é entender os processos fotofísicos envolvidos. Para isso, consideremos o diagrama de níveis de energia, também conhecido como diagrama de Jablonski, Figura 7, consistindo de um estado fundamental singlete (S_0), dois estados excitados singletos (S_1 e S_2) e um estado excitado tripleto (T_1).

No equilíbrio termodinâmico, as moléculas se encontram no estado singlete fundamental S_0 . Após a absorção de um fóton de energia apropriada, esta molécula sofre uma transição para algum estado excitado, S_1 ou S_2 . Uma vez no estado S_2 , por exemplo, a molécula irá perder parte do excesso de energia por conversão interna (CI) e atingir o estado S_1 . A partir do estado S_1 a molécula poderá relaxar por três caminhos:

1. Retornar ao estado fundamental S_0 por processo radiativo, através da emissão fluorescente (F);
2. Retornar a S_0 por processo não radiativo de conversão interna (CI) ou
3. Sofrer um cruzamento intersistemas (CIS) formando o estado tripleto, devido a uma inversão de spin [55].

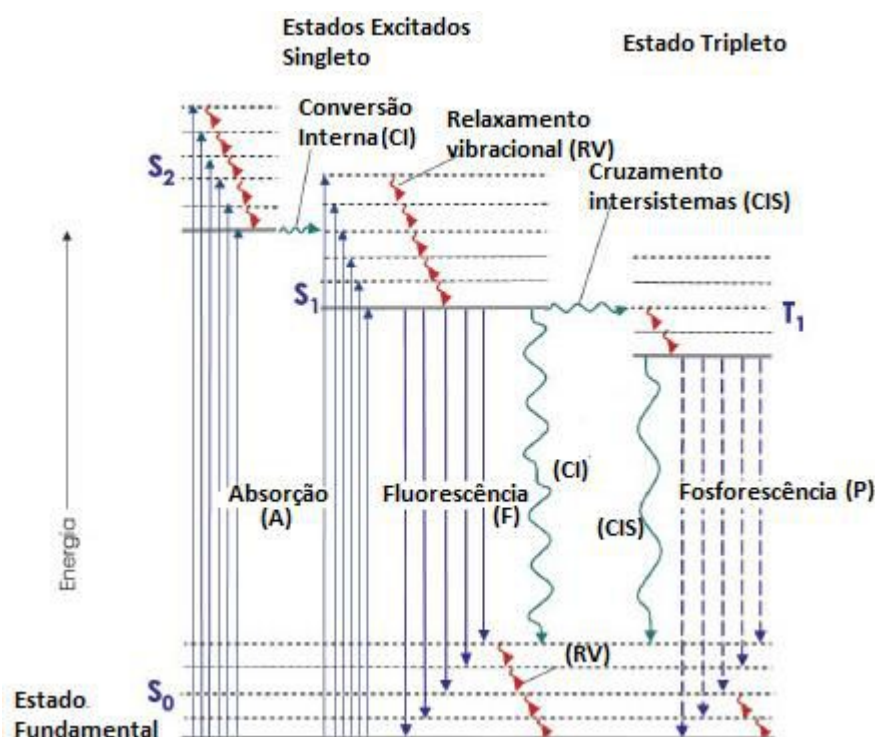


Figura 7: Diagrama de Jablonski mostrando: A (Absorção), CI (Conversão Interna), RV (Relaxamento Vibracional), F (fluorescência), CIS (Cruzamento Intersistemas) e P (fosforescência). Adaptado de [56].

Os estados tripletos têm um importante papel na ação da PDT/PDI, pois é a principal via para a ação fotodinâmica devido a formação do oxigênio singleto (seção 1.2). A partir do estado tripleto a molécula ainda poderá perder energia de forma não radiativa, por cruzamento intersistemas, ou de forma radiativa por fosforescência.

A interação entre os FS e os anticorpos deve provocar mudanças nas características fotofísicas dos FS, tais como, na sua estrutura eletrônica, níveis de energia, polarizabilidades, dentre outros. Para uma completa investigação dos processos envolvidos é necessária uma série de técnicas espectroscópicas que serão listadas a seguir.

3.2.2 Espectroscopia de absorção

O processo de absorção da radiação pode ser descrito através da lei de Beer-Lambert, que nos mostra a dependência entre a atenuação do feixe incidente com a concentração das moléculas da amostra e a extensão do caminho sobre o qual ocorre a absorção.

Considere um feixe de luz de intensidade I_0 incidindo numa amostra de caminho óptico l e concentração c , Figura 8. Em virtude das interações entre os fótons e as partículas absorvedoras, a intensidade do feixe decresce de I_0 para I . A lei Beer prevê um decaimento exponencial para a intensidade da luz incidente descrito pela relação:

$$I = I_0 \cdot 10^{-A} \quad (1)$$

sendo A a absorbância da amostra. A transmitância T da amostra é a fração da radiação incidente transmitida pela solução, que pode ser expressa da seguinte forma:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

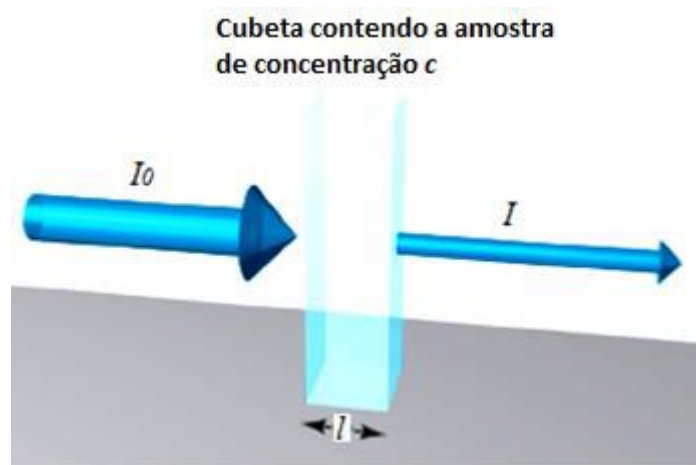


Figura 8: Atenuação do feixe de luz pela amostra [57].

Aplicando o log na equação (1) a absorbância A de uma solução fica relacionada com a transmitância de forma logarítmica, como mostrado na equação 3:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (3)$$

Por outro lado a lei de Beer-Lambert pode ser escrita em termos da absorbância, concentração da amostra c e do caminho óptico l do meio absorvente,

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (4)$$

sendo ε o coeficiente de absorção molar da amostra que é dependente da energia, ou comprimento de onda, da radiação incidente. A relação (4) não é válida para concentrações muito elevadas, pois nessa situação as perdas por reflexão e/ou espalhamento passam a ser importantes [58]. Na prática, para contornar o problema das concentrações elevadas, utiliza-se um caminho óptico menor e dessa forma a lei de Beer-Lambert continua sendo válida. A lei de Beer-Lambert pode ser empregada de diversas formas. Podemos calcular o coeficiente de absorção molar das espécies se a concentração for conhecida. Uma das grandes vantagens de utilizar a equação (4) consiste em poder obter a concentração de uma amostra se os valores da absorbância, coeficiente de absorção molar e caminho óptico forem conhecidos.

Os espectrofotômetros, figura 9, são equipamentos que permitem medir a razão entre as potências dos feixes transmitido e incidente (forma experimental empregada para se obter o valor da absorbância). Várias dezenas de modelos de espectrofotômetros estão disponíveis comercialmente. A maioria dos espectrofotômetros cobre a região do UV/Vis e, ocasionalmente, a região do infravermelho próximo.

No diagrama da Figura 9, a luz emitida pela fonte estável (1) é recebida pelo seletor de comprimento de onda (2) que seleciona uma região limitada do espectro para a medida. Esse seletor, em geral, é composto por um colimador de entrada, uma rede de difração que difrata

a luz proveniente da fonte, e um colimador de saída que seleciona os comprimentos de onda da luz difratada. Em seguida a luz passa pela amostra (3) e segue para o detector de radiação (4) que converte a energia radiante em um sinal elétrico mensurável que finalmente é processado (5).

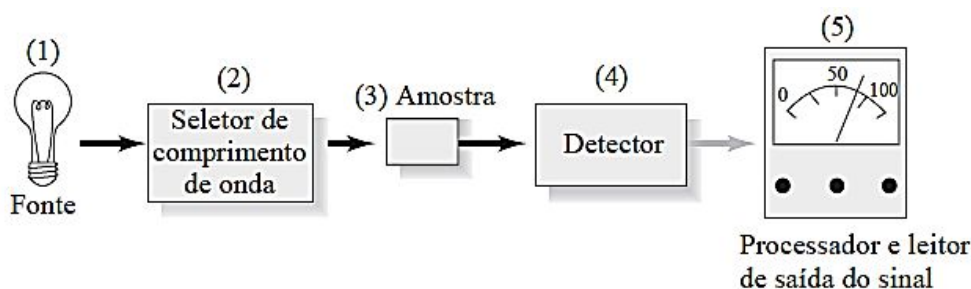


Figura 9: Diagrama esquemático do funcionamento de um espectrofotômetro [57].

As lâmpadas de filamento de tungstênio/halogênio (Wl_2) são comumente empregadas como fontes para a região visível. Elas fornecem uma distribuição de comprimentos de onda de 320 a 2.500 nm. Geralmente, essas lâmpadas operam a uma temperatura de cerca de 2.900 K, a qual produz radiação útil a partir de cerca de 350 até 2.200 nm [59]. Para a região do UV, normalmente se usa lâmpada de deutério, com boa emissão de 160 – 375 nm. O material da cubeta (recipiente que contém a amostra) deve transmitir a radiação na região de comprimento de onda do experimento. O vidro silicato comum é adequado para o uso na região do visível e apresenta a grande vantagem de ser de baixo custo. Na região do UV, em comprimentos de onda mais curtos que 380 nm, o vidro começa a absorver e deve ser substituído por quartzo ou sílica fundida [59].

3.2.3 Espectroscopia de fluorescência

No processo de relaxação da amostra excitada, o elétron permanece no estado singlete excitado por um tempo da ordem de nanossegundos. Este tempo é suficiente para que a

molécula excitada interaja com o meio, tornando o processo de emissão fluorescente fortemente dependente da sua vizinhança. A técnica de detecção de emissão fluorescente é muito importante pois fornece informações valiosas sobre o meio em que a molécula se encontra [56].

Enquanto a absorção fornece informações sobre o primeiro passo dos processos fotofísicos, a espectroscopia de fluorescência permite avaliar os processos de relaxação e transferência de energia. Esta última pode ser empregada na sua forma estática e temporal. Através de estudos sistemáticos empregando essas diferentes técnicas, podemos obter parâmetros importantes como constante de ligação, taxa de supressão, rendimento quântico de fluorescência, tempo de vida e anisotropia de fluorescência [60].

O diagrama da Figura 10 apresenta o princípio de funcionamento de um espectrofluorímetro, onde a luz de excitação emitida pela fonte (1) passa pelo seletor (2) e incide na amostra (3). Outro seletor de comprimento de onda (2) é necessário para selecionar os comprimentos de onda da emissão. Como indica o diagrama, a detecção é feita sob um ângulo de 90° para evitar a radiação transmitida [61].

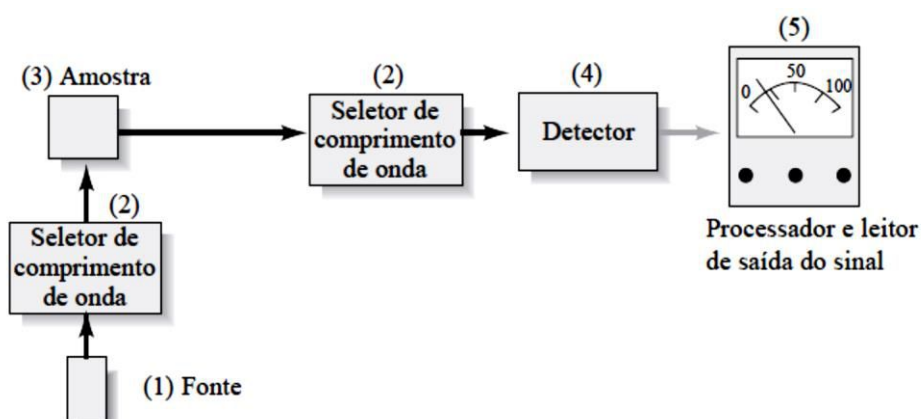


Figura 10: Diagrama esquemático do funcionamento de um espectrofluorímetro [57].

3.2.4 Anisotropia de fluorescência

A medida de anisotropia fornece informações sobre grau de rigidez de ambientes moleculares ou sobre alterações nas dimensões das partículas da amostra. Em uma solução homogênea, as moléculas fluorescentes, ainda em seu estado fundamental, possuem momentos de transição orientados aleatoriamente. Ao serem excitadas com luz polarizada, somente os fluoróforos (moléculas fluorescentes) com momentos de transição na mesma direção da polarização da luz incidente irão absorver.

A despolarização da emissão pode ser causada por alguns fenômenos que dependem do tipo de amostra investigada, no entanto, essa despolarização é devida principalmente à difusão rotacional. A rotação de uma molécula em solução ocorre em geral no intervalo de 50-100 ps, com isso é possível que uma molécula realize várias rotações enquanto estiver no seu estado excitado cujo tempo de vida é da ordem de nanossegundos.

A Figura 11 mostra um esquema experimental de como podem ser obtidas medidas de anisotropia. A amostra é excitada com luz polarizada na direção z, e na direção da emissão é colocado um polarizador que ora está na direção perpendicular, ora está na mesma direção de polarização da luz que excita a amostra. Dessa forma, é possível obter uma estimativa da fração da luz polarizada incidente que não sofre alterações significativas na sua direção de polarização.

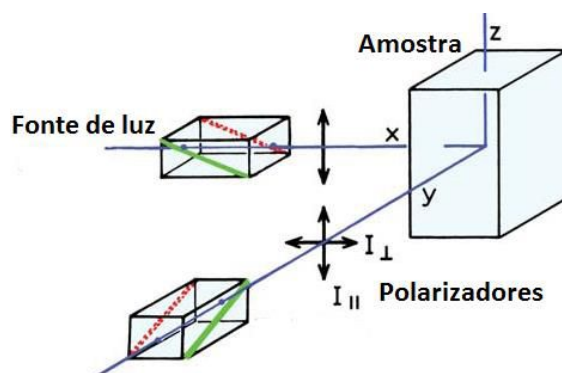


Figura 11: Diagrama esquemático da medida de anisotropia. Adaptado de [61].

A anisotropia de fluorescência é quantificada pela seguinte equação [62]:

$$r_f = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}}, \quad (5)$$

onde $I_{//}$ é a intensidade de luz emitida que está polarizada paralelamente a luz incidente e $I_{\perp}$ é a intensidade de luz emitida que está polarizada perpendicularmente a luz incidente. Observe que quando $I_{\perp} \approx 0$ (sistema mais rígido) a anisotropia assume maiores valores e por outro lado quando $I_{//} \approx I_{\perp}$ (sistema com mais mobilidade) a anisotropia é próxima de zero.

A medida da anisotropia de fluorescência é uma técnica importante no estudo da conformação de proteínas, tendo em vista que a desnaturação da proteína aumenta a sua flexibilidade resultando numa redução da sua anisotropia [63].

3.2.5 Espalhamento ressonante de luz

Se um conjunto de moléculas polarizáveis são irradiadas por luz, ocorre uma interação entre o campo elétrico oscilante da luz incidente e a distribuição eletrônica das moléculas, de tal forma que elas passam a apresentar uma polarizabilidade induzida pelo campo externo. Isso promove uma oscilação nos elétrons que irá se comportar como pequenas antenas, dispersando parte da energia em direções diferentes daquela da radiação incidente. Esse é o fundamento do fenômeno de espalhamento de luz [64]. A técnica de espalhamento de luz tem sido utilizada para obter informações sobre a forma de macromoléculas em solução e sobre agregação de cromóforos [65].

A intensidade com que uma partícula absorve ou espalha luz depende da sua forma e tamanho e por isso espera-se que a formação de complexos entre moléculas aumente o espalhamento de luz. Alguns trabalhos têm apresentado alterações nos espectros de espalhamento de porfirinas devido à presença de proteínas [66, 67]. A Figura 12 apresenta a

combinação de nanobastões, anticorpos e a técnica de espalhamento de luz no diagnóstico de um antígeno.

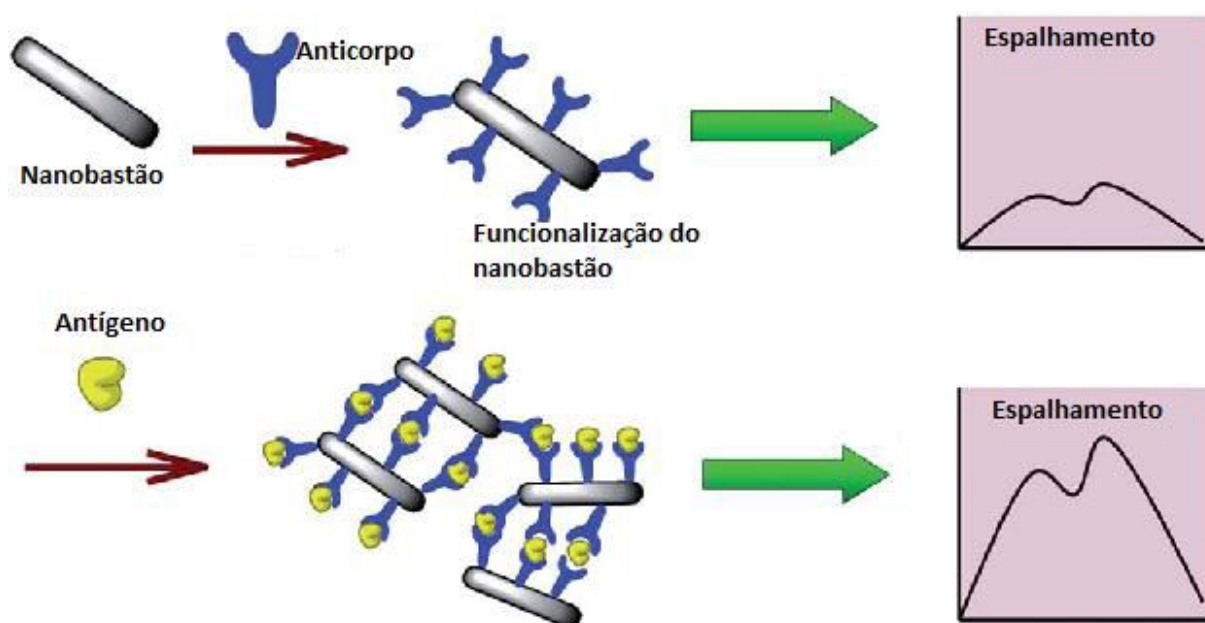


Figura 12: Esquema de uma aplicação da técnica de espalhamento de luz. O reconhecimento do antígeno pelos anticorpos acoplados aos nanobastões, promove um aumento das dimensões das partículas da amostra, provocando, dessa forma, um aumento na intensidade da luz espalhada.

Adaptado de [68].

3.3 Metodologia

3.3.1 Rendimento quântico de fluorescência

Rendimento quântico de fluorescência é a razão entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. A expressão para o cálculo do rendimento quântico de fluorescência (φ_F) é dada por:

$$\varphi_F = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} \quad (6)$$

onde k_f é a taxa de emissão fluorescente do fluoróforo e k_{nr} é a taxa de decaimento através de mecanismos não radiativos. No entanto, na prática é mais fácil determinar o rendimento quântico de uma molécula fluorescente pela comparação com padrões de rendimentos quânticos conhecidos, conforme a equação a seguir [61]:

$$\varphi_F = \varphi_R \frac{f}{f_R} \frac{A_R}{A} \frac{n_0^2}{n_{0R}^2} \quad (7)$$

Nessa equação, φ é o rendimento quântico de fluorescência, f é a área delimitada pelo espectro de emissão, A é a absorção e n_0 é o índice de refração do solvente da amostra. O subscrito R se refere ao fluoróforo de referência com rendimento quântico conhecido. Ao utilizar essa equação deve-se ter o cuidado de trabalhar com baixos valores de absorção para minimizar os efeitos de filtro interno que será discutido a seguir.

Se o solvente da amostra referência for o mesmo da amostra em estudo, a razão entre os índices refração na equação (7) fica igual a 1. No entanto, para solventes diferentes essa razão reflete a dependência da absorção e da emissão com o índice de refração [61].

3.3.2 O efeito de filtro interno

A intensidade de fluorescência observada em uma amostra depende não somente da absorção no comprimento de onda de excitação, mas também da geometria de iluminação da amostra e dos caminhos ópticos percorridos pela luz na excitação e na emissão. A geometria comumente utilizada é a incidência de luz na face da cubeta sob um ângulo reto, geometria também empregada neste trabalho.

Considerando que a luz que excita a amostra é focalizada no centro da cubeta, parte dessa luz é absorvida pela amostra ao longo do caminho óptico percorrido da face até o centro da cubeta. Da mesma forma, parte da luz que é emitida a partir do centro da amostra sofre

absorção ao longo do caminho óptico de emissão (Figura 13). Essas atenuações que ocorrem na excitação e na emissão são conhecidas como efeito de filtro interno.

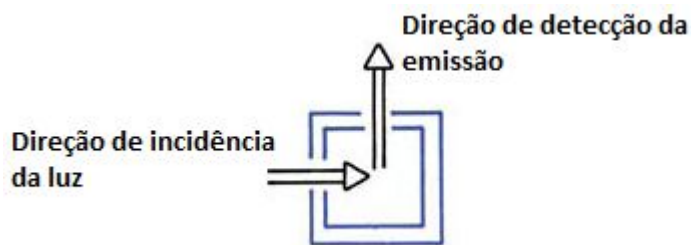


Figura 13: Representação da luz incidindo sob um ângulo de 90° com a face da cubeta. Modificado de [61].

Sabendo disso, a intensidade de fluorescência corrigida F_{corr} em termos da intensidade de fluorescência observada F_{obs} é dada por [61]:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{\left(\frac{A_{ex} \cdot l_{ex} + A_{em} \cdot l_{em}}{2} \right)}. \quad (8)$$

Nessa equação, A_{ex} é a absorbância no comprimento de onda de excitação, l_{ex} é o caminho óptico de excitação enquanto que A_{em} e l_{em} são os respectivos parâmetros para a emissão. A equação (8) não é adequada para amostras muito concentradas, porém ela é apropriada para os valores de concentrações utilizados neste trabalho. Existem portanto alternativas mais sofisticadas de correções de filtro interno quando não é possível trabalhar nos limites de validade da equação (8), isto é, baixa concentração ou caminho óptico curto [69].

3.3.3 Preparação das amostras de IgG

A partir de uma amostra inicial de 600 µL de IgG a uma concentração de 21,3 µM foram preparadas soluções estoques em alíquotas de 50 µL e congeladas individualmente. Esse procedimento foi adotado visando evitar uma possível desnaturação dos anticorpos em

consequência de sucessivos congelamentos/descongelamentos. As concentrações de IgG foram calculadas pela lei de Beer-Lambert, equação (4), considerando $\varepsilon_{280nm}^{IgG} = 2,1 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ [70]. Uma alíquota de 20 μL da solução estoque foi diluída em 830 μL de PBS (pH 7,4), resultando em uma amostra de 850 μL de solução de IgG com concentração 0,3 μM . A partir dessa amostra, foram obtidos dois volumes de 400 μL que foram utilizados nos experimentos.

3.3.4 Preparação das amostras de porfirinas

Foram preparadas inicialmente amostras de 53,0 μM de TMPyP ($\varepsilon_{422nm}^{TMPyP} = 2,3 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$) [71] e 45,5 μM de TPPS ($\varepsilon_{515nm}^{TPPS} = 1,3 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$) [72]. Essas amostras foram diluídas em PBS (pH 7,4) para se obter soluções estoques de TMPyP e TPPS com concentrações de 37,7 μM e 37,0 μM , respectivamente. As concentrações de porfirinas também foram obtidas pela equação (4).

3.3.5 Monitoramento dos espectros de absorção e fluorescência

Alíquotas de 10 μL das soluções estoque de porfirina foram adicionadas sequencialmente às soluções de IgG (0,3 μM). Com esse procedimento, fizemos a concentração de TMPyP variar de 0,92 μM até 7,54 μM e a concentração de TPPS variar de 0,90 μM até 7,40 μM . Para monitorar a interação entre as porfirinas e a IgG, foram obtidos os espectros de absorção e emissão. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

3.3.6 Aparato experimental

As medidas de absorção UV/Vis foram realizadas com um espectrofotômetro modelo *LAMBDA 950 UV/Vis/NIR Spectrophotometer*, marca *Perkin-Elmer*, e as medidas de fluorescência em um espectrofluorímetro modelo *Fluorolog-FL3-221*, marca *Horiba/Jobin-Yvon*.

Inc, no laboratório de Física dos Materiais do IF/UFG. Foram empregadas cubetas de quartzo com duas faces polidas.

4 Resultados e discussões

4.1 Investigação da formação de complexos entre as porfirinas e IgG

A Figura 14a apresenta os espectros de absorção da solução de IgG com adição de TMPyP até a concentração de 7,5 μM . Na Figura 14b está o espectro de absorção da solução de IgG acrescida da concentração máxima de TMPyP, e no destaque vemos a comparação das bandas Q com as bandas Q da TMPyP na ausência de IgG. Para realizar essa comparação os espectros foram normalizados em 519 nm. Na Figura 14c estão evidenciadas as alterações que ocorrem na banda da absorção da IgG (280 nm) decorrentes do acréscimo de TMPyP. Em todos os espectros de absorção obtidos após a adição de porfirina foram feitas as correções na absorção devido a diluição.

Nos espectros da Figura 14a podemos identificar as bandas do anticorpo próximo a 280 nm e as bandas da TMPyP à medida em que a concentração dessa porfirina aumenta na solução. Ao observarmos a comparação apresentada na Figura 14b, percebemos uma sensível mudança no perfil das bandas Q da TMPyP quando comparado com o perfil dessas bandas na ausência de IgG. Nessa comparação, é possível observar um deslocamento da banda em 556 nm para o vermelho enquanto que as bandas em 584 nm e 640 nm ficam menos evidentes.

O exame cuidadoso da Figura 14c mostra que não são observados deslocamentos no intervalo 280-292 nm à medida que a concentração de TMPyP aumenta na solução. As alterações de perfil que ocorrem nessa região são devidas a sobreposição da absorção da TMPyP.

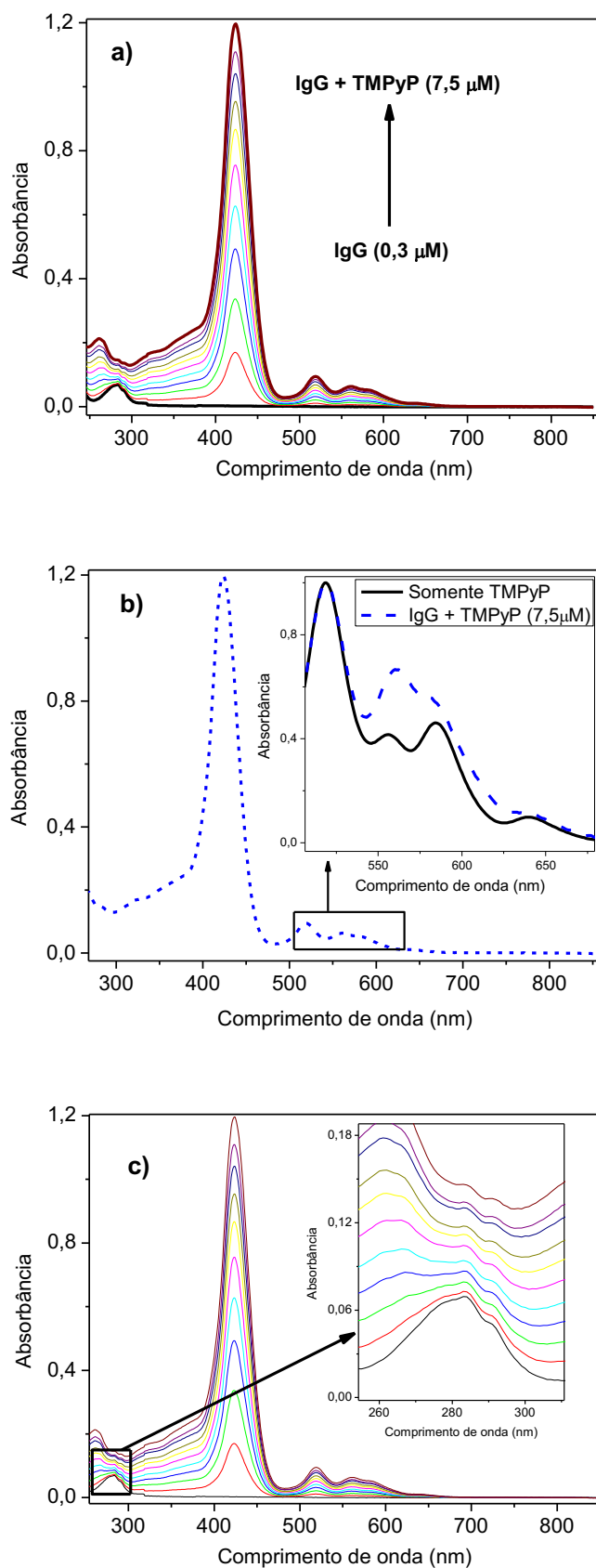


Figura 14: **a)** Espectros de absorção da solução de IgG com o acréscimo da concentração de TMPyP até 7,5 μ M **b)** Detalhe das alterações ocorridas nas bandas Q (normalizadas em 519 nm) da TMPyP na presença de IgG **c)** Detalhe da absorção na banda da IgG (280 nm).

Na Figura 15a estão apresentados os espectros de absorção da solução de IgG com acréscimo gradual de TPPS até a concentração de 7,4 μM . Na Figura 15b está o espectro de absorção da solução de IgG acrescida da concentração máxima de TPPS, e em destaque está a comparação das bandas Q com as bandas Q da TPPS na ausência de IgG. Para realizar essa comparação os espectros foram normalizados em 517 nm. A Figura 15c mostra as alterações que ocorrem na banda da absorção da IgG (280 nm) decorrentes do acréscimo de TPPS.

A comparação entre as bandas Q, apresentadas na Figura 15b, mostra uma mudança de perfil especialmente das bandas em 644 nm e 580 nm. Pode-se perceber também um deslocamento para o azul das bandas em 644 nm e 558 nm.

A Figura 15c mostra os detalhes das mudanças ocorridas na banda de absorção do anticorpo (280 nm). Na presença de concentrações crescentes de TPPS, a banda do anticorpo sofreu um aumento em sua intensidade. Entretanto, não foram observadas mudanças no perfil da banda e nem deslocamentos do pico.

Os espectros de absorção e emissão das porfirinas são sensíveis a modificações em sua estrutura tais como a introdução de átomos centrais e sua protonação. Apresentam ainda alterações (deslocamentos, supressão/criação de bandas e aumento de intensidade) com formação de agregados e complexos [73 - 75]. Monitorar os espectros de absorção é uma maneira simples e útil que pode ser utilizada para detectar mudanças estruturais das moléculas e a formação de complexos [76]. A comparação entre os espectros de absorção normalizados apresentados nas Figuras 14b e 15b, mostram mudanças de perfil das bandas Q. Essa mudança apresenta indícios que a ligação entre as porfirinas e o anticorpo está ocorrendo, e portanto, o processo de supressão de fluorescência estático pode existir na interação [76].

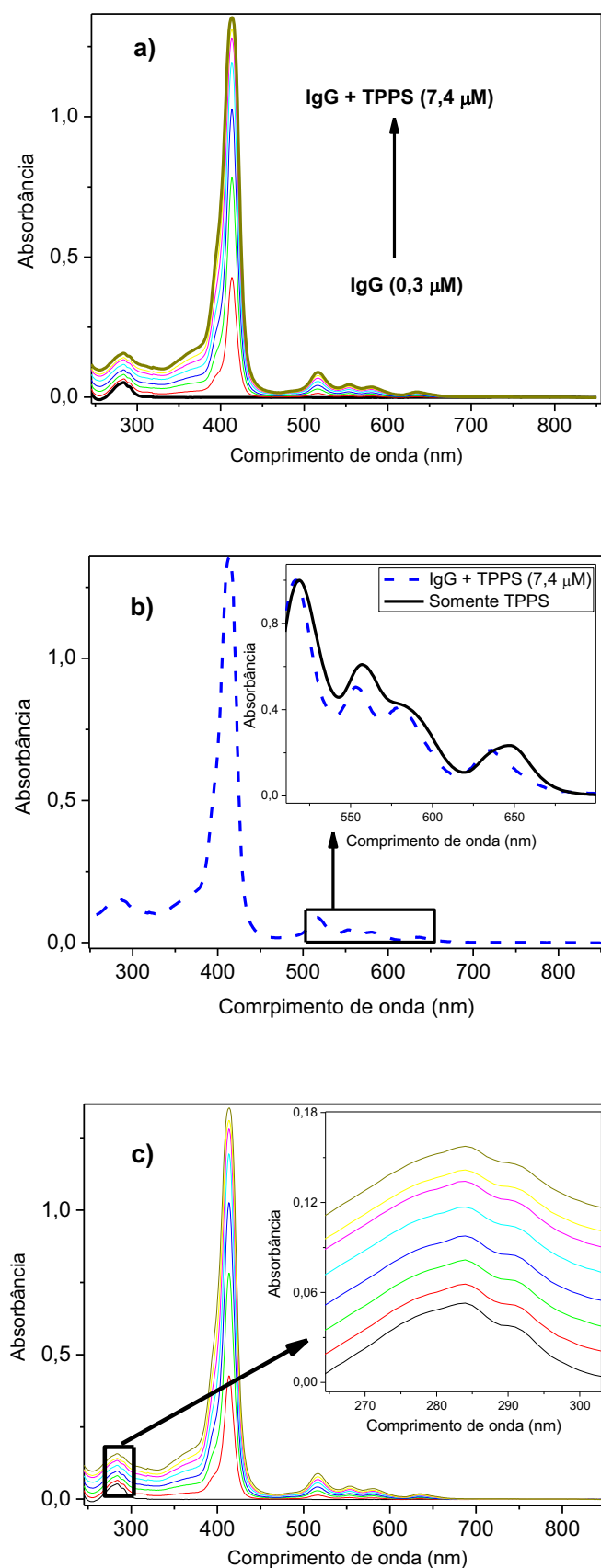


Figura 15: **a)** Espectros de absorção da solução de IgG com o acréscimo da concentração de TPPS até 7,5 μM , **b)** Detalhe das alterações ocorridas nas bandas Q (normalizadas em 517 nm) da TPPS na presença de IgG **c)** Detalhe da absorção na banda da IgG (280 nm).

Existem muitos relatos da utilização da emissão e absorção de proteínas com o objetivo investigar a sua estrutura e ainda obter informações sobre complexos ligante-proteína [77, 78]. As características de absorção e emissão intrínseca das proteínas é devida a três tipos de resíduos de aminoácidos aromáticos: tirosina (Tyr, Y), triptofano (trp, W) e fenilalanina (Phe, F). Os espectros via coeficiente de absorção molar (A) e emissão fluorescente (E) desses aminoácidos em solução aquosa (pH 7) estão apresentados na Figura 16.

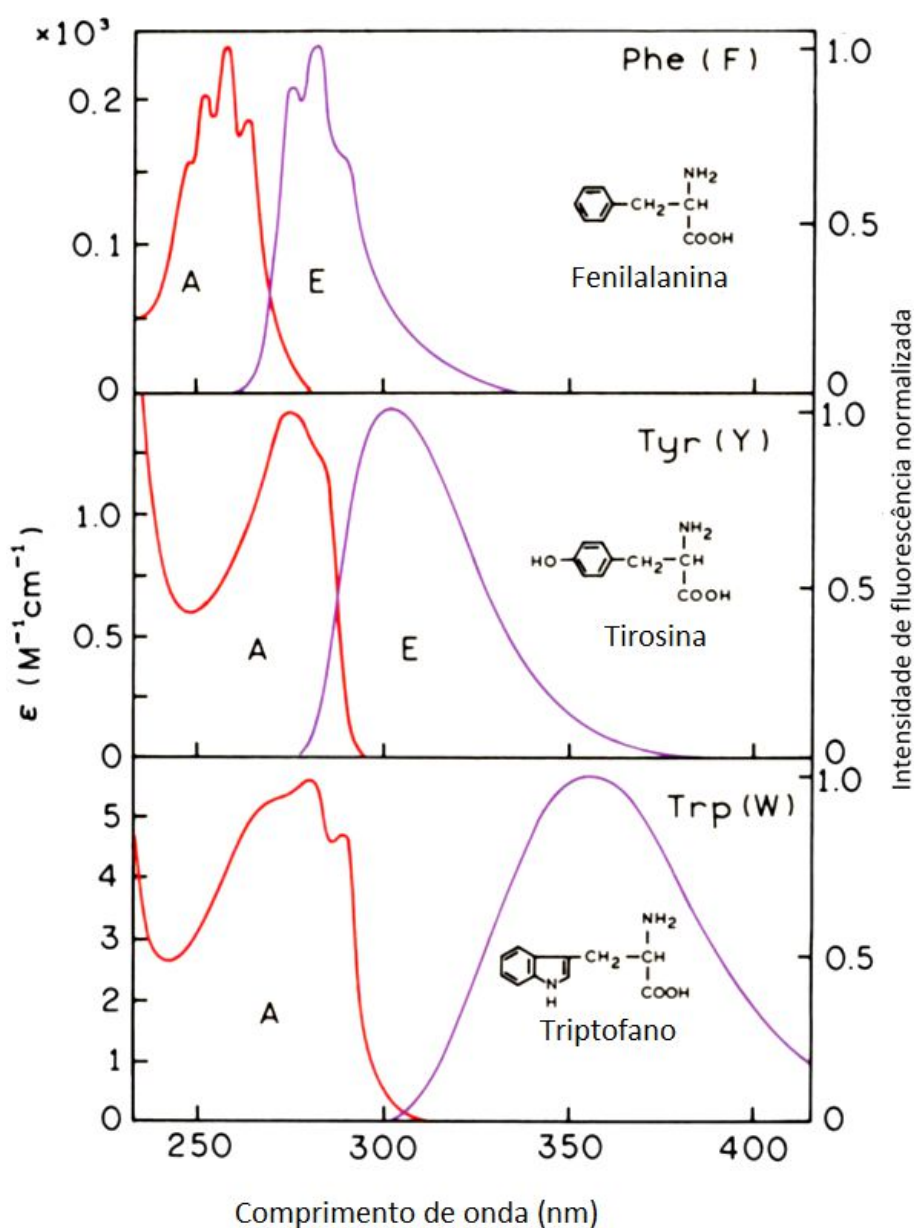


Figura 16: Espectros de absorção (A) e emissão (E) dos aminoácidos aromáticos em solução aquosa e pH 7. Adaptado de [61].

Os espectros da Figura 16 mostram que se a proteína for excitada em 280 nm, o que corresponde ao comprimento de onda de excitação da IgG nesse trabalho, a fenilalanina praticamente não é excitada. Com isso a absorção nessa região é praticamente devida à tirosina e triptofano. Entretanto, o pico de emissão permite identificar qual o principal aminoácido fluorescente.

A manutenção do perfil (semelhante ao perfil da absorção de Trp na Figura 16) das bandas de absorção da IgG com a adição das porfirinas (Figuras 14c e 15c) sugere que a conformação da IgG não sofre alterações significativas.

4.2 Estudo da conformação dos anticorpos

A Figura 17 apresenta os espectros de emissão do anticorpo com excitação em 280 nm na presença de concentrações crescentes de TMPyP (Figura 17a) e TPPS (Figura 17b). Foram realizadas as correções devidas ao efeito de filtro interno, equação (8), em todos os espectros de emissão.

Os espectros da Figura 17 mostram a supressão sofrida pela fluorescência da IgG devido ao aumento gradual das concentrações de porfirinas. Em ambos os espectros não foram observadas mudanças no perfil das bandas e nem deslocamento dos picos de emissão durante o processo de supressão da fluorescência.

De posse das curvas de emissão para cada valor de concentração de porfirina, [porfirina], construímos os gráficos da Figura 17c. Nesse gráfico, φ é o rendimento quântico de fluorescência na presença do supressor (porfirina), φ_0 é o rendimento quântico de fluorescência na ausência do supressor, de tal forma que a razão $\frac{\varphi_0 - \varphi}{\varphi_0} = \frac{\Delta\varphi}{\varphi_0}$ representa a fração da fluorescência inicial que é suprimida para uma dada concentração de supressor.

Os pontos foram ajustados pela função sigmoide:

$$y(x) = \alpha_1 + \frac{\alpha_1}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} \quad (9)$$

onde y representa a fração da fluorescência inicial suprimida $\left(y \equiv \frac{\Delta\varphi}{\varphi_0}\right)$, x é a concentração de

porfirina, α_1 é o valor máximo da fração inicial de fluorescência suprimida $\left(\alpha_1 \equiv \left(\frac{\Delta\varphi}{\varphi_0}\right)_{máx}\right)$ e x_0

é a concentração de porfirina correspondente à metade da fração máxima de fluorescência que pode ser suprimida. Os valores de α_1 obtidos do ajuste sigmoide mostraram uma saturação de 91% para o supressor TPPS e 83% para o supressor TMPyP, isto é, 9% da fluorescência da IgG não está acessível à TPPS e 17% dessa fluorescência não é acessível à TMPyP.

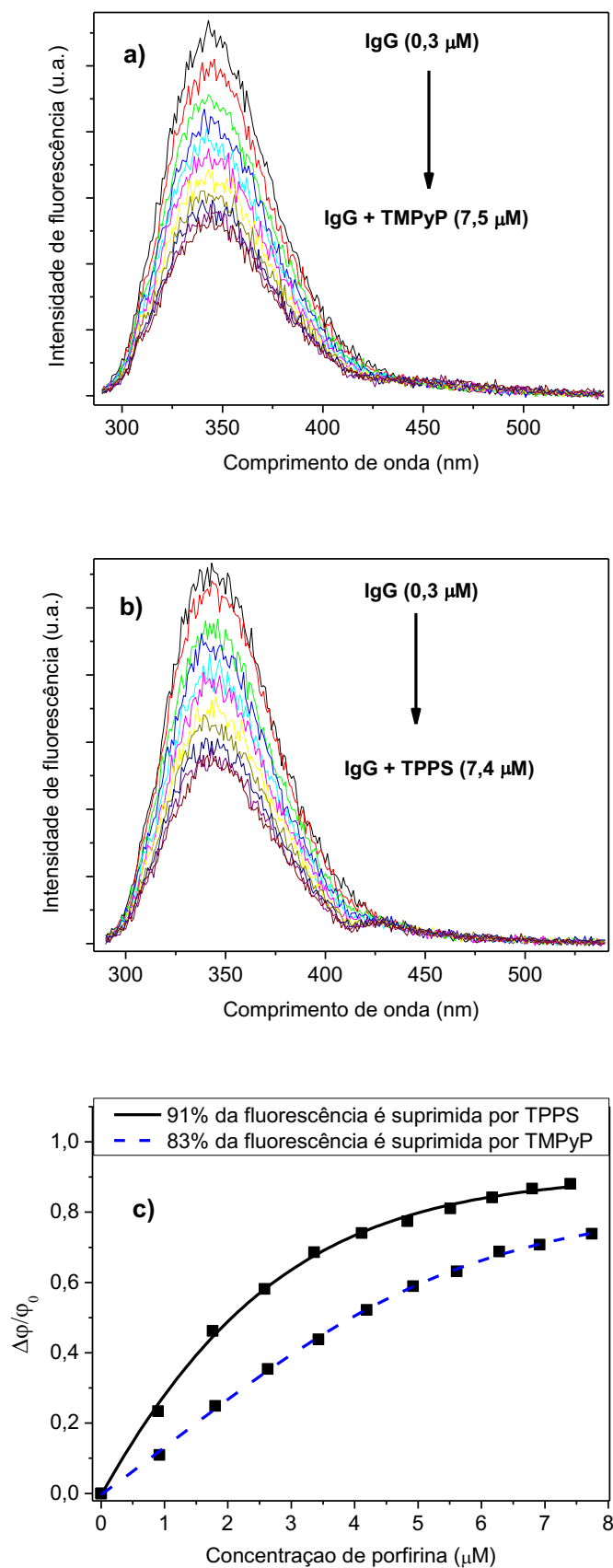


Figura 17: Espectros de emissão do anticorpo na presença de concentrações crescentes de **a)** TMPyP e **b)** TPPS, **c)** curvas de saturação das supressões de fluorescências de IgG por TPPS e TMPyP.

Os espectros de emissão de proteínas são muito sensíveis às possíveis mudanças de conformação. Alterações na sua estrutura podem expor os resíduos aromáticos, e com isso modificações importantes são observadas no perfil da emissão [79]. A Figura 18 ilustra como a exposição do triptofano pode afetar os espectros de emissão.

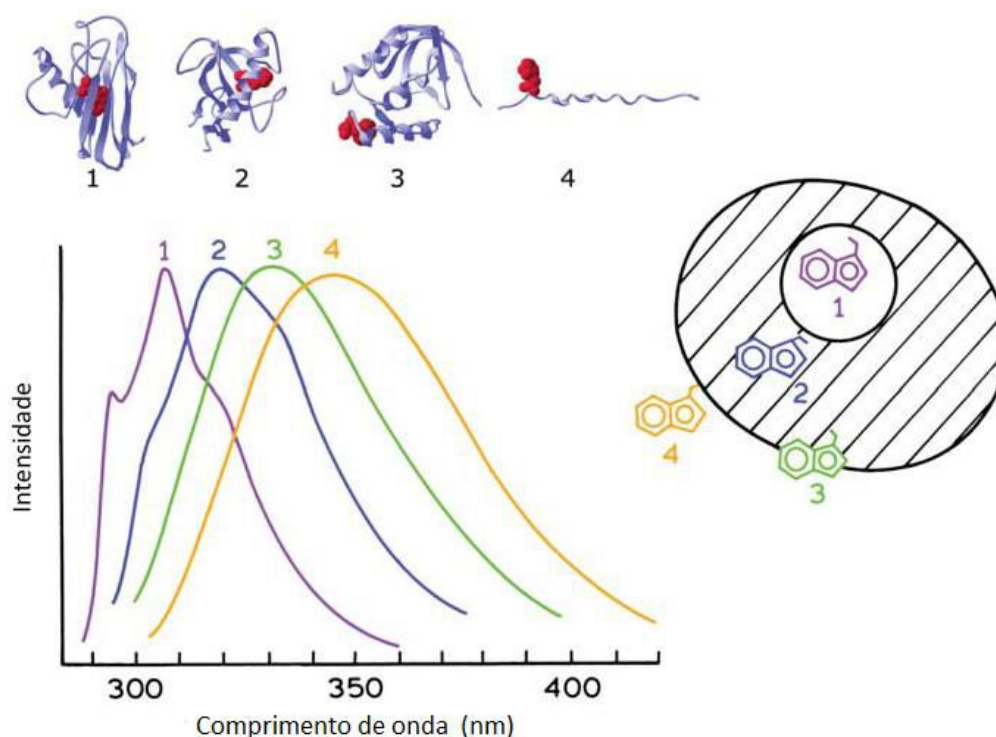


Figura 18: Efeito da exposição do triptofano no espectro de emissão. A perda da estrutura enovelada da proteína, isto é, a maior exposição dos resíduos de triptofano provoca um deslocamento das bandas de emissão para o vermelho, além de uma forte mudança no perfil das bandas de emissão. Adaptado de [61].

Tanto na supressão de fluorescência de IgG por TMPyP quanto na supressão de IgG por TPPS, não observamos deslocamentos e nem mudanças no perfil das bandas de emissão de IgG (Figura 17) reforçando os indícios de que o anticorpo não sofreu mudanças significativas na sua conformação. A manutenção da conformação da IgG quando ligada à porfirina é fundamental para a viabilidade da sua utilização como estruturas carreadoras de porfirinas para alvos

específicos, tendo em vista que o reconhecimento do antígeno está intimamente associado à conformação do anticorpo.

Os perfis e comprimentos de onda de emissão (343 nm) dos espectros da Figura 17, quando comparados com o perfil e comprimento de onda de emissão do triptofano na Figura 16, sugerem que o triptofano é o principal resíduo fluorescente da IgG. Entretanto a emissão em 343 nm indica que existem resíduos de triptofanos que estão contidos no interior da estrutura enovelada do anticorpo, conforme mostra a Figura 18. O ajuste sigmoide da Figura 17c revela que 17% da fluorescência da IgG não pode ser suprimida pela TMPyP e que 9% não sofre supressão pela TPPS. Uma molécula de IgG típica possui 18 resíduos de triptofano [80], dessa forma podemos dizer que a fluorescência de três resíduo de triptofano da IgG não é acessível à TMPyP e que a fluorescência de apenas um resíduo de triptofano não sofre supressão pela TPPS. Esse fato indica que existem regiões da IgG que não são acessíveis às porfirinas e, além disso, a porfirina TPPS (aniônica) parece possuir uma maior facilidade de penetração na estrutura enovelada da IgG.

O estudo da conformação de imunoglobulinas G e sua interação com ligantes, através da anisotropia de fluorescência, pode fornecer informações valiosas sobre o quanto a formação de complexos com outras moléculas afetam a sua estrutura [81]. Fizemos, então, o uso dessa técnica para investigar se os anticorpos perdem a sua estrutura na presença das porfirinas.

As medidas de anisotropia foram feitas pelo equipamento *Fluorolog-FL3-221* na configuração apresentada pela Figura 11 da seção 3.2.4. Essas medidas foram realizadas antes da adição das porfirinas nas soluções de IgG (0,3 μ M) e após termos obtido as concentrações máximas de porfirina nas soluções de IgG. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores das anisotropias para as soluções de anticorpo na ausência e na presença de porfirinas.

	Anisotropias	
	Somente IgG	IgG + [Porfirina]_{máx}
TMPyP	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,2
TPPS	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2

Cada valor de anisotropia apresentado na Tabela 1 é uma média de 20 medidas. Podemos observar que os valores de anisotropia não sofrem alterações significativas, sendo que as variações observadas estão contidas nas incertezas associadas as medidas.

Não é esperado que a incorporação da porfirina no anticorpo provoque mudanças nos valores de anisotropia, pois, sua massa molecular ($\approx 1kDa$) [82] é muito menor que a massa molecular da IgG ($\approx 150kDa$) [30] e, portanto, a mobilidade da IgG praticamente não é afetada. Por outro lado, os valores de anisotropia mostram que a conformação da IgG não sofre modificações importantes na presença das porfirinas, pois, mudanças drásticas em sua geometria provocariam reduções nos valores de anisotropia [81].

Na Figura 19 estão apresentados os espectros de espalhamento de luz que foram obtidos das soluções de IgG (0,3 μM) antes da adição de porfirina e após a obtenção da máxima concentração de porfirinas em solução de IgG.

Podemos observar que o perfil dos espectros de espalhamento na presença de porfirina, para comprimentos de onda fora dos vales apresentados, não mostram modificações significativas quando comparados com os espalhamentos na ausência de porfirinas. Os vales próximos a 420 nm são devidos à absorção da banda de Soret nesta região.

Os espectros de espalhamento de luz estão em concordância com os valores de anisotropia e com o que mostra os espectros de absorção e emissão. O espalhamento de luz é

sensível as mudanças nas dimensões das partículas da amostra [74, 75, 83], com isso não é esperado que a incorporação das porfirinas em IgG provoque aumentos significativos na intensidade de espalhamento, pois as moléculas de porfirinas [84] são muito menores que os anticorpos [85]. Também não foram observadas alterações nos espectros de espalhamento que pudessem ser atribuídas à perda da estrutura enovelada dos anticorpos.

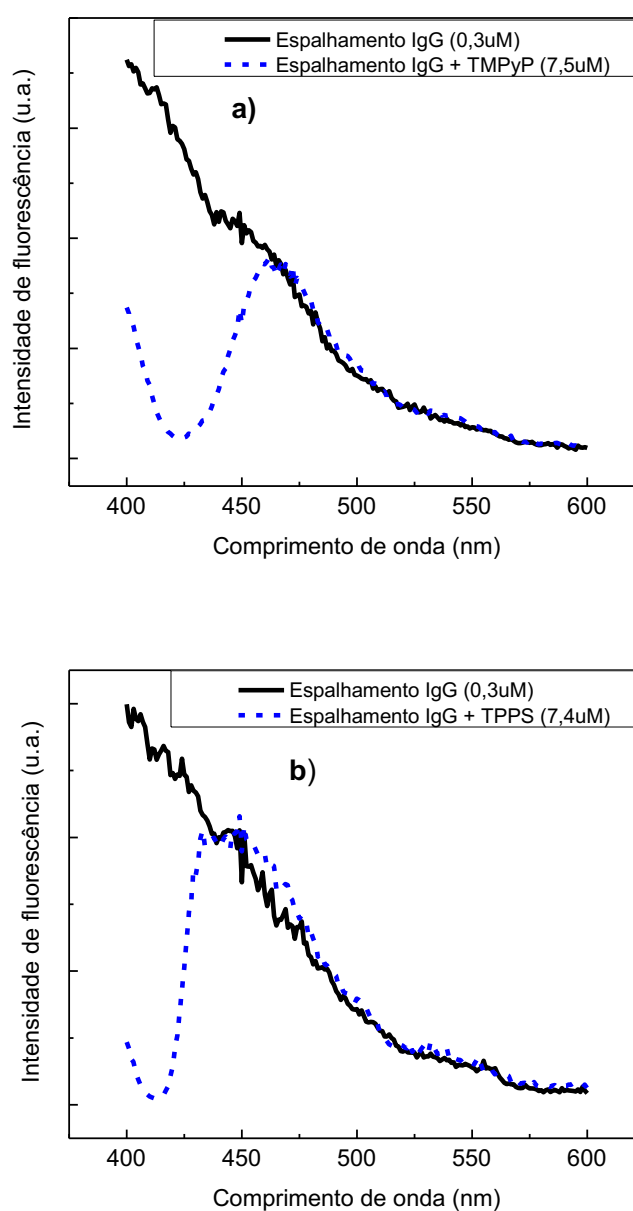


Figura 19: Espectros de espalhamento na presença e na ausência de **a)** TMPyP e **b)** TPPS.

4.3 Avaliação da afinidade das porfirinas por IgG

Os parâmetros que refletem a afinidade das porfirinas pelos anticorpos podem ser obtidos através dos dados de supressão da fluorescência. Supressão da fluorescência é qualquer processo que diminui a intensidade da fluorescência de uma amostra. Essa técnica tem sido amplamente utilizada como fonte de informações sobre sistemas biofísicos e bioquímicos [86 - 88]. Várias interações moleculares resultam em supressão de fluorescência: reações de estado excitado, rearranjos moleculares, formação de complexo no estado fundamental (supressão estática), supressão devido as colisões moleculares (supressão dinâmica) e transferência de energia [61].

Na supressão dinâmica ocorre a difusão do supressor para o fluoróforo durante o seu tempo de vida de estado excitado e após a colisão, o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem emissão de fótons. De modo geral a supressão dinâmica ocorre sem nenhuma alteração permanente nas moléculas envolvidas no processo, isto é, sem reação química. Por outro lado, na supressão estática ocorre a formação de um complexo não fluorescente no estado fundamental e a fluorescência que se observa da amostra é proveniente dos fluoróforos não complexados [61].

O estudo de supressão da fluorescência de proteínas fornece informações valiosas sobre interações de ligantes com proteínas [89]. Geralmente a interação de uma proteína (P) e um ligante (L) resulta na formação de um complexo (PL) e pode ser descrita por uma equação de equilíbrio do tipo:



Podemos associar uma constante de equilíbrio K_a à equação (10), de tal maneira que

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}. \quad (11)$$

A constante K_a reflete a afinidade do ligante à proteína, sendo denominada também de constante de associação ou constante de ligação [90]. Por isso, quanto maior for a constante de ligação, mais alta é a afinidade do ligante pela proteína.

Podemos escrever a fração θ dos sítios de ligação da proteína que são ocupados pelo ligante da seguinte forma,

$$\theta = \frac{\text{sítios de ligação ocupados}}{\text{total de sítios de ligação}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]}, \quad (12)$$

onde o denominador representa a soma de todos os sítios da proteína, ocupados $[PL]$ e desocupados $[P]$. Substituindo a equação (11) em (12) e rearranjando os termos obtemos:

$$\theta = \frac{[L]}{[L] + \frac{1}{K_a}} = \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (13)$$

onde $K_d = \frac{1}{K_a}$ é constante de dissociação, o recíproco da constante de associação. A partir de equação (13) podemos ver que K_d deve ser apresentado em unidades de concentração para que a fração θ continue adimensional.

Para uma proteína com n sítios de ligação, a equação de equilíbrio fica de seguinte maneira:



A expressão para θ fica:

$$\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d}. \quad (15)$$

Rearranjado os termos e tomando o log de ambos os lados obtemos:

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \log[L] - \log K_d. \quad (16)$$

A equação (16) é conhecida como equação de Hill e um gráfico de $\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right)$ em função de $\log[L]$ fornece n como coeficiente angular e a partir do coeficiente linear podemos obter a constante K_d .

A correspondência entre a equação de Hill e a supressão de fluorescência de uma proteína é feita através do parâmetro θ . Na prática, a estimativa desse parâmetro é dada pela fração da fluorescência inicial da proteína que é suprimida na presença do supressor. Quando fazemos essa correspondência, estamos dizendo que a fluorescência que está ao alcance do ligante/supressor em determinado sítio de ligação é suprimida, e que a fluorescência observada é proveniente de regiões da proteína onde se encontra os sítios de ligação desocupados. Portanto a correspondência fica da forma:

$$\theta = \frac{F_0 - F}{F_0} = \frac{\Delta F}{F_0}, \quad (17)$$

com, F_0 e F sendo as intensidades de fluorescência da proteína na ausência e na presença do supressor, respectivamente.

Obtivemos o parâmetro θ , para a construção dos gráficos de Hill associados as supressões de fluorescência apresentada na Figura 17, porém, utilizamos os rendimentos quânticos ao invés das intensidades de fluorescência com o objetivo de evitar as modificações causadas na emissão devidas as variações na absorção quando adicionamos porfirina na solução de IgG [91].

Os valores de rendimentos quânticos estão resumidos na Tabela 2, sendo que o rendimento quântico de referência utilizado foi o da própria IgG na ausência de porfirina, $\varphi_R = 0,06$ [92].

Tabela 2: Rendimentos quânticos para as medidas de supressão de fluorescência da IgG por (a) TMPyP e (b) TPPS.

(a)		(b)	
IgG (0,3 μM)	0,060	IgG (0,3 μM)	0,060
IgG + TMPP (0,92 μM)	0,053	IgG + TPPS (0,90 μM)	0,046
IgG + TMPP (1,80 μM)	0,045	IgG + TPPS (1,76 μM)	0,032
IgG + TMPP (2,63 μM)	0,039	IgG + TPPS (2,58 μM)	0,025
IgG + TMPP (3,43 μM)	0,034	IgG + TPPS (3,36 μM)	0,019
IgG + TMPP (4,19 μM)	0,029	IgG + TPPS (4,11 μM)	0,016
IgG + TMPP (4,92 μM)	0,025	IgG + TPPS (4,83 μM)	0,014
IgG + TMPP (5,61 μM)	0,022	IgG + TPPS (5,51 μM)	0,011
IgG + TMPP (6,28 μM)	0,019	IgG + TPPS (6,17 μM)	0,010
IgG + TMPP (6,92 μM)	0,018	IgG + TPPS (6,80 μM)	0,008
IgG + TMPP (7,54 μM)	0,016	IgG + TPPS (7,40 μM)	0,007

A Figura 20 mostra os espectros de supressão de fluorescência acompanhados dos seus respectivos gráficos de Hill.

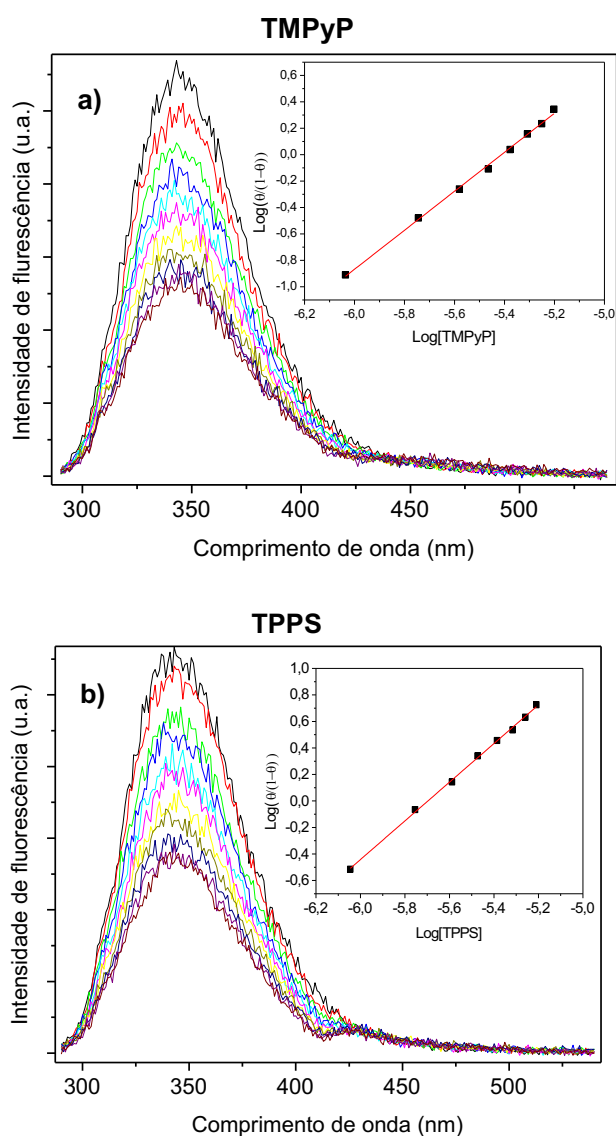


Figura 20: Espectros de supressão de fluorescência com os respectivos gráficos de Hill para a) TMPyP e b) TPPS.

A partir da inclinação e da intersecção com o eixo vertical do gráfico de Hill podemos obter o coeficiente de Hill e a constante de dissociação, respectivamente, conforme mostra a equação (16). O valor de constante de associação ou ligação é obtido pelo inverso da constante de dissociação. Os valores desses parâmetros estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores dos coeficientes de Hill e constantes de ligação para interação das porfirinas TMPyP e TPPS com IgG.

	Coeficiente de Hill n_H	Constante de ligação K_a (M^{-1})
TMPyP	$1,48 \pm 0,02$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^8$
TPPS	$1,49 \pm 0,02$	$(3,2 \pm 0,5) \times 10^8$

Os valores de constantes de ligação apresentados na Tabela 3 são comparáveis aos valores de constantes de ligação relativos à afinidade de imunoglobulinas G pela parede celular bacteriana de *estreptococos* [93]. A constante de ligação para a interação de TPPS (aniônica) com IgG é cerca de três vezes a constante de ligação associada a incorporação de TMPyP (catiônica) com o anticorpo, indicando portanto uma pior afinidade da porfirina TPPS pela IgG.

A Tabela 3 ainda mostra que os valores dos coeficientes de Hill para as duas porfirinas são praticamente iguais. É importante destacar que o valor de n obtido experimentalmente não reflete o número de sítios de ligação e sim o grau de interação entre eles. Por isso, a inclinação da reta obtida da equação (16) é definida como coeficiente de Hill, isto é, $n \equiv n_H$. Quando $n_H = 1$, a ligação do ligante não é cooperativa. Isto ocorre quando as subunidades da proteína não se comunicam entre si [90]. Se $n_H > 1$ (cooperatividade positiva) a ligação de uma molécula de ligante facilita a ligação de outras, e quando $n_H < 1$ (cooperatividade negativa) a ligação de uma molécula do ligante interfere com a ligação de outra [94].

O limite superior teórico para o coeficiente de Hill ocorre quando ele é igual ao número de sítios de ligação ($n = n_H$) e, nessa situação a ligação seria totalmente cooperativa, isto é, os ligantes ocupariam todos os sítios da proteína simultaneamente e não haveria nenhuma proteína parcialmente saturada sob qualquer condição. Na prática, esse limite nunca é atingido,

e o valor experimental de n_H é sempre menor que o número de sítios de ligação da proteína [90].

4.4 Transferência de energia ressonante de Förster

A teoria de transferência de energia ressonante de Förster (*Förster resonance energy transfer* – FRET) tem sido amplamente empregada em estudos de fluorescência de biomoléculas [95 - 97]. O uso disseminado de FRET é devido às distâncias favoráveis para ocorrência de transferência de energia que é tipicamente do tamanho de uma proteína. Além disso, as distâncias de FRET são facilmente calculadas a partir das propriedades espectrais da amostra em estudo [61].

FRET é um fenômeno que pode ser explicado tanto pela Eletrodinâmica Clássica quanto pela Eletrodinâmica Quântica. A transferência de energia ocorre entre uma molécula doadora no estado excitado e outra molécula receptora no estado fundamental se existir sobreposição entre o espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do receptor. A transferência de energia é um dos processos através do qual a supressão de fluorescência de um fluoróforo pode ocorrer, contudo é importante ressaltar que não ocorre aparecimento de fótons na transferência, mas sim uma interação dipolo-dipolo de “longo alcance” entre o doador e o receptor.

Além do grau de sobreposição espectral, a taxa de transferência de energia depende do rendimento quântico do doador, da orientação relativa entre os dipolos de transição e da distância entre as moléculas doadoras e receptoras. A taxa de transferência de energia é calculada por [98]:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6, \quad (18)$$

com τ_D sendo o tempo de vida do doador na ausência do receptor, R_0 é a distância de Förster e r é a distância entre o doador e o receptor.

A distância de Förster R_0 é dada por [98]:

$$R_0 = 0,21 \left[\frac{\kappa^2 \varphi_D}{n_0^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_R(\lambda) \lambda^4 d\lambda \right]^6 \quad (19)$$

Nessa equação, o termo κ^2 é um fator que está associado a orientação espacial relativa dos dipolos elétricos do receptor e do doador, φ_D é o rendimento quântico do doador na ausência do receptor, n_0 é o índice de refração do meio, F_D é a intensidade de fluorescência do doador normalizada à unidade, ε_R é o coeficiente de absorção molar do receptor em ($M^{-1}cm^{-1}$) e λ é o comprimento de onda em (nm). Com essas unidades para o coeficiente de absorção molar e comprimento de onda, o raio de Förster é dado em angstrom. Na prática utiliza-se o valor médio de $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ para orientações completamente aleatórias entre os dipolos elétricos [98].

Outro parâmetro importante no estudo da transferência de energia é a eficiência de transferência que pode ser definida como:

$$E = \frac{k_T}{\frac{1}{\tau_D} + k_T} \quad (20)$$

Substituindo a equação (18) em (20), obtemos

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (21)$$

A equação (21) mostra que para a distância entre o doador e receptor igual a distância de Förster a eficiência de transferência de energia é igual a 50%.

A Figura 21 ilustra o processo de transferência de energia e seu respectivo diagrama de Jablonski entre uma proteína e uma molécula receptora, decorrente da excitação dos resíduos de triptofanos da proteína.

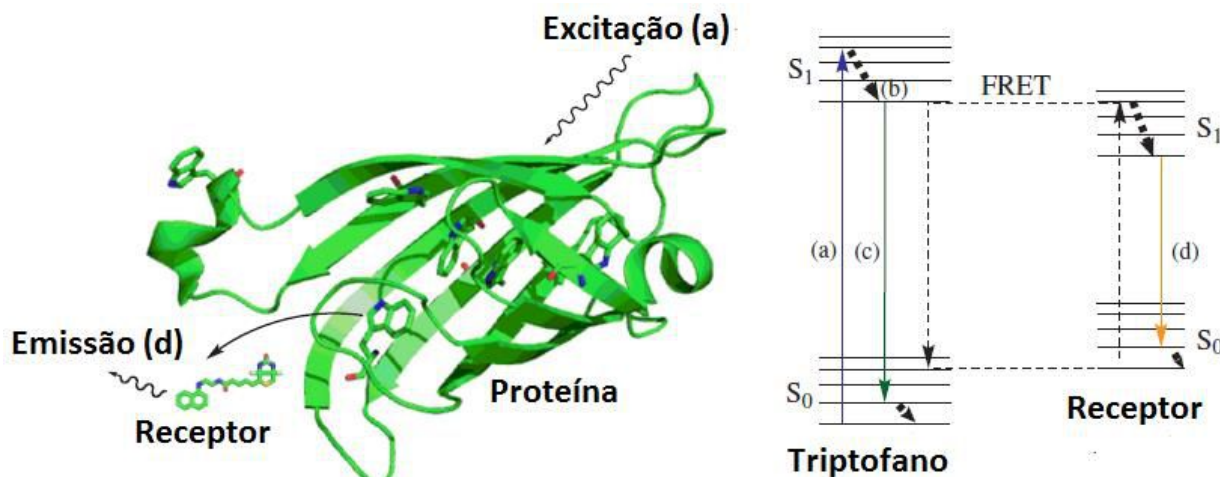


Figura 21: Representação esquemática da excitação dos resíduos de triptofano (a), as relaxações vibracionais (b), emissão fluorescente do triptofano (c) e a emissão do receptor (d). Adaptado de [99].

No diagrama de níveis de energia da Figura 21 estão representadas a absorção da luz pelo triptofano (a), as suas relaxações vibracionais (b) e emissão fluorescente (c). O diagrama evidencia também a necessária sobreposição entre os níveis de energia do doador e do receptor para que FRET ocorra e a emissão do receptor (d).

A sobreposição entre os espectros de emissão do doador (IgG) e os espectros de absorção em termos de coeficiente de absorção molar do receptor (porfirina) exigida para que a transferência de energia ocorra estão apresentadas na Figura 22.

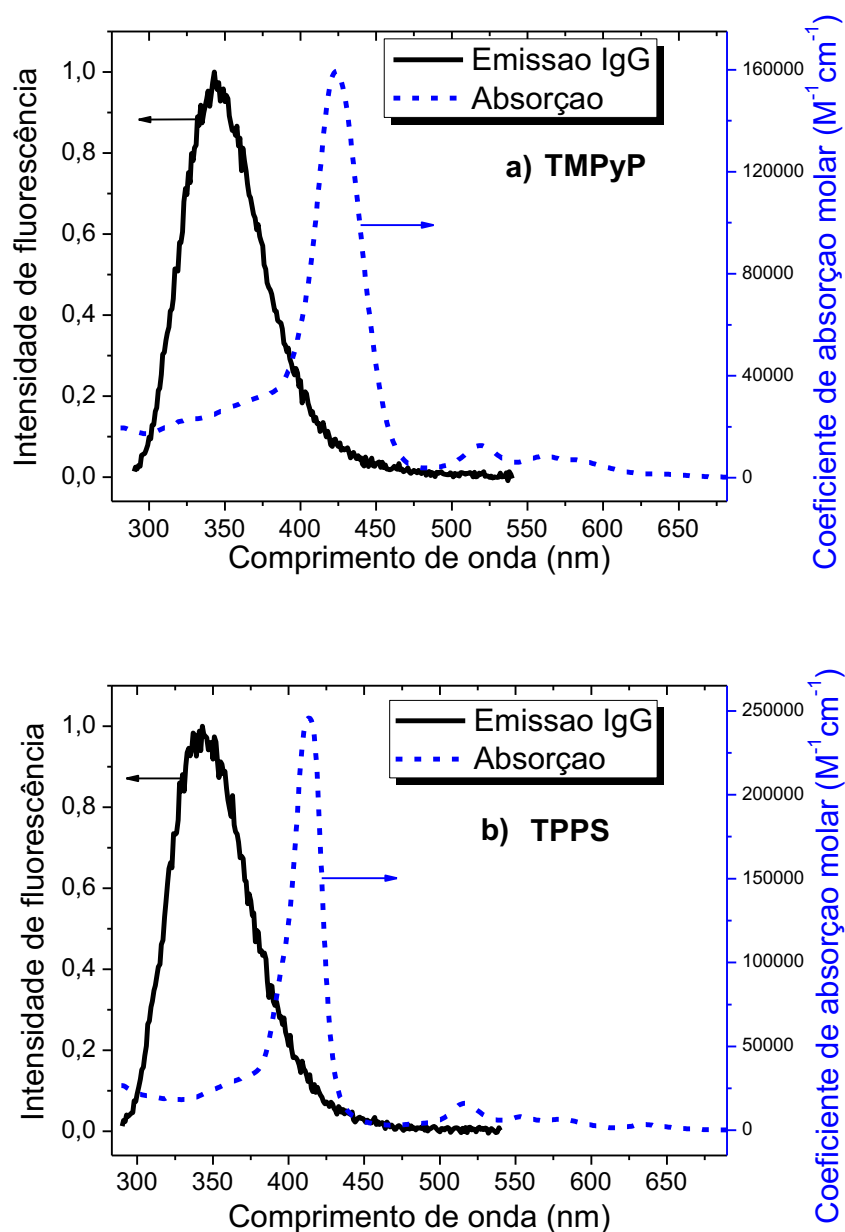


Figura 22: Sobreposições espectrais entre a emissão da IgG e o espectro de absorção molar das porfirinas **a) TMPyP** e **b) TPPS**.

Os valores da distância de Förster dada pela equação (19) e as integrais de sobreposição espectral estão apresentados na Tabela 3. Nessa tabela também está a distância entre o doador e o receptor para que toda a supressão de fluorescência observada nos espectros da Figura 17 seja devida a FRET. Essa distância foi calculada pela equação (21).

Tabela 4: Parâmetros de FRET para as porfirinas TMPyP e TPPS.

	Integral de sobreposição ($M^{-1} cm^{-1} nm^4$)	Distância de Förster (nm)	Distância entre o doador e o receptor (nm)
TMPyP	$4,3 \times 10^{16}$	6,0	5,0
TPPS	$5,0 \times 10^{16}$	6,2	4,6

A distância entre o receptor e o doador, Tabela 4, para que toda a supressão observada nos espectros de emissão da Figura 17 seja devida ao mecanismo de FRET são menores que a maior dimensão da IgG ($\approx 10nm$) [85].

Conforme indicaram as análises dos espectros de absorção e emissão, a supressão ocorre devido a formação de complexo entre a IgG e as porfirinas, dessa forma a supressão da fluorescência do anticorpo ocorre no máximo a uma distância igual a sua maior dimensão. Com isso o mecanismo de FRET pode ser o principal responsável pela supressão da fluorescência proveniente dos resíduos aromáticos da IgG.

Os resultados obtidos através do estudo de FRET em conjunto com todos os outros resultados sugerem que, apesar de ocorrer a formação de complexo entre as porfirinas e os anticorpos, o contato direto entre as porfirinas e os resíduos fluorescentes da IgG não é o principal responsável pela supressão da fluorescência observada. Acreditamos que a geometria enovelada dos anticorpos promovem uma blindagem dos resíduos aromáticos de tal forma que as porfirinas/supressoras permanecem a uma distância média equiparável a distância favorável para a ocorrência de FRET.

5 Conclusões

O presente trabalho marca o início uma linha de pesquisa no Instituto de Física da UFG, onde se visa avaliar a interação entre moléculas orgânicas fotoativas e anticorpos. Acreditamos que os resultados iniciais obtidos nessa dissertação tragam artifícios para compreender a incorporação de moléculas orgânicas em anticorpos reativos a BoHV, visando o fotodiagnóstico e a fotoinativação desse vírus em material biológico.

Os resultados obtidos da interação das porfirinas com os anticorpos deixam claro que a ligação entre eles ocorre de forma efetiva, sendo a supressão da fluorescência observada atribuída ao processo estático. Os valores das constantes de ligação obtidos são comparáveis aos valores de constantes de ligação relativos a sistemas proteína-ligante de alta afinidade [93]. As constantes de ligação também indicaram uma maior afinidade da porfirina aniônica TPPS pelo anticorpo, em relação à catiônica TMPP. Os coeficientes de Hill indicam cooperatividade positiva na interação da IgG com as duas porfirinas, isto é, a ligação de uma molécula de porfirina facilita a ligação de outras.

Tanto na supressão de fluorescência de IgG por TMPyP quanto na supressão de IgG por TPPS, não foram observados deslocamentos e nem mudanças no perfil das bandas de emissão de IgG indicando que o anticorpo não sofreu mudanças significativas na sua conformação. Alterações nos perfis de emissão de proteínas têm sido relatadas como decorrentes de mudanças em sua conformação ou formação de complexos [100].

A comparação dos espectros de emissão da IgG com espectros de emissão de proteínas reportados na literatura [61] indicam que o triptofano é o principal resíduo fluorescente da IgG. Além disso, a saturação da supressão da fluorescência da IgG mostrou que existem regiões do

anticorpo não acessíveis às porfirinas. Essa saturação mostra ainda que a TPPS parece penetrar com maior facilidade da estrutura do anticorpo.

Os perfis dos espectros de espalhamento de luz e a constância dos valores de anisotropia reforçaram os indícios de que as porfirinas não afetam a geometria do anticorpo. Variações nos espectros de espalhamento de luz e nos valores de anisotropia têm sido relatados como indícios de alterações na conformação de proteínas [101, 102].

Os resultados obtidos através do estudo de transferência de energia indicaram que FRET pode ser o principal mecanismo de supressão. Tem sido relatado que, de fato, as distância envolvidas nas interações proteína- supressores são favoráveis à ocorrência de FRET [99].

Com essas investigações, pretendemos auxiliar efetivamente no desenvolvimento de novas metodologias com fins de fotodiagnóstico e inativação fotodinâmica de micro-organismos. Os nossos resultados também poderão contribuir com a solidificação do modelo de “drug delivery”, pois os anticorpos funcionaram como estruturas carreadora das moléculas fotossensíveis em material biológico.

6 Perspectivas futuras

O presente trabalho terá sua sequência durante o período de doutoramento. Nesta futura etapa, esperamos:

1. estender o atual estudo visando obter outros parâmetros fotofísicos e termodinâmicos, tais como, rendimentos quânticos de formação de estados tripletos e oxigênio singlete, entalpia (ΔH) e energia livre de Gibbs (ΔG);
2. estudar a interação de outros fotossensibilizadores com BoHV;
3. desenvolver uma metodologia para fotodiagnóstico;
4. realizar fotoinativação do BoHV em material biológico;

Desta forma, esperamos que os resultados de nossas investigações sejam absorvidos pela indústria farmacêutica veterinária, gerando produtos e processos inovadores, propiciando o desenvolvimento do setor de saúde animal.

7 Referências

- [1] B. A. Cunha, "Strategies to control antibiotic resistance," *Semin Respir Infect*, vol. 17, nº 3, pp. 250-258, 2002.
- [2] P. L. Haddix, E. T. Paulsen e T. F. Werner, "Measurement of Mutation to Antibiotic Resistance: Ampicillin Resistance in *Serratia marcescens*," *Bioscene*, vol. 26, nº 1, p. 2000, 17-21.
- [3] J. R. Perussi, "Inativação Fotodinâmica de Micro-organismos," *Química Nova*, vol. 30, nº 4, pp. 988-994, 2007.
- [4] O. Raab, "Effect of fluorescent substances on Infusoria," *Zeitschrift fur Biologie*, vol. 39, nº 2, pp. 524 - 546, 1900.
- [5] H. v. Tappeiner e A. Jesionek, "Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen," *Munch Med Wochenschr*, vol. 47, p. 2042-2044, 1903.
- [6] Z. Smetana, E. Mendelson, J. Manor, J. E. v. Lier, E. Ben-Hur, S. Salzberg e Z. Malik, "Photodynamic inactivation of herpesviruses with phthalocyanine derivatives," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 22, nº 1, pp. 37-43, 1994.
- [7] K. E. Washburn, R. N. Streeter, J. T. Saliki, T. W. Lehenbauer e M. E. Prado, "Photodynamic inactivation of an RNA enveloped virus in goat colostrum," *Small Rumin Res.*, vol. 42, nº 1, pp. 31-37, 2001.
- [8] K. Zupán, M. Egyeki, K. Tóth, A. Fekete, L. Herényi, K. Módos e G. Csík, "Comparison of the efficiency and the specificity of DNA-bound and free cationic porphyrin in photodynamic virus inactivation," *J. Photochem Photobiol B.*, vol. 90, nº 2, pp. 105-112, 2008.
- [9] T. Dai, H. Ying-Ying e M. R. Hamblin, "Photodynamic therapy for localized infections-State of the art," *Photodiagn Photodyn Ther*, vol. 6, nº 3-4, pp. 170-188, 2009.
- [10] T. Maisch, C. Bosl, R. M. Szeimies, N. Lehn e C. Abels, "Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells," *Antimicrob Agents Chemother.*, vol. 49, nº 4, pp. 1542-1552, 2005.
- [11] S. Wood, D. Metcalf, D. Devine e C. Robinson, "Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms," *J. Antimicrob Chemother*, vol. 57, nº 4, pp. 680-684, 2006.
- [12] F. S. Poletto, A. R. Pohlmann e S. S. Guterres, "Uma pequena grande revolução," *Ciência Hoje*, vol. 43, nº 255, pp. 26-31, 2008.
- [13] M. Mitsunaga, M. Ogawa, N. Kosaka, L. T. Rosenblum, P. L. Choyke e H. Kobayashi, "Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules," *Nature Medicine*, vol. 17, nº 12, p. 1685, 2011.

- [14] M. B. Vrouenraets, G. W. Visser, F. A. Stewart, M. Stigter, H. Oppelaar, P. E. Postmus, G. B. Snow e G. A. v. Dongen, "Development of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-mono-clonal antibody conjugates for photoimmunotherapy," *Cancer Res.*, vol. 59, nº 7, pp. 1505-1513, 1999.
- [15] D. M. Nanus, M. I. Milowsky, L. Kostakoglu, P. M. Smith-Jones, S. Vallabahajosula, S. J. Goldsmith e N. H. Bander, "linical use of monoclonal antibody HuJ591 therapy: targeting prostate specific membrane antigen," *J. Urol.*, vol. 179, nº 6 Pt 2, pp. S84-S88, 2003.
- [16] D. Mew, C. K. Wat, G. H. Towers e J. G. Levy, "Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates," *J. Immunol.*, vol. 130, nº 3, pp. 1473-1477, 1983.
- [17] P. J. Gonçalves, *Estudo das Características Fotofísicas da porfirina meso-tetrasulfonatofenil (TPPS4): efeitos da protonação e interação com micelas de CTAB*, Ribeirão Preto: Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2006.
- [18] S. A. G. Lambrechts, M. C. G. Aalders e J. V. Marle, "Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, nº 5, pp. 2026-2034, 2005.
- [19] W. Korytowski, G. J. Bachowski e A. W. Girotti, "Photoperoxidation of cholesterol in homogeneous solution, isolated membranes, and cells: comparison of the 5 α - and 6 β -hydroperoxides as indicators of singlet oxygen intermediacy," *Photochem Photobiol.*, vol. 56, nº 1, pp. 1-8, 1992.
- [20] T. N. Demidova e M. R. Hamblin, "Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 49, nº 6, p. 2329, 2005.
- [21] V. Carré, O. Gaud, I. Sylvain, O. Bourdon, M. Spiro, J. Blais, R. Granet, P. Krausz e M. Guilloton, "Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 48, nº 1, p. 57, 1999.
- [22] K. M. Smith, *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Amesterdão: Elsevier, 1975.
- [23] A. M. V. M. Pereira, *Síntese de derivados oligoméricos de porfirinas e, Aveiro: Universidade de Aveiro, Síntese de derivados oligoméricos de porfirinas e ftalocianinas.*
- [24] I. J. Macdonald e T. J. Dougherty, "Basic principles of photodynamic therapy," *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, vol. 5, nº 2, p. 105–129, 2001.
- [25] E. D. Sternberg e D. Dolphin, "Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy," *Tetrahedron*, vol. 54, nº 17, p. 4151–4202, 1998.
- [26] S. K. Pushpan, S. Venkatraman, V. G. Anand, J. Sankar, D. Parmeswaran, S. Ganesan e T. K. Chandrashekar, "Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers.," *Curr Med Chem Anticancer Agents*, vol. 2, nº 2, pp. 187-207, 2002.

- [27] A. Marques, Y. Takahata, J. Junior, M. Souza, S. Simoes, W. Azevedo e G. de Sa, "The species of 8-methoxy-psoralen in hydrophobic and hydrophilic environments and its solubilization in neutral and charged micelles," *Journal of Luminescence*, vol. 97, nº 3, p. 237, 2002.
- [28] M. Carcenac, M. Dorvillius, V. Garambois, F. Glaussel, C. Larroque, R. Langlois, N. E. Hynes, J. .. v. Lier e A. Pèlerin, "Internalisation enhances photo-induced cytotoxicity of monoclonal antibody-phthalocyanine conjugates," *Br. J. Cancer*, vol. 85, nº 11, p. 1787–1793, 2001.
- [29] M. B. Vrouenraets, G. W. Visser, M. Stigter, H. Oppelaar, G. B. Snow e G. A. v. Dongen, "Targeting of aluminum (III) phthalocyanine tetrasulfonate by use of internalizing monoclonal antibodies: improved efficacy in photodynamic therapy," *Cancer Res.*, vol. 61, nº 5, pp. 1970-1975, 2001.
- [30] A. K. Abbas, A. H. Lichtman e S. Pillai, *Imunologia Celular e Molecular*, Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- [31] M. M. M. d. Azevedo, *Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos*, Campinas : Monografia apresentada oralmente em sessão pública ao Instituto de Química da UNICAMP, 2002.
- [32] A. M. Silverstein, *Paul Ehrlich's receptor immunology*, San Diego: Academic Press, 2002.
- [33] D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M. L. Viriot, F. Guilhermin e M. B. Heyob, "Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents," *Trends in Biotechnology*, vol. 26, nº 11, p. 612, 2008.
- [34] T. Y. Lee, C. T. Lin, S. Y. Kuo, D. K. Chang e H. C. Wu, "Peptide-mediated targeting to tumor blood vessels of lung cancer for drug delivery," *Cancer research*, vol. 67, nº 22, p. 10958., 2007.
- [35] F. L. Primo, M. M. A. Rodrigues, A. R. Simioni, M. V. L. B. Bentley, P. C. Morais e A. C. Tedesco, "In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 320, nº 14, p. e211–e214, 2008.
- [36] A. E. d. H. Machado, "Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas," *Química Nova*, vol. 23, nº 2, p. 239, 1999.
- [37] M. Bhatti, A. MacRobert, B. Henderson, P. Shepherd, J. Cridland e M. Wilson, "Antibody-Targeted Lethal Photosensitization of *Porphyromonas gingivalis*," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 44, nº 10, p. 2615, 2000.
- [38] A. J. Bullous, C. M. A. Alonso e R. W. Boyle, "Photosensitizer–antibody conjugates for photodynamic therapy," *Photochemical & Phot*, vol. 10, nº 5, p. 721, 2011.
- [39] J. Jankun, "Protein-based nanotechnology: Antibody conjugated with photosensitizer in targeted anticancer photoimmunotherapy," *International Journal of Oncology*, vol. 39, nº 4, pp. 949-953, 2011.
- [40] A. S. Soboleva, D. A. Jans e A. A. Rosenkranz, "Targeted intracellular delivery of photosensitizers," *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, vol. 73, nº 1, pp. 51-90, 2000.

- [41] L. T. Lovato, R. Weiblen, F. L. Tobias e M. P. Morales, "Herpes bovino tipo 1 (BHV-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil," *Ciência Rural*, vol. 25, nº 3, pp. 425-430, 1995.
- [42] E. Gibbs e M. Rweyemann, "Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1.," *Vet. Bull.*, vol. 47, nº 5, 1977.
- [43] M. Philpott, "The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer.," *Br. Vet. J.*, vol. 149, nº 4, pp. 339-369, 1993.
- [44] E. Takiuchi, A. F. Alfieri e A. A. Alfieri, "Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico," *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 22, nº 2, pp. 205-207, 2001.
- [45] V. S. Bagnato, *Novas Técnicas Ópticas para as Áreas de Saúde*, São Paulo: Livraria da Física, 2008.
- [46] V. Sacchini, E. Melloni, R. Marchesini, T. Fabrizio, N. Cascinelli, O. Santoro, F. Zunino, S. Andreola e G. Bandieramonte, "Topical administration of tetrasodium-meso-tetraphenylporphinesulfonate (TPPS) and red light irradiation for the treatment of superficial neoplastic lesions," *Tumori*, vol. 73, nº 1, pp. 19-23, 1987.
- [47] V. Sacchini, E. Melloni, R. Marchesini, A. Luini, G. Bandieramonte, P. Spinelli e N. Cascinelli, "Preliminary clinical studies with PDT by topical TPPS administration in neoplastic skin lesions," *Lasers Surg Med.*, vol. 7, nº 1, pp. 6-11, 1987.
- [48] K. Kalyanasundaram, *Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes*, New York: Academic Press, 1991.
- [49] F. Wilkinson, W. Helman e A. Ross, "Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet-State of Molecular Oxygen in Solution," *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 22, nº 1, pp. 113-262, 1993.
- [50] J. Mosinge, M. Janošková, K. Lang e P. Kubátc, "Light-induced aggregation of cationic porphyrins," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 181, nº 2-3, p. 283–289, 2006.
- [51] I. Zebger, J. W. Snyder, L. K. Andersen, L. Poulsen, Z. Gao, J. D. C. Lambert, U. Kristiansen e P. R. Ogilby, "Direct optical detection of singlet oxygen from a single cell," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 79, nº 4, pp. 319-322, 2004.
- [52] H. Ashkenazi, I. Pechatnikov e Y. Nitzan, "Low-intensity Photosensitization May Enhance RecA production," *Current Microbiology*, vol. 52, nº 4, pp. 317-323, 2006.
- [53] L. M. Almeida, F. F. Zanoelo, K. P. Castro, I. E. Borissevitch, C. M. Soares e P. J. Gonçalves, "Cell survival and altered gene expression following photodynamic inactivation of *Paracoccidioides brasiliensis*," *Photochem Photobiol*, vol. 88, nº 4, pp. 992-1000, 2012.
- [54] A. Mandal, "News Medical," [Online]. Available: <http://www.news-medical.net/health/Antibody-Function-%28Portuguese%29.aspx>. [Acesso em 19/04 2014 2014].

- [55] M. D. P. T. Sotomayor, I. L. T. Dias, M. R. V. Lanza, A. B. Moreira e L. T. Kubota, "Application and advances in the luminescence spectroscopy in pharmaceutical analyses," *Química Nova*, vol. 31, nº 7, pp. 1755-1774, 2008.
- [56] M. D. P. T. Sotomayor, I. L. T. Dias, M. R. V. Lanza, A. B. Moreira e L. T. Kubota, "Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas," *Quím. Nova*, vol. 31, nº 7, pp. 1755-1774, 2013.
- [57] A. D. Skoog, M. D. West e F. J. Holler, *Fundamentos de Química Analítica*, Barcelona: Reverte, 1997.
- [58] M. F. A. Marcus e B. S. Mara, "Espectrofotometria," Relatórios de aula Prática das disciplinas do Departamento de Biofísica, IBIO, Ufrgs., [Online]. Available: http://www.ufrgs.br/leo/site_espec/desvios.html. [Acesso em 8 abril 2015].
- [59] G. Lenz, "Métodos Fotométricos," 1997. [Online]. Available: <http://www.ufrgs.br/biofisica/Bio10003/Metfoto.pdf>. [Acesso em 24 2014 2014].
- [60] F. L. Primo, P. P. Macaroff, Z. G. M. Lacava, R. B. Azevedo, P. C. Morais e A. C. Tedesco, "Binding and photophysical studies of biocompatible magnetic fluid in biological medium and development of magnetic nanoemulsion: A new candidate for cancer treatment," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 310, nº 2, pp. 2838-2840, 2006.
- [61] J. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 1999.
- [62] A. Jabłoński, "On the notion of emission anisotropy," *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. A*, vol. 8, p. 259–264, 1960.
- [63] N. Jain e S. Mukhopadhyay, "Applications of Fluorescence Anisotropy in Understanding Protein Conformational Disorder and Aggregation," *Progress in Optical Science and Photonics*, vol. 2, pp. 41-57, 2015.
- [64] K. M. Kadish, G. B. Maiya, C. Araullo e R. Guillard, "Micellar effects on the aggregation of tetraanionic porphyrins. Spectroscopic characterization of free-base meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin, (TPPS)H₂, and (TPPS)M (M = zinc(II), copper(II), and vanadyl) in aqueous micellar media," *Inorg. Chem.*, vol. 28, nº 14, p. 2725–2731, 1989.
- [65] F. R. Pasternack e P. J. Collings, "Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation," *Science*, vol. 269, nº 5226, pp. 935-939, 1995.
- [66] R. .. Pasternack, S. Gurrieri e R. Lauceri, "Single-stranded nucleic acids as templates for porphyrin assembly formation," *Inorganica Chimica Acta*, vol. 246, nº 1-2, p. 7–12, 1996.
- [67] I. E. Borissevitch, T. T. Tominaga, H. Imasato e M. Tabak, "Resonance light scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin," *Analytica Chimica Acta*, vol. 343, nº 3, p. 281–286, 1997.
- [68] C. Zhanguang, L. Yulong, H. Xu, C. Xi e L. Jinbin, "Functionalized gold nanorods as an immunosensor probe for neuron specific enolase sensing via resonance light scattering," *Journal of Materials Chemistry B*, nº 48, p. 3031–3034, 2013.

- [69] Q. Gu e K. J.E., "Improvement of inner filter effect correction based on determination of effective geometric parameters using a conventional fluorimeter," *Anal Chem.*, vol. 81, nº 1, pp. 420-426, 2009.
- [70] T. F. S. Inc., "Extinction Coefficients: A guide to understanding extinction coefficients, with emphasis on spectrophotometric determination of protein concentration," Pierce Biotechnology, Rockford, 2008.
- [71] K. Lang, P. Kuba, P. Lhota, J. Mosinger e D. M. Wagnerova, "Photophysical Properties and Photoinduced Electron Transfer Within Host–Guest Complexes of 5,10,15,20-Tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphyrin with Water-soluble Calixarenes and Cyclodextrins," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 74, nº 4, p. 558–565, 2001.
- [72] L. P. F. Aggarwal, M. S. Baptista e B. I. E., "Effects of NaCl upon TPPS4 triplet state characteristics and singlet oxygen formation," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 186, nº 2-3, p. 187–193, 2007.
- [73] R. Wiglusz, J. Legendziewicz, A. Graczyk e S. Radzki, "Spectroscopic properties of porphyrins and effect of lanthanide ions on their luminescence efficiency," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 380, p. 396–404, 2004.
- [74] G. Braga, J. L. Aparicio, B. H. Vilsinski, A. L. Tessaro, A. P. Gerola, N. Hioka e W. Caetano, "Autoagregação da 5,10,15,20-tetrakis(4-metoxifenil)porfirina (tmpp): estudos espectroscópicos e análises multivariadas," *Química Nova*, vol. 37, nº 4, pp. 648-652, 2014.
- [75] P. J. Gonçalves, D. S. Corrêa, P. L. Franzen, L. De Boni, L. M. Almeida, C. R. Mendonça, I. E. Borissevitch e S. C. Zílio, "Effect of interaction with micelles on the excited-state optical properties of zinc porphyrins and J-aggregates formation," *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 112, pp. 309-317, 2013.
- [76] H. Yan, S. Zhao, J. Yang, X. Zhu, G. Dai, H. Liang, F. Pan e W. L., "Interaction Between Levamisole Hydrochloride and Bovine Serum Albumin and the Influence of Alcohol: Spectra," *Journal of Solution Chemistry*, vol. 38, nº 9, pp. 1183-1192, 2009.
- [77] Y. Engelborghs, "The analysis of time resolved protein fluorescence in multi-tryptophan proteins," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 57, nº 11, p. 2255–2270, 2001.
- [78] N. Melinda, J. C. Lima, P. Lamosa, H. Santos, C. Maycock, R. Ventura e A. L. Maçanita, "Intramolecular Fluorescence Quenching of Tyrosine by the Peptide α -Carbonyl Group Revisited," *J. Phys. Chem. A*, vol. 108, nº 12, p. 2155–2166, 2004.
- [79] H. S. Clarence e M. R. E., "Fluorescence Techniques for Studying Protein Structure," *Methods of Biochemical Analysis: Protein Structure Determination*, vol. 35, pp. 127-205, 1991.
- [80] R. Allan e H. Isliker, "Studies on the complement-binding site of rabbit immunoglobulin G. I. Modification of tryptophan residues and their role in anticomplementary activity of rabbit IgG," *Immunochemistry*, vol. 11, nº 4, pp. 175-180, 1973.

- [81] D. Hanson, J. Yguerabide e V. Schumaker, "Rotational dynamics of immunoglobulin G antibodies anchored in protein A soluble complexes," *Molecular immunology*, vol. 22, nº 3, pp. 237-244, 1985.
- [82] s. aldrich, "Product Specification TmPyP," aldrich, sigma, Saint Louis, 2015.
- [83] C. P. Pasternack RF, "Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation," *Science*, vol. 269, nº 5226, pp. 935-939, 1995.
- [84] J. Połtowicz, E. M. Serwicka, E. B. Gonzalez, W. Jones e R. Mokaya, "Oxidation of cyclohexene over Mn(TmPyP) porphyrin-exchanged Al,Si-mesoporous molecular sieves," *Applied Catalysis A: General*, vol. 218, p. 211–217, 2001.
- [85] R. E. Marc, R. F. Murry e S. F. Basinger, "Pattern Recognition of Amino Acid Signatures in Retinal Neurons," *The Journal of Neuroscience*, vol. 15, nº 17, pp. 5106-5129, 1995.
- [86] Q. Wang, S. R. Zhang e X. Ji, "Investigation of interaction of antibacterial drug sulfamethoxazole with human serum albumin by molecular modeling and multi-spectroscopic method," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 124, p. 84–90, 2014.
- [87] R. Mi, P. Li, Y. Hu, X. Fan, H. Li, X. Yu e Y. Ouyang, "Biophysical studies on the interactions of jatrorrhizine with bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 40, nº 7, pp. 4397-4404, 2013.
- [88] H. Li, H. Dou, Y. Zhang, Z. Li, R. Wang e J. Chang, "Studies of the interaction between FNC and human hemoglobin: A spectroscopic analysis and molecular docking," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 136 Pt B, p. 416–422, 2015.
- [89] S. M. Andrade e M. B. C. Sílvia, "Spectroscopic Studies on the Interaction of a Water Soluble Porphyrin and Two Drug Carrier Proteins," *Biophysical Journal*, vol. 82, p. 1607–1619, 2002.
- [90] D. L. Nelson e M. M. Cox, *Lehninger Princípios de Bioquímica*, São Paulo: Sarvier, 2002.
- [91] I. E. Borissevitch, "More about the inner filter effect: corrections of Stern–Volmer fluorescence quenching constants are necessary at very low optical absorption of the quencher," *Journal of luminescence*, vol. 81, pp. 219-224, 1999.
- [92] A. Schreiber, A. Strosberg e P. I., "Fluorescence of tryptophan residues in homogeneous rabbit antibodies: variability in quantum yields and degree of exposure to solvent.," *Immunochemistry*, vol. 15, nº 4, pp. 207-212, 1978.
- [93] K. Saha, F. Bender e E. Gizeli, "Comparative Study of IgG Binding to Proteins G and A: Nonequilibrium Kinetic and Binding Constant Determination with the Acoustic Waveguide Device," *Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 835-842, 2003.
- [94] J. N. WEISS, "The Hill equation revisited: uses and misuses," *The FASEB Journal*, vol. 11, pp. 835-841, 1997.
- [95] A. K. Kenworthy, "Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy," *Methods*, vol. 24, nº 3, pp. 289-296, 2001.

- [96] R. J. Ward e G. Milligan, "Structural and biophysical characterisation of G protein-coupled receptor ligand binding using resonance energy transfer and fluorescent labelling techniques," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1838, nº 1, p. 3–14, 2014.
- [97] B. Prevo e E. J. G. Peterman, "Förster resonance energy transfer and kinesin motor proteins," *Chemical Society Reviews*, vol. 43, nº 4, pp. 1144-1155, 2014.
- [98] I. Medintz e N. Hildebrandt, FRET – Förster Resonance Energy Transfer: From Theory to Applications, Weinheim: Wiley, 2014.
- [99] A. B. T. Ghisaidoobe e S. J. Chung, "Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, nº 12, pp. 22518-22538, 2014.
- [100] R. Mi, Q. P. Li, Y. J. Hu, Y. X. Fan, Y. H. Li, C. X. Yu e Y. Ouyang, "Biophysical studies on the interactions of jatrorrhizine with bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods," *Mol Biol Rep*, vol. 40, nº 7, pp. 4397-4404, 2013.
- [101] L. Yang, Y. Jinghe, Y. Shufang, W. Xia, S. Benyu e W. Tao, "Resonance light scattering technique for the determination of protein with rutin and cetylpyridine bromide system," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 61, nº 4, p. 641–646, 2005.
- [102] C. D. Hanson, J. Yguerabide e N. V. Schumaker, "Rotational dynamics of immunoglobulin G antibodies anchored in protein A soluble complexes," *Mol Immunol.*, vol. 22, nº 3, pp. 237-244, 1985.