

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Faculdade de Ciências e Letras

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT)

L1 – Ciências dos Materiais

Maria Julia Bistaffa

Fotossensibilização de células derivadas dos carcinomas de orofaringe e mamário pela Eritrosina B: de efeitos moleculares em sistema modelos aos mecanismos de morte celular em ensaios *in vitro*

Assis/ SP

2022

Maria Julia Bistaffa

Fotossensibilização de células derivadas dos carcinomas de orofaringe e mamário pela Eritrosina B: de efeitos moleculares em sistema modelos aos mecanismos de morte celular em ensaios *in vitro*

Dissertação apresentada como requisito para a Defesa do Mestrado na área de Ciências dos Materiais, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia dos Materiais (POSMAT)

Orientador: Prof^o Dr. Pedro Henrique Benites Aoki

Coorientadora: Prof^a Dr. Karina Alves Toledo

B623f

Bistaffa, Maria Julia

Fotossensibilização de células derivadas dos carcinomas de orofaringe e mamário pela Eritrosina B: de efeitos moleculares em sistema modelos aos mecanismos de morte celular em ensaios in vitro / Maria Julia Bistaffa. --

Bauru, 2022

88 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Pedro Henrique Benites Aoki

Coorientadora: Karina Alves de Toledo

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Eritrosina B. 3. Filmes de Langmuir. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências, Bauru.

Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIA JULIA BISTAFFA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 07 dias do mês de fevereiro do ano de 2022, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MARIA JULIA BISTAFFA, intitulada **Fotossensibilização de células derivadas dos carcinomas de orofaringe e mamário pela eritrosina B: de efeitos moleculares em sistema modelos aos mecanismos de morte celular em ensaios in vitro**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras UNESP, Prof. Dr. LUCIANO CASELI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Diadema, Professora Doutora DAYANE BATISTA TADA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciência e Tecnologia / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial/ou virtual, a discente recebeu o conceito final Aprovada Nada mais havendo, foi

lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI

Agradecimentos

Quero agradecer primeiro à Deus e ao Universo por me proporcionarem fé e esperança por dias melhores. Agradeço aos meus pais, Cesar e Eliana e ao meu irmão, Bruno por todo o apoio, toda a crença, e todo o amor que eles me dão. Sem vocês eu não estaria aqui hoje. Obrigada por serem minha base.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Pedro, por todo o suporte e orientação. Obrigada por ser além de professor e orientador, amigo. Obrigada por todas as oportunidades, ensinamentos, conselhos, conversas e até mesmo os abraços virtuais em tempo de pandemia. Gostaria de estender esse agradecimento à minha coorientadora, Karina, que também tem papel essencial na minha caminhada profissional.

Aos meus colegas de laboratório. Obrigada pelo companheirismo, amizade e diversão. Vocês trouxeram vida aos dias de trabalho.

A todos que cruzaram meu caminho nesse período. Sou grata a cada ensinamento, risada, conversa e até mesmo as lágrimas. Obrigada por terem compartilhado momentos comigo!

Gostaria de agradecer à Mel, que apesar de ser uma cadela, me ajuda a ser um ser humano cada dia melhor, mais empática e a sempre pensar positivo.

Agradeço ao doutor Carlos Fernando O. R. Melo e ao professor Rodrigo R. Catharino pela contribuição no trabalho com os resultados de espectroscopia de massas. Ao professor Gilberto Braga por disponibilizar o sistema de LEDs utilizado, o qual foi crucial para a otimização dos experimentos.

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro durante todo o período de Mestrado, possibilitando o desenvolvimento desse trabalho.

“Essa opressão no peito significa viver.”

Mario Benedetti

Resumo

A fim de desenvolver terapias mais eficientes e menos invasivas no tratamento de tumores, a terapia fotodinâmica (TFD) tem ganhado destaque. Além da elucidação dos mecanismos de ação, os mecanismos subjacentes à oxidação lipídica em sistemas complexos, como as membranas plasmáticas, são importantes para eficiência da TFD. Contudo, ambos os mecanismos permanecem elusivos. Nesta dissertação de mestrado, investigamos através de filmes de Langmuir as interações moleculares que permitem a adsorção do FS eritrosina em monocamadas lipídicas e os resultados da foto-oxidação subsequentes. Além disso, a eficiência fotodinâmica e os mecanismos de morte celular induzido pelo FS fotoativado em células derivadas do carcinoma de orofaringe (HEp-2) e mamário (MCF7) foram avaliados com citometria de fluxo e marcação de fluorescência. Os filmes de Langmuir foram inicialmente construídos com os fosfolipídeos 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DOPS) e a mistura DOPC/DOPS, mimetizando membranas plasmáticas tumorais. Em um segundo momento, as monocamadas foram construídas com o extrato lipídico extraído das células MCF7. Os efeitos fotodinâmicos nas células MCF7 foram mais pronunciados do que nas células HEp-2. Em ambos os casos, a incubação da eritrosina não irradiada, não gera efeitos citotóxicos significativos, desencadeando apoptose no cultivo *in vitro* a partir de 24 h incubação. Por outro lado, a viabilidade celular é significativamente reduzida sob irradiação, desencadeando o mecanismo de morte celular por necrose. Modelos inspirados na membrana tumoral baseados em monocamadas de Langmuir mistas de DOPC e DOPS revelaram que interações eletrostáticas com a cabeça dos lipídeos são as principais forças de adsorção da eritrosina. Nas monocamadas construídas com extrato lipídico da MCF7, a adsorção da eritrosina é dirigida por interações secundárias que afetam a orientação dos grupos carbonil e a organização das cadeias lipídicas. A irradiação do FS nas monocamadas induz a hidroxidação lipídica, que pode ainda sofrer decomposição, resultando na clivagem da cadeia de fosfolipídeos e permeabilização da membrana. De fato, a clivagem lipídica, e os subprodutos gerados, foram detectados por espectroscopia de massa, sustentando o caminho necrótico de morte celular observadas nos ensaios *in vitro*.

Palavras-Chave: Terapia fotodinâmica, eritrosina B, filmes de Langmuir; cultivo *in vitro*.

Abstract

In order to develop more efficient and less invasive therapies in the treatment of tumors, photodynamic therapy (PDT) has gained prominence. In addition to elucidate the mechanism of action, the subjacent mechanism of lipid oxidation in complex systems, such as plasma membranes, are important for PDT efficiency. However, both mechanisms remain elusive. In this work, the molecular interactions allowing the adsorption of the PS erythrosine and the subsequent photooxidation reactions were investigated using Langmuir films. Besides, the photodynamic efficiency and cell death mechanism induced by the photoactivated PS in cells derived from oropharyngeal (HEp-2) and mammary (MCF7) carcinomas were evaluated by flow cytometry and fluorescence labeling. Langmuir films were first built with 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS) phospholipids and the DOPC/DOPS mixture, simulating the literature regarding tumor plasma membranes. In a second step, the monolayers were built with the lipid extract from the MCF7 cells. Photodynamic effects in MCF7 cells were more pronounced than in HEp-2 cells. In both cases, the incubation of non-irradiated erythrosine does not generate significant cytotoxic effects, triggering apoptosis on *in vitro* culture after 24 h of incubation. On the other hand, cell viability is significantly reduced under irradiation, triggering the mechanism of cell death by necrosis. Tumor membrane models based on mixed Langmuir monolayers of DOPC and DOPS revealed that electrostatic interactions with the lipid head is the main driving forces allowing erythrosine adsorption. In monolayers built with MCF7 lipid extract, erythrosine adsorption is driven by secondary interactions that affect the orientation of carbonyl groups and the organization of lipid chains. Irradiation of FS on monolayers induces lipid hydroperoxidation, which can further undergo decomposition, resulting in phospholipid chain cleavage and membrane permeabilization. Indeed, lipid cleavage, and the by-products generated, were detected by mass spectroscopy, supporting the necrotic pathway of cell death observed in *in vitro* assays.

Keywords: Photodynamic therapy; erythrosine B; Langmuir films; *in vitro* culture

Lista de Figuras

Figura 1: esquema ilustrativo para geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) baseado no diagrama de Jablonski simplificado. Fonte: Adaptado de [44].

Figura 2: (a) estrutura molecular e (b) potencial eletrostático da eritrosina. A região em vermelho se refere a característica eletrofílica, enquanto a região azul representa a natureza nucleofílica da molécula. As regiões neutras da eritrosina estão em verde. Fonte: Adaptado de [50].

Figura 3: (a) modelo do mosaico fluido para estrutura de membrana plasmática. (b) Modelo de jangadas da membrana plasmática. Fonte: [73].

Figura 4: (a) estrutura base dos fosfolipídeos. (b) Influência das insaturações nas cadeias de hidrocarbonetos que compõem a membrana plasmática. Fonte: [71, 72].

Figura 5: (a) cuba de Langmuir. (b) Representação da compressão das moléculas pelas barreiras móveis e (c) ilustração gráfica de uma isoterma π -A, detalhando as três fases de compressão da monocamada de Langmuir até o colapso. A inserção exibe uma molécula anfifílica e suas regiões apolar (hidrofóbica) e polar (hidrofílica). (d) Esquema da deposição dos filmes de Langmuir-Schaefer (LS). Fonte: Adaptado de [90, 94].

Figura 6: (a) modos vibracionais simétricos e assimétricos de moléculas poliatômicas. (b) Princípio de funcionamento de um espectrômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR – Fourier-transform infrared spectroscopy). Fonte: adaptado de [98,99].

Figura 7: (a) princípio do funcionamento do microscópio de fluorescência. (b) Dispositivo com orifício utilizado na microscopia confocal. A qualidade da imagem no plano focal (vermelho) é aumentada pela eliminação da luz proveniente das regiões fora do plano focal (verde). Fonte: [44].

Figura 8: (a) princípio do funcionamento de um citômetro de fluxo. (b) Espalhamento de luz frontal (FSC) e lateral (SSC) de partículas. (c) Marcação da fluorescência das mesmas partículas quem em (b) com os fluoróforos A e B. Fonte: [103].

Figura 9: estrutura molecular dos fosfolipídeos (a) DOPC e (b) DOPS. (c) Cuba de Langmuir sob irradiação da monocamada. (d) Esquema de filmes Langmuir-Schaefer (LS) depositados a partir do extrato lipídico da MCF7. O extrato lipídico em clorofórmio foi espalhado na subfase de eritrosina em solução PBS, as barreiras foram comprimidas até 30 mN/m e um substrato sólido tocou a superfície do filme múltiplas vezes, transferindo as monocamadas.

Figura 10: redução mitocondrial do sal de MTT em cristal de formazana.

Figura 11: isotermas π -A e módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) para (a e d) DOPC, (b e e) DOPS e (c e f) mistura de DOPC/DOPS (8/2) em subfase de água ultrapura (linha preta) e eritrosina (10^{-5} mol/ L; linha colorida). O módulo de elasticidade foi determinado a partir das isotermas π -A utilizando a equação: $C_s^{-1} = -A (d\pi/dA)$.

Figura 12: evolução da área superficial relativa de monocamadas de Langmuir irradiadas (530 nm) e não irradiadas de (a) DOPS e (b) DOPC/DOPS em pressão constante de 30 mN/ m e subfase de eritrosina (10^{-5} mol/ L). A_0 é a área extrapolada em 30 mN/ m. A inserção mostra o esquema da hidroperoxidação lipídica levando ao aumento da área molecular média. (c) Espectro de absorção UV-Vis para solução de eritrosina (10^{-5} mol/ L) irradiada com LED verde por 240 min e (d) absorbância em 525 nm pelo tempo para a solução de eritrosina irradiada em (c).

Figura 13: (a) intensidade da fluorescência em 590 nm registrada por citometria de fluxo considerando 1,25, 10 e 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina, incubados por 220 min. (b) Absorbância em 560 nm registrado pelas diferentes concentrações (10^{-6} a 10^{-4} mol/ L) de eritrosina após 3, 24 e 48 h de incubação em células HEp-2. Microscopias de fluorescência confocal realizadas para (c) o controle celular de HEp-2 e para (d) 1,25 (e) 10 e (f) 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina. A membrana celular (verde) foi marcada com WGA Alexa Fluor[®] 488 enquanto o núcleo (azul) com DAPI. A fluorescência da eritrosina foi registrada em 620 nm (vermelho).

Figura 14: efeitos tóxicos (não irradiado) e fototóxicos (irradiado) da eritrosina em células HEp-2. A viabilidade celular foi mensurada através da adição do sal MTT após (a) 3, (b) 24 e (c) 48 h de incubação. CC corresponde ao controle celular, CM ao controle de morte e CL ao controle de luz.

Figura 15: espalhamento de luz frontal (FSC) e lateral (SSC) registrado para (a) (i) controle celular e 24 h de incubação não irradiado de (ii) 1,25, (iii) 10 e (iv) 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina e irradiado para (v) controle de luz, (vi) 1,25, (vii) 10 e (viii) 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina. (b) (ix) Controle celular e 48 h de incubação não irradiado com (x) 1,25, (xi) 10 e (xii) 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina e irradiado para (xiii) controle de luz, (xiv) 1,25, (xv) 10 e (xvi) 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina.

Figura 16: porcentagem de células HEp-2 em apoptose e necrose com base no ensaio de citometria de fluxo com marcação de Anexina V e iodeto de propídio (PI) registrados para (a) 1,25 e (b) 10×10^{-6} mol/ L de eritrosina incubado por 24 e 48 h, antes e após a irradiação. A população celular foi distribuída da seguinte forma: células não marcadas indicando células viáveis, marcação para Anexina V (Alexa Fluor[®] 488) e PI indicam apoptose tardia e células marcadas com PI indicam necrose. * e ns para $p < 0,05$ e estatisticamente não relevantes, respectivamente.

Figura 17: análise MALDI-TOF do extrato lipídico da MCF7.

Figura 18: (a) isotermas de pressão superficial (π) vs área (A; cm^2/ mL) e (b) modo de compressibilidade (C_s^{-1} ; $C_s^{-1} = -A (d\pi/dA)$) do extrato lipídico das células MCF7 em tampão PBS e em solução de eritrosina (10^{-5} mol/ L).

Figura 19: espectro de absorção no UV-Vis para 40 camadas LS do extrato lipídico da MCF7 em (a) tampão PBS e em (b) solução de eritrosina (10^{-5} mol/ L) depositados em substrato de quartzo. A inserção mostra a absorbância num comprimento de onda fixo a cada 5 camadas de filme depositado. (c) Espectro de absorção UV-Vis da solução de eritrosina (10^{-5} mol/ L) e de 40 camadas LS do extrato lipídico da MCF7 com eritrosina (10^{-5} mol/ L). O espectro do filme LS foi corrigido na linha de base para se ajustar ao gráfico.

Figura 20: espectros FTIR dos filmes Langmuir-Schaefer (LS) do extrato lipídico da MCF7 (azul) e do extrato celular em subfase de eritrosina (10^{-5} mol/ L; vermelho). Os filmes são compostos por 40 camadas e foram depositados em substrato de germânio. O filme *cast* do extrato lipídico da MCF7 (preto) é fornecido como referência. Os espectros FTIR estão divididos na região da (a) cabeça e das (b) caudas dos lipídeos. (c) Proposta de interação entre os lipídeos do extrato com a eritrosina considerando as mudanças nos resultados do FTIR. O esquema ilustra a interação da eritrosina principalmente com o grupo carbonil e CH_2 dos fosfolipídeos. Os fosfolipídeos podem ter diferentes tamanhos (R_2) e grupos polares (R_1).

Figura 21: evolução da área relativa (A/A_0) para as monocamadas do extrato lipídico da MCF7 em (a) tampão PBS e em (b) solução de eritrosina (10^{-5} mol/ L) para os filmes não-irradiado (preto) e irradiado (vermelho). A_0 é a área extrapolada nas isotermas do extrato lipídico da MCF7 em 30 mN/m. O valor de p foi calculado a partir do teste anova *one way Tukey* para checar a diferença significava entre as monocamadas irradiadas e não-irradiadas. (c) Esquema das possíveis reações que resultam em aldeídos de fosfolipídeos e permeabilização de membrana: I) clivagem de hidroperóxido e (II) cisão de radical alcóxil (Adaptado de [155]).

Figura 22: efeitos tóxicos (linha preta) e fototóxicos (linha verde) da eritrosina na cultura *in vitro* de células MCF7 acessado pelo ensaio de MTT. A viabilidade celular foi mensurada para células incubadas por (a) 3, (b) 24 e (c) 48 h com diferentes concentrações de eritrosina (de 10^3 a 10^{-6} mol/ L). CC corresponde ao controle celular, CM ao controle de morte e CL ao controle de luz. Imagens de microscopias de fluorescência confocais registradas para (d) controle celular e 24 h de incubação com (e) 1,25, (f) 10 e (g) 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina. A membrana plasmática (verde) das células MCF7 foram marcadas com WGA Alexa Fluor® e o núcleo (azul) com DAPI, enquanto a fluorescência da eritrosina (vermelho) foi registrada em 620 nm.

Figura 23: (a) espalhamento de luz frontal (FSC) e lateral (SSC) analisados para o controle de celular e de luz das células MCF7. Células não-irradiadas e irradiadas incubadas com 1,25, 10 e 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina por 3, 24 e 48 h.

Figura 24: citometria de fluxo com marcadores para membrana plasmática (Anexina V) e núcleo (iodeto de propídio; PI) para células MCF7 com (a e c) 1,25 e (b e d) 10×10^{-6} mol/ L de eritrosina incubados por 3, 24 e 48 h não-irradiados e irradiados, respectivamente. * e *ns* para $p < 0,05$ e estatisticamente não relevantes, respectivamente.

Figura 25: espectro HRMS no modo íon positivo realizado para células MCF7 (a) controle de luz e (b) irradiadas com $1,25 \times 10^{-6}$ mol/ L de eritrosina incubadas por 24 h.

Figura 26: (a) análise de componentes principais (PCAs) realizado nos dados de espectrometria de massa gerado para células MCF7 irradiadas e incubadas com 1,25, 10 e 100 $\times 10^{-6}$ mol/ L de eritrosina por 24 h. (b) Resultado de agrupamento para os 44 principais recursos no gráfico do PCA, mostrado como um mapa de calor (distância medida pelo algoritmo Euclidiano e de agrupamento Ward), indicando as concentrações relativas de cada intensidade de sinal em cada grupo respectivo. As setas vermelhas indicam os lipídeos oxidados identificados na Tabela 2 e as setas verdes especificam os lipídeos não oxidados correspondentes.

Figura B1: espectro MS/MS de 748 m/z para espécies de lipídeos oxidados presentes nas células MCF7 após irradiação com eritrosina.

Figura B2: espectro MS/MS de 610 m/z para espécies de lipídeos oxidados presentes nas células MCF7 após irradiação com eritrosina.

Figura B3: espectro MS/MS de 818 m/z para espécies de lipídeos oxidados presentes nas células MCF7 após irradiação com eritrosina.

Figura B4: espectro MS/MS de 704 m/z para espécies de lipídeos oxidados presentes nas células MCF7 após irradiação com eritrosina.

Figura B5: espectro MS/MS de 792 m/z para espécies de lipídeos oxidados presentes nas células MCF7 após irradiação com eritrosina.

Lista de Tabelas

Tabela 1: atribuições dos principais modos vibracionais dos filmes *cast* do extrato lipídico da MCF7 e da eritrosina, e dos filmes LS do extrato em tampão PBS e em solução de eritrosina (10^{-5} mol/L).

Tabela 2: lipídeos oxidados presentes nas células expostas a eritrosina e irradiadas.

Tabela A1: lipídeos presentes no extrato de membrana usado para montar filmes de Langmuir-Schaefer (LS). **LipidMaps*

Lista de Abreviaturas

$^1\text{O}_2$	oxigênio singleto
A	área molecular média
AM	azul de metileno
ATR	reflexão total atenuada
CC	controle celular
CC₅₀	concentração que reduz a viabilidade celular em 50%
CL	controle de luz
CM	controle de morte
Cs⁻¹	módulo compressional
DOPC	1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DOPS	1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina
Eritrosina	eritrosina B
EROs	espécies reativas de oxigênio
FS	fotossensibilizador
FSC	espalhamento de luz frontal
FTIR	espectrometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier
FWHM	largura de banda a meia altura
GUVs	vesículas unilamelares gigantes
HEp-2	células derivadas do carcinoma humano de orofaringe
HRMS	espectrometria de massa de alta resolução
LS	Langmuir-Schaefer
MALDI-TOF	ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo
MCF7	células derivadas do carcinoma mamário humano

MS/MS	espectroscopia de massa em tandem
MTT	brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
O₂	oxigênio molecular
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PC	fosfatidilcolinas
PCAs	análise de componentes principais
PI	iodeto de propídio
PS	fosfatidilserinas
S₀	estado fundamental de energia
S₁	estado excitado de energia
SFB	soro fetal bovino
SSC	espalhamento de luz lateral
T₁	estado tripleto de energia
TFD	terapia fotodinâmica
TFT	terapia fototérmica
VM	violeta de metila
π	pressão de superfície
Φ_{Δ}	rendimento quântico

Sumário

1. Apresentação	18
2. Introdução.....	18
2.1. Terapia Fotodinâmica (TFD)	19
2.2. Eritrosina B	20
2.3. Modelos de membrana.....	22
3. Conceitos teóricos	25
3.1. Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer	25
3.2. Espectrometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	26
3.3. Microscopia de fluorescência confocal.....	28
3.4. Citometria de fluxo	29
4. Objetivos	31
5. Materiais e métodos	32
5.1. Cultivo <i>in vitro</i> de células HEp-2 e MCF7	32
5.2. Extração e análise do extrato lipídico das células MCF7	32
5.3. Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS).....	33
5.4. Fotoativação da Eritrosina B.....	34
5.5. Ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT	35
5.6. Microscopia de fluorescência confocal.....	36
5.7. Citometria de fluxo	36
5.8. Espectrometria de Massa de Alta Resolução (HRMS) das células MCF7	37
5.8.1. Preparação da amostra	37
5.8.2. Análise HRMS e elucidação estrutural.....	37
5.9. Análises estatísticas	38
6. Resultados e discussão	39
6.1. Necrose fotoinduzida em células de carcinoma orofaríngeo (HEp-2) mediada pelo xantênico Eritrosina B	39
6.1.1. Efeitos da foto-oxidação em sistemas modelos de biomembranas tumorais.....	39
6.1.2. Efeitos da foto-oxidação em células HEp-2	43
6.2. Permeabilização da membrana plasmática para explicar a fototoxicidade da Eritrosina B em modelos <i>in vitro</i> de células de câncer de mama	50
6.2.1. Monocamadas de Langmuir como modelo de membrana celular da MCF7.....	50
6.2.1.1. Adsorção da Eritrosina B nas monocamadas de extrato lipídico da MCF7 ...	50
6.2.1.2. Fotoativação da Eritrosina B.....	56
6.2.2. Efeitos tóxico e fototóxico da Eritrosina B em cultivo <i>in vitro</i> da MCF7	58

7. Conclusão	67
Anexo A.....	69
Anexo B.....	73
Referências	76

1. Apresentação

Esta dissertação está estruturada em 7 seções. Nesta primeira seção, fazemos uma apresentação sobre a estruturação do trabalho. A seção 2 possui uma breve introdução relatando os principais mecanismos da terapia fotodinâmica, a motivação em estudar a eritrosina como fotossensibilizador e sobre os principais modelos de membrana. Na seção 3, há definições teóricas sobre as técnicas experimentais utilizadas no trabalho, sendo os objetivos descritos na seção 4. Na seção 5 estão os materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados discutidos na seção 6. Os resultados estão divididos em duas grandes seções, a seção 6.1. traz os resultados obtidos com as células derivadas do carcinoma de orofaringe (HEp-2) enquanto a seção 6.2. aborda os resultados obtidos com a segunda linhagem proposta, as células derivadas do carcinoma mamário (MCF7). A seção 7 traz a conclusão do trabalho.

2. Introdução

O aumento da taxa de mortalidade das doenças crônicas-degenerativas tem sido frequentemente associado a industrialização global do último século, sendo responsável pelas mudanças no padrão saúde-doença [1,2]. O câncer é uma doença de causas múltiplas, com destaque aos fatores ambientais, socioeconômicos, estilo de vida, fatores biológicos e genéticos. Sua incidência na população tem crescido vertiginosamente, representando a segunda maior causa de mortes em todo o mundo [3]. Ademais, espera-se que seja a principal barreira no aumento da expectativa de vida no século 21 [4]. Entre os diversos tipos de neoplasias, o carcinoma orofaríngeo apresenta elevada incidência mundial, tendo 98.412,00 novos casos e 48.143,00 mortes durante o ano de 2020. Simultaneamente, uma em cada quatro mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama no mesmo ano [5].

Dentre os tratamentos comumente aplicados estão a remoção cirúrgica de tumores, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e hormonoterapia. As altas taxas de ressurgimento (rebrote) associadas ao comprometimento orgânico causado por essas intervenções [6] têm liderado uma busca crescente por novas terapias, mais eficientes, e em especial, menos invasivas [7]. Neste quesito, o desenvolvimento de terapias baseadas em luz (fototerapias) tem sido alvo de estudos, especialmente aquelas fundamentadas nos efeitos da interação da luz com os tecidos biológicos [8–11]. A luz pode ser facilmente focada e ajustada para realizar o tratamento localizado, causando menos danos aos tecidos saudáveis, sendo assim consideradas não invasivas e diretas [8,9]. Particularmente atraente, as terapias fototérmicas (TFT) [12–14] e fotodinâmicas (TFD) [15–19] têm apresentado modalidades inovadoras no tratamento clínico [20,21].

2.1. Terapia Fotodinâmica (TFD)

A luz é utilizada como terapia a mais de 300 anos. Os povos egípcios, indianos e chineses usavam a luz para tratar uma série de doenças, como por exemplo a psoríase, raquitismo, vitiligo e câncer de pele [10]. Em 1900 foi publicado o primeiro artigo científico reportando que alguns comprimentos de ondas são letais a paramécios na presença de acrimidina [22]. Com o desenvolvimento da terapia, em 1999, no Canadá, o fotossensibilizador (FS) Photofrin[®] foi aprovado para uso clínico [23], sendo o grande ponto de partida para o desenvolvimento de FS cada vez mais eficientes.

Na TFD as células são destruídas pela indução de efeitos fototóxicos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas pela fotoativação de FS administrados de forma controlada e iluminados com comprimentos de onda adequados. O diagrama de Jablonski, representado na Figura 1, ilustra o mecanismo de ação da TFD. A energia dos fótons é transferida para os elétrons do FS, o qual é excitado e sai do estado fundamental (S_0) para um estado excitado de energia (S_1). Uma vez excitado, a energia precisa ser dissipada. Uma possibilidade é a relaxação vibracional (indicado pelas setas pequenas dentro do estado S_1 de energia), no qual a energia é propagada para outro modo vibracional na forma de energia cinética. A energia recebida também pode ser dissipada através da emissão de um fóton, fenômeno conhecido como fluorescência. A fluorescência usualmente ocorre entre os estados S_1 e S_0 , pois em maiores níveis de energia é provável que a energia seja dissipada através de conversão interna ou relaxação vibracional. Uma terceira via que a energia pode tomar para se dissipar é o cruzamento entre sistemas. Nesse caso, ocorre inversão no spin do elétron de um estado singleto para um tripleto de energia (T_1). Devido ao maior tempo de vida desse estado, a transferência de energia para o oxigênio molecular (O_2) é favorecida, gerando EROs pelas reações do Tipo I ou Tipo II [24–29].

A reação do Tipo I é baseada na formação de radicais livres pela transferência de elétron ou abstração do átomo de hidrogênio em moléculas vizinhas. Os radicais interagem com oxigênio, formando as EROs como os íons peróxidos, superóxidos e os radicais hidroxilas que são capazes de causar danos oxidativos e lesões celulares. Na reação Tipo II ocorre a transferência de energia diretamente para o O_2 circundante, gerando as espécies de oxigênio singleto (1O_2) [24,25,30]. As duas reações podem ser concomitantes, apesar do 1O_2 da reação Tipo II ser frequentemente considerado o agente citotóxico mais poderoso na TFD [30–33], o que motiva a busca por FS capazes de produzir 1O_2 com elevado rendimento quântico (Φ_Δ). Contudo, observa-se que a eficiência da TFD depende não apenas da quantidade de espécies reativas, mas da localização específica de sua geração [30,32]. Os danos fotodinâmicos estão

confinados à vizinhança nanométrica do FS, dado o curto tempo de vida do $^1\text{O}_2$ (aproximadamente 10^{-6} s) [34,35]. Por exemplo, a localização subcelular do FS pode induzir estresse oxidativo nas organelas provocando a síntese de proteínas pró-apoptóticas, que desencadeiam uma cascata de reações responsáveis pela fragmentação do material genético, resultando em morte celular [32,36,37]. Além disso, as EROs podem inativar proteínas como a Bcl-2, que protegem as células cancerosas do mecanismo apoptótico [26]. Não o bastante, FS que possuem afinidade por lipídeos [15,38,39] podem induzir danos fotodinâmicos significativos na membrana plasmática, perturbando a permeabilidade e sinalizando o caminho necrótico de morte celular [40].

A capacidade de FS de interagir com alvos biológicos, além de alto $\Phi_{\Delta} \text{ } ^1\text{O}_2$ são, portanto, propriedades desejáveis para aumentar a eficácia da TFD [41]. Recentemente, os derivados xantênicos receberam atenção como FS devido a sua baixa toxicidade quando não irradiado e aprovação para aplicações em alimentos, drogas e cosméticos [42,43].

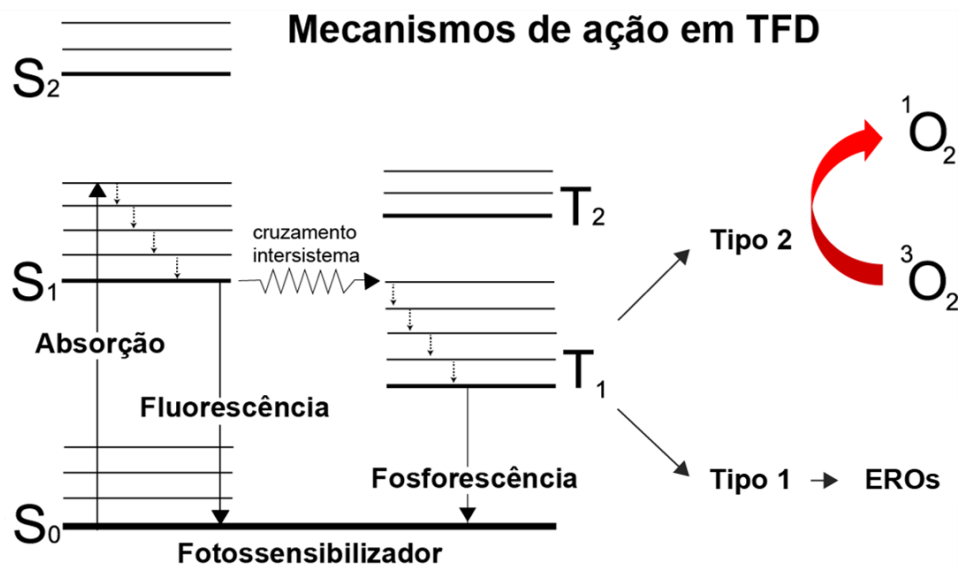


Figura 1: esquema ilustrativo para geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) baseado no diagrama de Jablonski simplificado. Fonte: Adaptado de [44].

2.2. Eritrosina B

A eritrosina (eritrosina B; ácido 2-[6-hidroxi-2,4,5,7-tetraiodo-3-oxo-xanten-9-il] benzoico), é um fotossensibilizador da família dos xantênicos, sintetizada a partir da halogenação da fluoresceína. É composta por um anel benzênico inclinado 90° em relação ao anel xantênico com a adição de quatro átomos de iodo, como ilustrado na Figura 2(a). O potencial eletrostático da molécula é mostrado na Figura 2(b) [45]. A eritrosina apresenta uma região central com natureza nucleofílica (azul) e uma região eletrofílica (vermelha) localizada

nas extremidades do anel xantênico, principalmente a redor dos átomos de iodo e oxigênio. Os átomos de iodo são responsáveis por facilitar o cruzamento intersistema para o estado tripleto (Figura 1), onde pode ser transferida para oxigênio molecular produzindo $^1\text{O}_2$ [46–49]. O grupo carboxil e anel benzênico são considerados como regiões neutras (verde) [50].

Devido a presença do grupo carboxílico ($\text{pK}_a= 2,35$) e fenólico ($\text{pK}_a= 3,79$) em sua estrutura molecular, a eritrosina caracteriza-se como um ácido poliprótico (Figura 2(a)). Portanto, há 4 diferentes formas moleculares que dependem do pH e do solvente, sendo elas: catiônica (FH_3^+), neutra (FH_2), monoaniônica (FH^-) e dianiônica (F^{2-}) [45,49]. A forma ácida é um corante sem cor, devido à mudança da hibridização de sp^2 para sp^3 no carbono que liga o anel xantênico ao benzênico [45], enquanto as estruturas mono e dianiônica apresentam máximo de absorção em 526 nm [49]. Em pH fisiológico ($\sim 7,4$), a eritrosina se encontra na forma protolítica dianiônica, e possui um elevado valor de rendimento quântico na formação de oxigênio singleto ($\Phi_{\Delta} \text{}^1\text{O}_2 = 0,63$), alta absorvidade molar ($\epsilon_{532 \text{ nm}} = 96,6 \times 10^{-3} \text{ L/ mol} \times \text{cm}$) [51–54], devido a sua baixa toxicidade, é o único derivado xantênico aprovado para uso em alimentos pelo FDA dos Estados Unidos (*United States Food and Drug Administration*) [55].

As aplicações da eritrosina são diversas na literatura. Uma vez que a molécula emite fluorescência, ela é um dos fluoróforos orgânicos mais utilizados como marcadores [56–59] e em tratamentos odontológicos como evidenciador da placa bacteriana [60]. Ademais, a eritrosina também é utilizada como FS na inativação de patógenos de origem alimentar e bactérias orais deteriorantes [61–64], fúngicos [65–67] e no tratamento de câncer [50,68]. Há também estudos que avaliam a dispersividade do FS em fluídos biológicos [69] e para aplicações intravenosas [70], que são importantes contribuições para futura aplicação em humanos da TFD. As membranas celulares são consideradas o primeiro alvo na TFD, mas a sua complexidade é uma limitação a ser contornada a fim de esclarecer os mecanismos subjacentes de interação com FS e outras reações de oxidação. Portanto, técnicas adequadas são necessárias não apenas para mimetizar as membranas plasmáticas, mas também para caracterizar os mecanismos de interação em nível molecular.

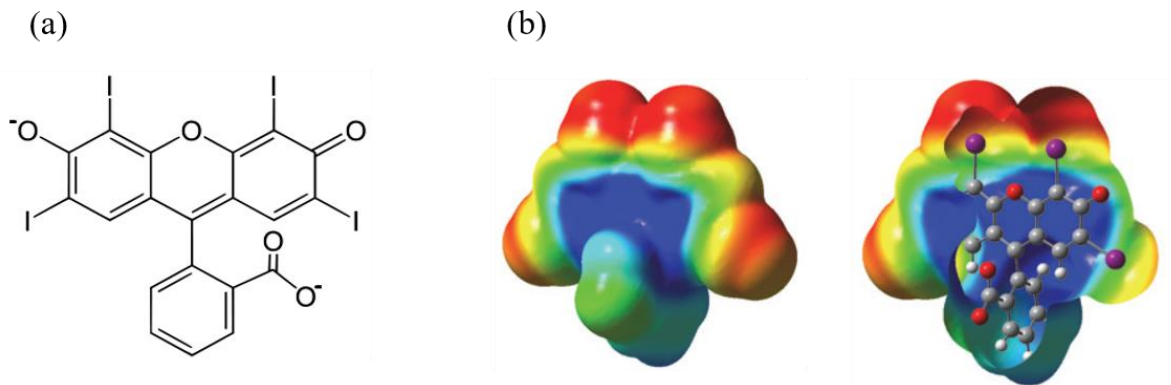


Figura 2: (a) estrutura molecular e (b) potencial eletrostático da eritrosina. A região em vermelho se refere a característica eletrofílica, enquanto a região azul representa a natureza nucleofílica da molécula. As regiões neutras da eritrosina estão em verde. Fonte: Adaptado de [50].

2.3. Modelos de membrana

A membrana plasmática está presente em todas as células eucariontes e procariontes, delimitando os meios intra e extracelular. Além disso, as membranas plasmáticas integram o funcionamento ativo das células, regulam a passagem de moléculas, controlam os gradientes de concentração, os níveis de energia, além de realizarem atividades metabólicas como aderência e sinalização [71]. Os lipídeos, proteínas e carboidratos são os principais componentes moleculares presentes nas membranas plasmáticas.

Estruturalmente, os lipídeos formam uma bicamada na qual as regiões apolares de cada camada estão orientadas para o centro e os grupos polares estão orientados para fora da bicamada, interagindo com a fase aquosa dos meios. As proteínas estão embebidas nessa estrutura, mantidas por interações secundárias entre os lipídeos de membrana e os domínios proteicos. Algumas proteínas projetam-se apenas de um dos lados da bicamada, enquanto outras expõem seus domínios em ambos os lados. Desse modo, os domínios proteicos expostos em um lado da membrana são diferentes daquele exposto no outro lado, refletindo uma assimetria funcional. Os carboidratos, se localizam na camada externa da membrana e são responsáveis pelo reconhecimento celular e adesão [72,73]. As unidades lipídicas, proteicas e sacarídicas formam um mosaico fluido, no qual são livres para se moverem no plano da membrana, como ilustrado na Figura 3(a). O modelo de mosaico fluido é o mais aceito pela literatura para representar didaticamente as membranas plasmáticas, todavia já é conhecido um novo aspecto da membrana no qual esfingolipídeos e colesterol (classes de lipídeos) formam jangadas que se movem dentro da bicamada fluida, como exibido na Figura 3(b). A proposta é que essas

jangadas operem como plataformas para a fixação de proteínas quando as membranas se movimentam dentro da célula e durante a transdução de sinais [73,74].

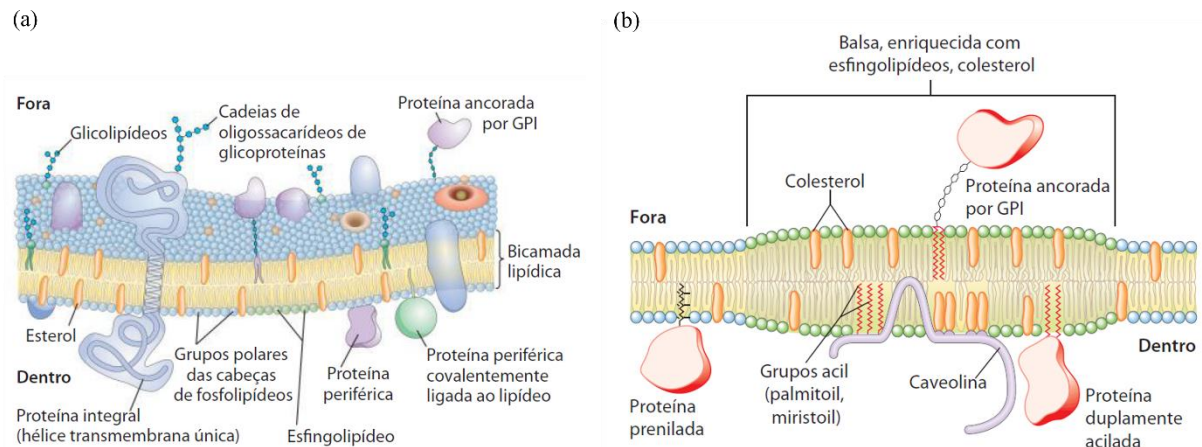


Figura 3: (a) modelo do mosaico fluido para estrutura de membrana plasmática. (b) Modelo de jangadas da membrana plasmática. Fonte: [73].

A fluidez da membrana lipídica depende principalmente da sua composição lipídica e da temperatura [72]. Os fosfolipídeos são moléculas anfifílicas, no qual uma extremidade da molécula é hidrofóbica e a outra é hidrofílica. Estruturalmente são compostos por dois ácidos graxos unidos por ligação éster ao primeiro e ao segundo carbono do glicerol e um grupo fortemente polar unido por ligação fosfodiéster ao terceiro carbono, como exemplificado na Figura 4(a). Os grupos polares, indicado com a letra “X” na Figura 4(a), constituem as “cabeças” dos fosfolipídeos e os mais comuns são: colina, serina, etanolamina, glicerol e o inositol. As cadeias de ácidos graxos constituem a “cauda” hidrofóbica das moléculas e podem variar em quantidade de carbonos e na presença ou ausência de insaturações [71]. A Figura 4(b) está representado a influência das duplas ligações nas cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídeos presentes em uma membrana. Uma cadeia curta reduz a tendência das caudas apolares de interagirem umas com as outras, na mesma camada ou na monocamada oposta, e as insaturações produzem torções nas cadeias de hidrocarbonetos que as tornam mais difíceis de se agruparem, de modo que a membrana fica mais fluída a baixas temperaturas. Além dessas características, o colesterol, no caso de células animais, auxilia na modulação das propriedades da bicamada lipídica. Quando misturados com os fosfolipídeos, aumentam a propriedade de barreira permeável e reduzem a mobilidade dos primeiros grupos CH₂ das caudas lipídicas, tornando a membrana menos deformável nessa região [72]. Devido à complexidade da membrana celular, os mecanismos de interação lipídeo-molécula e foto-oxidação da TFD são difíceis de serem avaliados por metodologias com cultura *in vitro* de células. Assim, os modelos

de membranas são métodos utilizados para mimetizar as membranas lipídicas e fornecer informações em nível molecular.

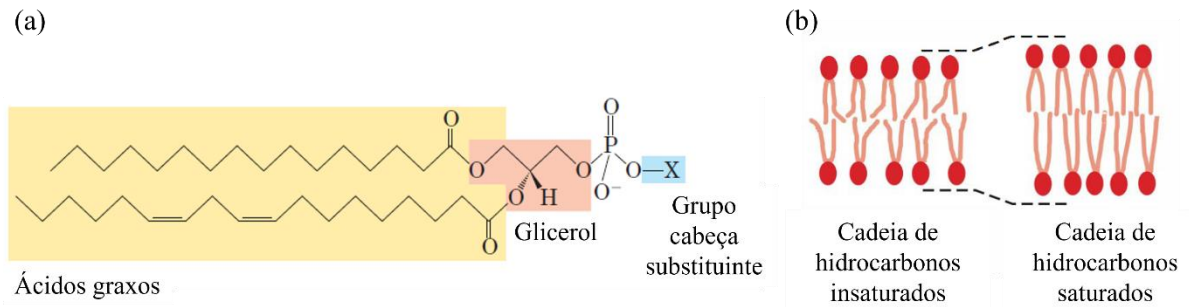


Figura 4: (a) estrutura base dos fosfolípidos. (b) Influência das insaturações nas cadeias de hidrocarbonetos que compõem a membrana plasmática. Fonte: [71,72].

As vesículas unilamelares (pequenas, grandes e gigantes) e as monocamadas de Langmuir são alguns dos modelos biomiméticos de membrana utilizados [75]. Os filmes de Langmuir são constituídos por monocamadas lipídicas e modelam diversos tipos de membranas, como a camada mais externa das membranas plasmáticas, de células bacterianas ou ainda de vírus [76,77]. Esse sistema permite controlar rigorosamente a composição da monocamada, monitorar o estado de compactação e a estruturação do filme. De fato, as monocamadas de Langmuir vêm sendo utilizadas na área médico-farmacológico há anos com o intuito de determinar os mecanismos de ação de drogas e moléculas com interesse biológico [78–83].

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou [15] que a hidroxidação pode ser fotoinduzida quando a eritrosina é incorporada em filmes de Langmuir de fosfatidilcolinas, as quais atuam como modelo de membrana de células não tumorais. Além disso, mostramos que as interações em nível molecular do FS com as membranas lipídicas podem modular as reações fotoquímicas [15,39,84–87]. Por exemplo, a hidroxidação lipídica foi o principal resultado da foto-oxidação induzida por FS que interagem com os grupos polares da monocamada [15,39,84,86], derivado da reação ene com alcenos contendo hidrogênios alílicos [88]. Por outro lado, FS com maior hidrofobicidade, penetram mais fundo nas monocamadas permitindo a clivagem da cadeia por reações que depende do contato entre estado excitado do PS com as insaturações ou com grupos hidroperóxidos formados previamente [85].

Apesar das importantes contribuições nos mecanismos da oxidação lipídica fotoinduzida, todos esses dados foram adquiridos com monocamadas simples de Langmuir, compostas por fosfolípidos puros e totalmente insaturados, o que pode não ser diretamente correlacionado com sistemas bastante complexos, como as membranas plasmáticas. A fim de

conferir maior complexidade ao sistema mimético, nessa dissertação, primeiro construímos monocamadas de Langmuir com misturas de fosfolipídeos e, em um segundo momento, formamos filmes com fosfolipídeos provenientes de células de câncer de mama (MCF7). Além disso avaliamos a eficiência fotodinâmica e os mecanismos de morte induzidos pela eritrosina em cultivo *in vitro* de células derivadas dos carcinomas de orofaringe (HEp-2) e mamário (MCF7) humano.

3. Conceitos teóricos

3.1. Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer

Os filmes de Langmuir são formados na interface ar-água. Normalmente são constituídos por moléculas anfifílicas, as quais possuem grupos hidrofóbicos e hidrofílicos bem definidos, e são insolúveis em água. Caso as moléculas anfifílicas sejam ideais, os filmes de Langmuir podem constituir uma monocamada, na qual as moléculas se organizam com a sua parte polar voltada para água e sua porção apolar voltada para o ar [75,89].

Para a fabricação de monocamadas de Langmuir, uma solução de moléculas anfifílicas diluídas em solvente volátil (usualmente clorofórmio) é espalhada na interface ar-água [90,91]. A Figura 5(a) ilustra uma cuba de Langmuir, destacando dois acessórios básicos: barreiras móveis e sensor de pressão de superfície. Após evaporação do solvente, as barreiras fecham com velocidade constante, reduzindo a área disponível para a formação dos filmes de Langmuir. O sensor de pressão, acoplado ao sensor de Wilhermy, mede a pressão de superfície na subfase durante a compressão das barreiras (Figura 5(b)). A pressão de superfície é calculada pela diferença entre a tensão de superfície da subfase aquosa na ausência e na presença das moléculas anfifílicas espalhadas [75,92].

A caracterização básica desses filmes são as isotermas de pressão de superfície (π) *versus* área molecular média (A); isotermas π - A). A Figura 5(c) exemplifica uma isoterma característica de um ácido graxo saturado, destacando as três transições de fases decorrentes da compressão das barreiras. Na fase gasosa as moléculas interagem muito pouco entre si, na fase líquida as interações vão aumentando e na fase condensada, as moléculas formam um filme de espessura monomolecular. Com a continuidade da compressão, as moléculas podem agrupar-se desordenadamente umas sobre as outras atingindo a região do colapso. Esse arranjo regular com fases bem definidas é característico de moléculas simples. As moléculas maiores e mais complexas nem sempre possuem as fases identificadas de forma distinta [93].

Os filmes de Langmuir-Schaefer (LS) são obtidos pela transferência de filmes de Langmuir da superfície da água para substratos sólidos. A deposição ocorre por aproximação

mecânica ou manual do substrato sólido em posição horizontal em relação a subfase aquosa, mantendo constante a pressão de superfície da monocamada, como demonstrado na Figura 5(d). A fim de monitorar a deposição do filme LS, medidas de espectroscopia de absorção UV-Vis são realizadas a cada conjunto de deposição [93]. Ao final, é possível construir um gráfico com número de camadas *versus* absorbância e constatar se o crescimento do filme foi linear.

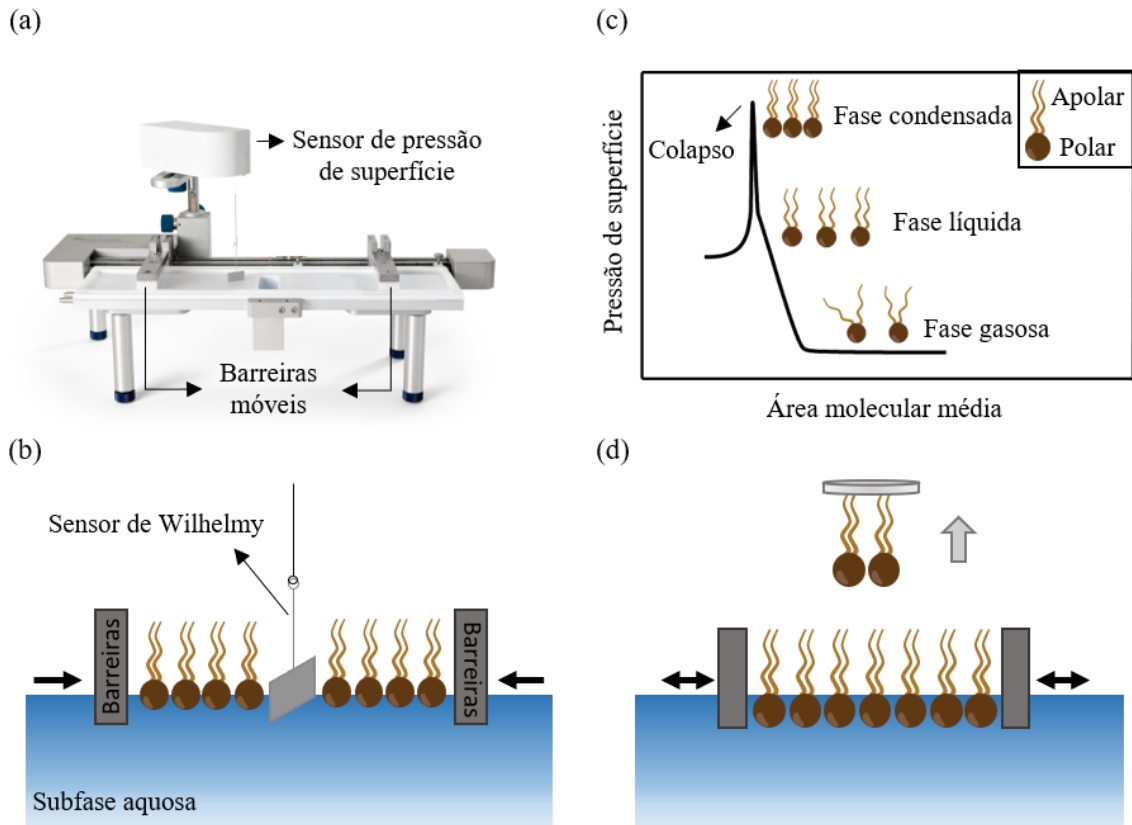


Figura 5: (a) cuba de Langmuir. (b) Representação da compressão das moléculas pelas barreiras móveis e (c) ilustração gráfica de uma isoterma π -A, detalhando as três fases de compressão da monocamada de Langmuir até o colapso. A inserção exibe uma molécula anfifílica e suas regiões apolar (hidrofóbica) e polar (hidrofílica). (d) Esquema da deposição dos filmes de Langmuir-Schaefer (LS). Fonte: Adaptado de [89,93].

3.2. Espectrometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectrometria no infravermelho é uma técnica que avalia a interação da radiação eletromagnética com a matéria, analisando os modos vibracionais de acordo com a amplitude das ligações covalentes existentes nas moléculas da amostra. Os átomos e moléculas encontram-se em constante vibração em relação uns aos outros. A radiação no infravermelho não possui energia suficiente para provocar transições eletrônicas, no entanto, a sua absorção ocorre em frequências específicas para cada grupo funcional, devido ao arranjo intrínseco de átomos e ligações presentes nas moléculas [94,95].

Para que ocorra a absorção da radiação infravermelha, a molécula deve sofrer variação no momento dipolo durante seu movimento rotacional ou vibracional. O momento dipolo é definido pela magnitude da diferença entre dois centros de carga e pela sua distância. Desse modo, o campo elétrico alternado da radiação consegue interagir com a molécula e provocar a variação na amplitude dos seus momentos dipolos. Se a frequência incidida for a mesma que a frequência natural de vibração da molécula, ocorre a absorção via ressonância, produzindo a variação na amplitude de vibração molecular [96,97].

As vibrações moleculares são denominadas de acordo com a posição e a oscilação contínua dos átomos. A Figura 6(a) ilustra os diferentes tipos de vibrações. Os modos vibracionais são classificados em dois grupos: (i) vibrações de estiramento, que envolvem o movimento rítmico na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. Essa distância pode aumentar e diminuir simultaneamente (simétrico) ou alternadamente (assimétrico). E as (ii) vibrações de deformação angular, que envolvem variação ritmada no ângulo entre duas ligações com um átomo em comum. Nesse caso, há quatro possibilidades: simétrico ao plano (movimento semelhante ao abrir e fechar de uma tesoura), assimétrico ao plano (como um balanço), simétrico fora do plano (similar a ação de se abanar com um papel) e assimétrico fora do plano (análogo ao movimento de torção). As bandas de absorção correspondem predominantemente a um único modo vibracional, sendo possível identificar os grupos funcionais em amostras orgânicas, inorgânicas e poliméricas através dos padrões dos espectros de absorção [94,95].

O princípio de funcionamento de um espectrômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR – *Fourier-transform infrared spectroscopy*) é apresentado na Figura 6(b). Esses equipamentos fundamentam-se no princípio interferométricos de Michelson, o qual permite produzir resultados com maior resolução e qualidade espectral devido ao aumento da razão sinal-ruído e ao menor tempo de varredura e aquisição de espectros [97]. A radiação emitida por uma fonte no infravermelho (Fonte IR) passa pelo interferômetro, denominado divisor de feixe, o qual divide o feixe. Um dos feixes é direcionado para um espelho fixo e o outro para um espelho móvel. Após a reflexão nos espelhos, ambos os feixes voltam a se combinar antes de atingirem a amostra. O espelho móvel permite variar as distâncias percorridas pelos dois feixes, desse modo é possível obter interferências construtivas e destrutivas produzindo variações na intensidade de radiação recebida pelo detector e gerando um interferograma. A transformada de Fourier converte o domínio desse interferograma que está na escala tempo para a escala de frequência, formando os espectros de absorção.

A configuração do espectrômetro para aquisição de espectros FTIR pode ser feita de diferentes maneiras, as mais utilizadas são pelo modo de transmissão e pela reflexão total atenuada (ATR). No modo de transmissão, os espectros são adquiridos a partir da radiação não absorvida pela amostra (radiação transmitida), sendo necessário um substrato de material transparente a radiação infravermelha, como brometo de potássio ou seleneto de zinco. Por outro lado, no modo ATR ocorre a indução da reflexão interna total da radiação incidente, a qual é atenuada e penetra na amostra como uma onda evanescente. O modo ATR é mais robusto, não requer substratos especiais e pouco preparo da amostra, sendo necessário apenas o contato direto do material com o elemento de reflexão interno [97].

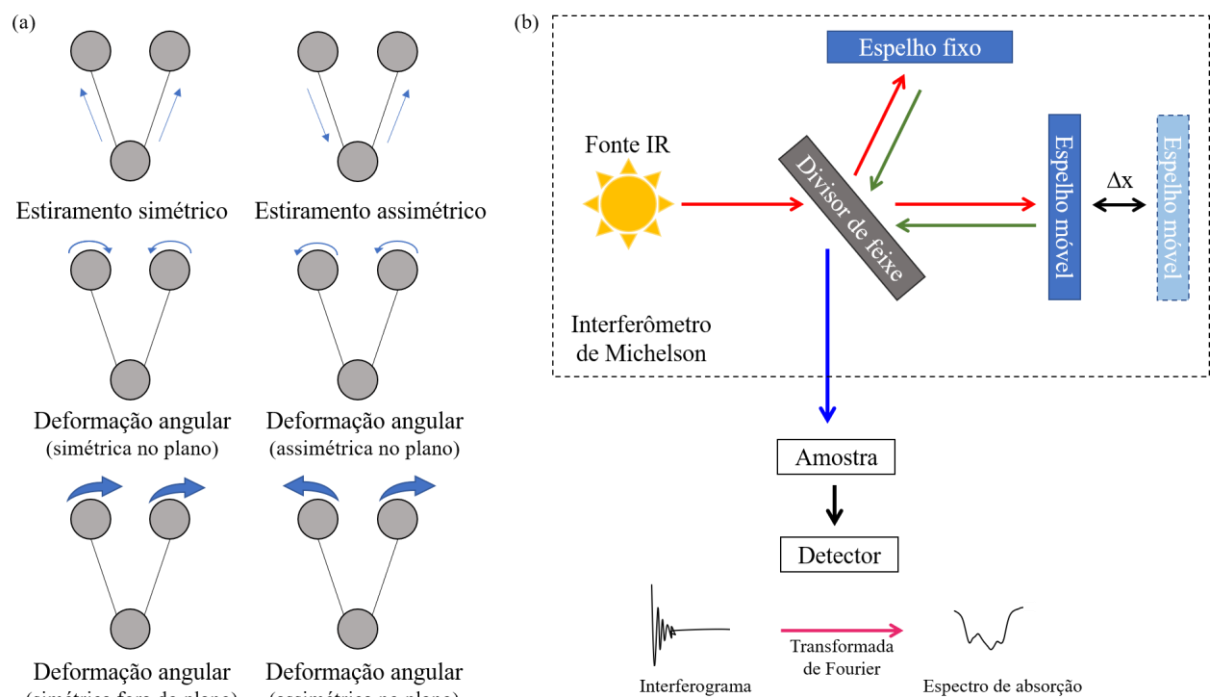


Figura 6: (a) modos vibracionais simétricos e assimétricos de moléculas poliatômicas. (b) Princípio de funcionamento de um espectrômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR – *Fourier-transform infrared spectroscopy*). Fonte: adaptado de [98,99].

3.3. Microscopia de fluorescência confocal

A iluminação e observação pela microscopia confocal se popularizou nas análises de sistemas biológicos a partir de 1987, com o uso da fluorescência [100]. A técnica consiste na marcação da amostra com uma molécula fluorescente. O material é então iluminado por uma luz no comprimento de onda específico do marcador e a fluorescência emitida na relaxação do fluoróforo é a origem das imagens geradas. O princípio de funcionamento do microscópio está ilustrado na Figura 7(a). A luz emitida pela fonte luminosa atravessa o filtro de excitação, no qual será selecionado a excitação espectral do fluoróforo. Essa luz é refletida por um espelho dicróico, sendo direcionada até a amostra. A luz emitida pela fluorescência é captada pela

objetiva, atravessa o mesmo espelho dicróico e finalmente é separada da luz de excitação pelo filtro de emissão. A imagem resultante é formada pela somatória das imagens advindas dos planos iluminados na amostra. O microscópio confocal possui o mesmo princípio de funcionamento que a observação por fluorescência. Entretanto, no confocal há um dispositivo com um orifício (*pinhole*) alinhado com o plano focal da objetiva. O *pinhole* é responsável pela eliminação da luz proveniente de regiões fora do plano focal, produzindo uma imagem resultante com melhor definição, como exibido na Figura 7(b). Outra vantagem da microscopia confocal é a capacidade em reconstruir em 3D o material de interesse, independente da espessura. As imagens confocais em 2D ou 3D são uma sobreposição de inúmeros pontos da amostra que são adquiridos através de uma varredura pontual. Os pontos da amostra são obtidos um por vez, portanto, o tempo de aquisição das imagens finais é mais longo. Sendo assim, a microscopia confocal é limitada a amostras imóveis ou que evoluem lentamente [44].

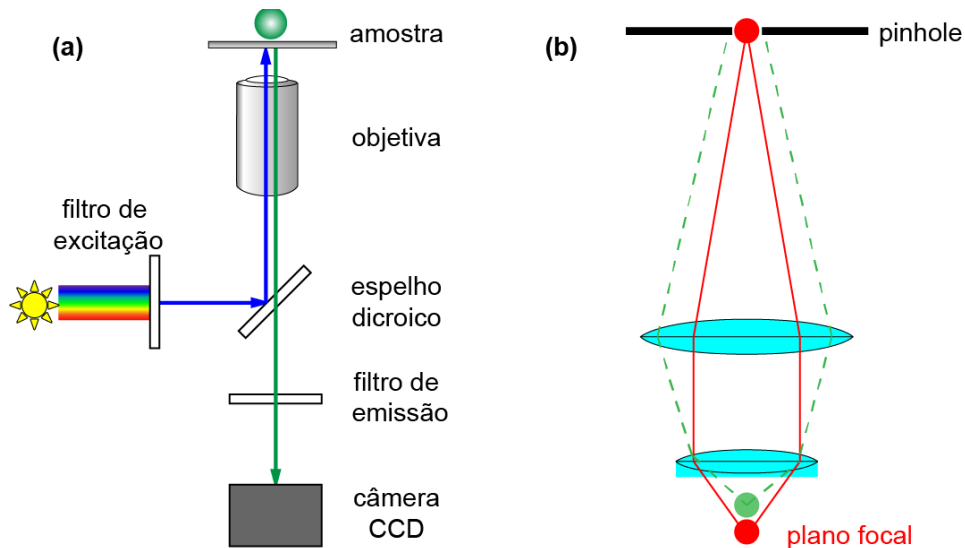


Figura 7: (a) princípio do funcionamento do microscópio de fluorescência. (b) Dispositivo com orifício utilizado na microscopia confocal. A qualidade da imagem no plano focal (vermelho) é aumentada pela eliminação da luz proveniente das regiões fora do plano focal (verde). Fonte: [44].

3.4. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que usa um sistema óptico para identificar e caracterizar as propriedades físico-químicas de células individuais dentro de populações homogêneas ou heterogêneas de micropartículas presentes nos seres vivos. Por meio de um feixe de luz incidente ocorre a medição da dispersão e da fluorescência da luz refletida [101]. A Figura 8(a) ilustra o princípio de funcionamento de um citômetro de fluxo. Após a marcação com moléculas fluorescentes de interesse, a amostra em suspensão é introduzida no aparelho.

Como o fluxo é laminar e o diâmetro do tubo se afunila, as micropartículas são forçadas a passar em fila única pelo laser da fonte luminosa. A luz incidente é dispersa de modo retilíneo e lateralmente, sendo recebidas e processadas por detectores.

A luz dispersa na linha do feixe retilíneo é denominada espalhamento de luz frontal (FSC – *forward scattered light*) e gera dados a respeito do volume das micropartículas. Quando a luz é dispersa lateralmente, duas informações são fornecidas. A primeira diz respeito ao espalhamento de luz lateral (SSC – *side scattered light*), na qual os detectores computam dados sobre a complexidade interna da partícula. A segunda informação é em relação a fluorescência emitida. O fluoróforo utilizado na amostra absorve a energia da luz incidente rapidamente, essa luz é refletida por um espelho dicróico, sendo direcionado até um detector óptico sensível a diferentes comprimentos de onda, permitindo que um ou mais fluoróforos sejam lidos ao mesmo tempo [102].

Um sistema eletrônico converte os sinais ópticos em eletrônicos e programas especializados conseguem construir representações gráficas em uni, bi ou tridimensionais da distribuição das populações, como ilustrado nas Figuras 8(b) e 8(c). Nos dois casos, cada ponto vermelho indica uma partícula que o citômetro identificou e analisou. A Figura 8(b) é um gráfico sobre dispersão da luz frontal (FSC) *versus* a luz lateral (SSC), no qual foi identificado uma população (P1) com volume proporcional a complexidade interna das partículas. Já a Figura 8(c) representa a marcação com fluorescência da mesma população da Figura 8(b). As partículas foram marcadas com dois fluoróforos, A e B. Esse gráfico é dividido em 4 quadrantes. O primeiro quadrante (Q1) representa as partículas com marcação do fluoróforo B e ausência do fluoróforo A. Os pontos vermelhos que se encontram no Q2 possuem dupla marcação, já os que estão no Q3 não apresentam nenhuma marcação (duplo negativo). O Q4 são as partículas com marcação do fluoróforo A e ausência do fluoróforo B [84]. A interpretação biológica desses resultados depende do tipo de marcação e do tratamento que é realizado sobre as partículas.

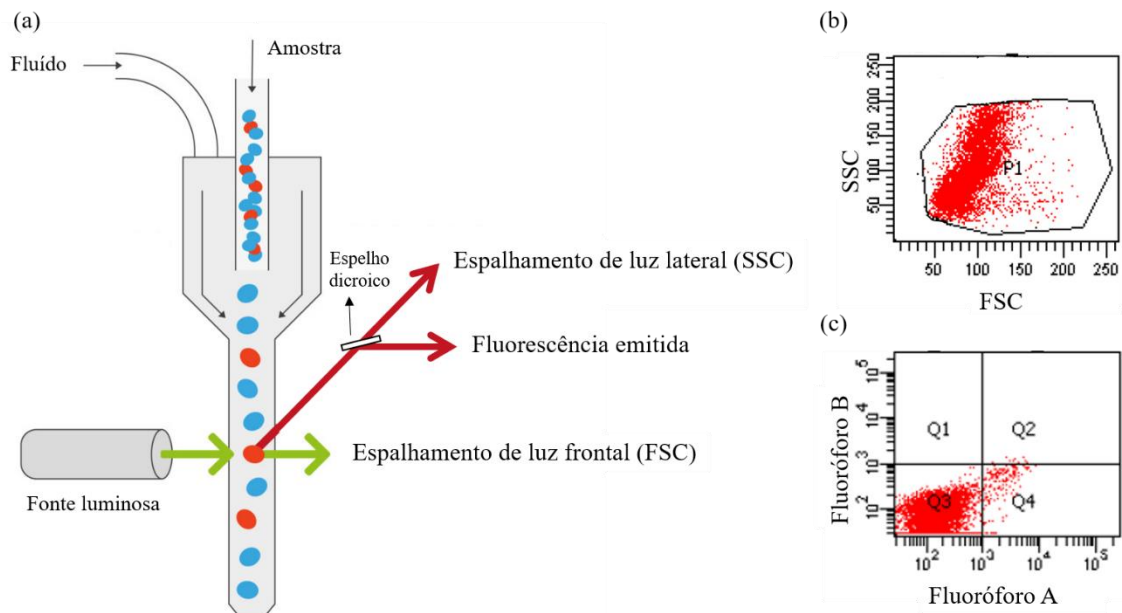


Figura 8: (a) princípio do funcionamento de um citômetro de fluxo. (b) Espalhamento de luz frontal (FSC) e lateral (SSC) de partículas. (c) Marcação da fluorescência das mesmas partículas quem em (b) com os fluoróforos A e B. Fonte: [103].

4. Objetivos

Nesta dissertação de mestrado, avaliamos os efeitos tóxicos e fototóxicos da eritrosina no cultivo *in vitro* de células derivadas do carcinoma humano de orofaringe (HEp-2) e de mama (MCF7), assim como os mecanismos moleculares responsáveis pelo processo de morte celular.

Desse modo, os objetivos específicos são:

- i. Determinar os mecanismos de interação da eritrosina com membranas lipídicas que mimetizem biomembranas de células tumorais;
- ii. Determinar a eficiência fotodinâmica da eritrosina no cultivo *in vitro* de células HEp-2 e MCF7;
- iii. Definir os mecanismos de morte celular induzido pela fotoativação da eritrosina;

5. Materiais e métodos

5.1. Cultivo *in vitro* de células HEP-2 e MCF7

Células HEP-2 (carcinoma humano de orofaringe) adquiridas através do banco de células do Rio de Janeiro (ref. 0101, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram cultivadas em meio de cultivo DMEM F12 (ref. D8900, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; ref. 0521-500, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e antimicóticos e antibióticos (anfotericina B, penicilina e estreptomicina; ref. 15240-062, Gibco, Gaithersburg, MD, EUA). As células MCF7 (câncer de mama glandular humano) também adquiridas do banco de células do Rio Janeiro (ref. 0162) foram cultivadas em meio de cultivo RPMI (ref. R6504, Sigma-Aldrich) com os mesmos suplementos utilizados para células HEP-2. As culturas foram mantidas em incubadora (TE-399, Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com 5% de CO₂ a 37 °C. O crescimento celular foi acompanhado diariamente. Quando a cultura atingia 80% ou mais de confluência, o cultivo foi lavado com solução salina tamponada com fosfato (PBS; ref 4417, Sigma-Aldrich), adicionado 5 x 10⁻⁴ L de tripsina (ref:12604-021, Gibco) e mantidas por cerca de 3 min na incubadora ou até que as células se soltassem da superfície do frasco. Então, 2/3 do volume celular foi descartado para que as células continuassem com o crescimento. Para inativação da tripsina, 5 x 10⁻³ L de meio de cultivo foi adicionado ao volume restante [84,104].

5.2. Extração e análise do extrato lipídico das células MCF7

O extrato lipídico celular foi obtido a partir da cultura de células MCF7, a qual foi suspensa com tripsina (3 min a 37 °C) e adicionadas em tubos falcon. A cultura foi centrifugada por 5 min em 437 g. O sobrenadante foi removido e 1 x 10⁻³ L de água ultrapura foi adicionado, seguido 10 min em banho ultrassônico. Então, adicionou 4 x 10⁻³ L de clorofórmio e a solução foi sonicada por mais 60 min, resultando em duas fases imiscíveis: uma contendo os fragmentos celulares solúveis em água e outra com os fragmentos solúveis em clorofórmio [105,106]. A fase aquosa foi removida, permanecendo apenas a solução em clorofórmio, a qual é rica em lipídeos provenientes das células MCF7 [107]. O extrato lipídico da MCF7 foi caracterizado por FTIR no modo de transmissão utilizando um espectrômetro Bruker (Alpha II, Billerica, MA, EUA). Os espectros foram obtidos em filmes *cast* em substrato de germânio com resolução de 4 cm⁻¹ e 256 varreduras. Ademais, espectrometria de massa foi realizada a fim de confirmar se a extração dos lipídeos da cultura *in vitro* de células MCF7 foi bem-sucedida. Para isso, filmes *cast* do extrato lipídico foram cobertos com uma solução MALDI matriz 2-5-ácido diidroxibenzoico (Sigma-Aldrich) a 10 mg/ mL em 1:1 acetonitrila/ metanol. Os espectros foram coletados em espectrômetro Bruker autoflexTOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen,

Alemanha) na faixa de massa de 600 a 3500 m/z , no modo íon positivo. A dessorção e ionização ocorreram por meio de um laser de nitrogênio em 337 nm, aplicado a uma taxa de repetição de 200 Hz com energia do laser de até 100×10^{-6} J e diâmetro de spot de $\sim 150 \times 10^{-6}$ m.

5.3. Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS)

Os fosfolipídeos 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC; ref. 850375C) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DOPS; ref. 840035C) foram adquiridos da Avanti® Polar Lipids Inc (Alabama, EUA) com 99% de pureza. Soluções estoques de DOPC ($1,2 \times 10^{-3}$ mol/L), DOPS ($0,8 \times 10^{-3}$ mol/L) e a mistura DOPC/DOPS (8:2; proporção molar) em clorofórmio (ref. 288306, Sigma-Aldrich) foram preparadas e armazenadas a -4 °C. As estruturas moleculares do DOPC e DOPS são representadas na Figura 9(a) e 9(b), respectivamente. As fosfatidilcolinas (PC) são encontradas em abundância em membranas plasmáticas não tumorais, enquanto as fosfatidilserinas (PS) expressam-se em determinadas situações, como em células tumorais [108,109]. Desse modo, as monocamadas formadas apenas com PC, foram consideradas controle, representando as células não tumorais, e a mistura entre PC/PS foi utilizada para mimetizar uma membrana tumoral.

Monocamadas de Langmuir foram fabricadas em uma cuba de Langmuir KSV-NIMA (KN 2002, KSV Instruments, Finlândia). Os fosfolipídeos foram espalhados sobre a superfície de subfases de água ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$; Direct-Q 3UV, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) ou eritrosina (10^{-5} mol/L) e esperou-se 10 min para que o solvente evaporasse. No caso do extrato lipídico da MCF7 em clorofórmio, foram espalhados 70×10^{-6} L em PBS e em solução de eritrosina em PBS (10^{-5} mol/L), simulando o pH fisiológico (7,4). Os filmes de Langmuir foram comprimidos simetricamente com uma velocidade constante de 5 mm/min, a 23 °C. Isotermas da pressão de superfície (π) pela área molecular (A ; isotermas π - A) foram obtidas e reproduzidas pelo menos 3 vezes, garantindo uma variância de ± 2 mN/m. As isotermas com extrato lipídico foram plotadas considerando a pressão de superfície (π) versus área ocupada pelo volume de lipídeo espalhado (cm^2/mL). As estabilidades de DOPS e DOPC/DOPS (8:2) em subfase de eritrosina (10^{-5} mol/L; pH 5.8) foram avaliadas através do monitoramento da área molecular média da monocamada em 30 mN/m, considerando filmes não irradiados e sob irradiação, utilizando um LED verde (530 nm; BRIWAX FFG-50W) posicionado a 20 cm acima da interface ar/água, como ilustrado na Figura 9(c). As estabilidades com extrato lipídico também foram realizadas espalhando 70×10^{-6} L da solução nas subfases de tampão PBS e com adição da eritrosina (10^{-5} mol/L) em PBS, mantendo os mesmos parâmetros experimentais que os utilizados para os fosfolipídeos.

Monocamadas de Langmuir de extrato lipídico da MCF7 em PBS contendo ou não 10^{-5} mol/L de eritrosina foram transferidas para substratos sólidos através da técnica de Langmuir Schaefer (LS) [110]. A pressão foi mantida em 30 mN/m enquanto a superfície do filme foi tocada pelo substrato, o qual foi horizontalmente aproximado e posteriormente levantado. As camadas de LS foram depositadas em quartzo através da repetição desse passo e monitorado seu crescimento via espectrometria de absorção no UV-Vis (Agilent spectrometer, Cary 60, de 190 a 1100 nm). Espectros FTIR foram realizados em filmes LS depositados em substrato de germânio utilizando um espectrômetro Bruker (Alpha II) com resolução espectral de 4 cm^{-1} e 256 varreduras. O esquema dos filmes LS do extrato lipídico da MCF7 é representado na Figura 9(d).

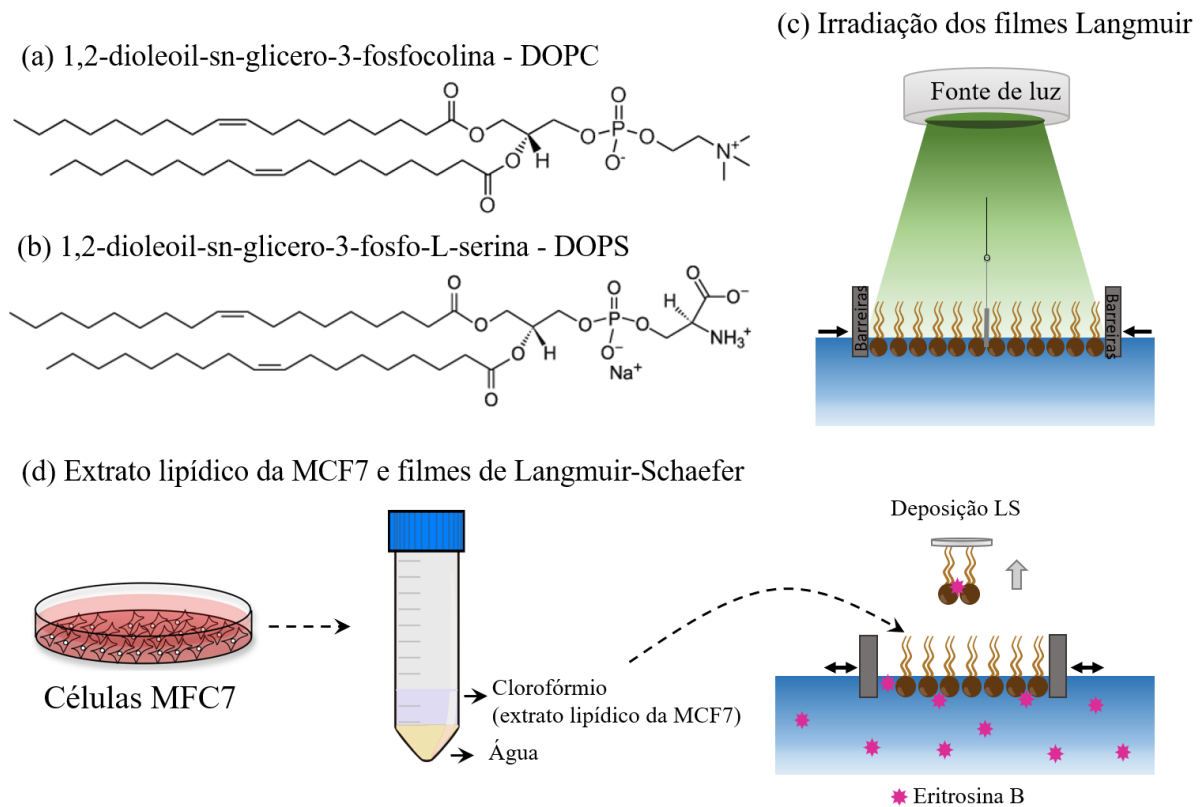


Figura 9: estrutura molecular dos fosfolipídeos (a) DOPC e (b) DOPS. (c) Cuba de Langmuir sob irradiação da monocamada. (d) Esquema de filmes Langmuir-Schaefer (LS) depositados a partir do extrato lipídico da MCF7. O extrato lipídico em clorofórmio foi espalhado na subfase de eritrosina em solução PBS, as barreiras foram comprimidas até 30 mN/m e um substrato sólido tocou a superfície do filme múltiplas vezes, transferindo as monocamadas.

5.4. Fotoativação da Eritrosina B

Uma solução estoque a 10^{-3} mol/L de eritrosina (95% de pureza; ref. 200964, Sigma-Aldrich) foi preparada em DMEM-F12 (ref. D2906, Sigma-Aldrich) sem adição de SFB. A partir desta solução, as concentrações 1,25, 5, 10, 25, 50 e 100×10^{-6} mol/L de eritrosina foram

diluídas em meio de cultivo e incubadas por 3, 24 e 48 h. Em seguida, o cultivo com diferentes concentrações de eritrosina foi irradiado por 60 min com uma fonte de LED ($\lambda = 525$ nm) com irradiância de $18,8 \pm 0,3$ mW/cm². Posteriormente a irradiação, a cultura foi incubada por 24 h com DMEM-F12 sem adição de SFB.

5.5. Ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT

O ensaio calorimétrico estima a viabilidade celular através da redução do sal de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; ref. M2003, Sigma-Aldrich] em cristais de formazana pela enzima desidrogenase succínica, ilustrado na Figura 10. A metabolização do sal é diretamente proporcional a taxa de metabolização mitocondrial, possibilitando inferir a viabilidade ou mortalidade celular através da absorbância.

Células foram semeadas em placas de cultivo com 96 poços (5×10^4 célula/poço; ref. K12-096, SPLabor, Presidente Prudente, SP, Brasil) e incubadas por 24 h em 37 °C a fim de atingir 80-90% de confluência. Após tratamento com eritrosina, o meio de cultivo foi substituído por 100×10^{-6} L do sal de MTT diluído em DMEM-F12 sem adição de SFB (0,5 g/L) por aproximadamente 50 min. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e receberam 50×10^{-6} L de dimetilsulfóxido puro (DMSO; ref. D4540, Sigma-Aldrich). A absorbância da solução resultante foi mensurada em 560 nm em um aparelho de espectrofotometria (Multiskan FC 357, Thermo Fisher Scientific, Uniscience, São Paulo, SP, Brasil). A viabilidade celular foi mensurada antes (não-irradiado) e após (irradiado) a fotoativação. O controle celular (CC) é considerado 100% viável e são as células cultivadas apenas na presença do meio de cultivo, o controle de morte (CM) é considerado 0% viável e recebe peróxido de hidrogênio (H_2O_2 50×10^{-6} mol/L), o controle de luz (CL) são as células submetidas ao tratamento de luz, mas não possuem eritrosina. Os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes.

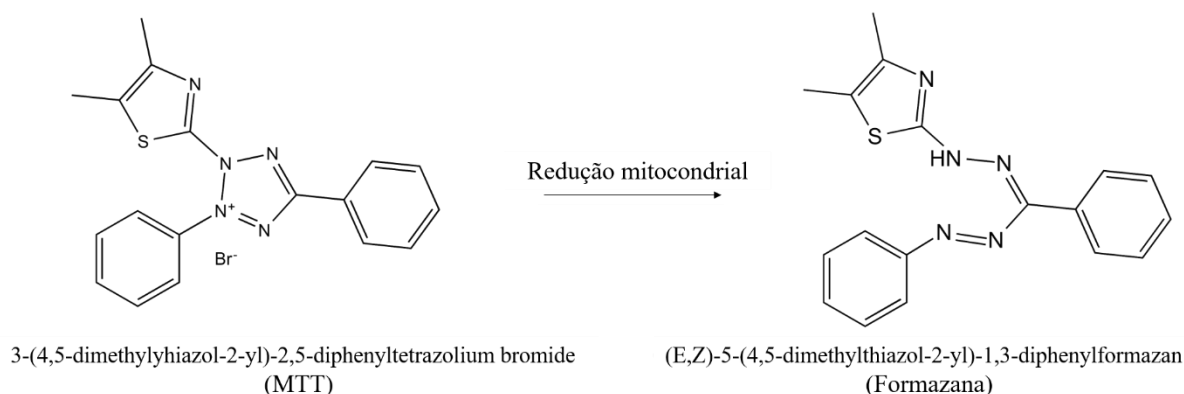


Figura 10: redução mitocondrial do sal de MTT em cristal de formazana.

5.6. Microscopia de fluorescência confocal

As microscopias confocais foram realizadas em um microscópio invertido Nikon (Nikon C2/C2si Eclipse Ti-E, Kyoto, Japão) equipado com uma objetiva com aumento 40x (NA 0.9). A fim de localizar a eritrosina no cultivo celular, as células foram marcadas com os fluoróforos WGA conjugado com Alexa Fluor® 488 (Wheat Germ Agglutinin Conjugates with Alexa Fluor® 488; ref. W11261, Invitrogen) e DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole). Enquanto o WGA Alexa Fluor® 488 (exc. 488nm/ em. 520 nm) tem afinidade pela membrana celular, o DAPI (exc. 358 nm/ em. 455 nm) se liga ao DNA, demarcando o núcleo celular. A eritrosina foi excitada em 530 nm, emitindo fluorescência em 620 nm, caracterizando a região celular na qual foi incorporada.

As células diluídas em meio de cultivo foram semeadas em placas com 24 poços (3×10^5 células/ poço; ref. K12-24, SPLabor), previamente preparadas com a presença de lamínulas, e incubadas por 24 h a 37 °C a fim de atingirem confluência maior ou igual a 80%. Em seguida, 1,25, 10 e 100 $\times 10^{-6}$ mol/ L de eritrosina foram adicionados e incubados por mais 24 h. Após o período de incubação, o sobrenadante foi substituído por 400 $\times 10^{-6}$ L do marcador WGA Alexa Fluor® 488 (5 $\times 10^{-6}$ g/ mL) e incubado por 10 min. Os poços foram lavados pelo menos 5 vezes com PBS. Em lâminas de microscopia foram adicionados 5 $\times 10^{-6}$ L de ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI (ref. P36931, Invitrogen), em seguida, as lamínulas foram colocadas gentilmente em cima do reagente, e mantidas em temperatura ambiente por 24 h. No dia seguinte, as lâminas foram finalizadas com esmalte incolor (*Risque*) e mantidas à 4 °C até que o experimento fosse realizado.

5.7. Citometria de fluxo

O mecanismo de morte foi avaliado para as células não-irradiadas e irradiadas através da citometria de fluxo. Células diluídas em meio de cultivo foram distribuídas em placas de cultivo com 24 poços (3×10^5 célula/ poço) e incubadas por 24 h à 37 °C para que atingissem 80% de confluência. 1,25, 10 e 100 $\times 10^{-6}$ mol/ L de eritrosina foram adicionados ao cultivo e incubados por 3, 24 e 48 h. As análises de citometria de fluxo foram realizadas em um equipamento FACSCanto (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA) com o kit Apoptose/ Necrose (Annexin V Alexa Fluor® 488 & Propidium Iodide (PI)/ Dead Cell; ref. V13245, Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Após os respectivos tratamentos, as células foram suspensas com o auxílio da tripsina (5 min à 37 °C) e armazenadas em tubos de citometria. Em seguida ao processo de centrifugação, as células foram ressuspensas em 400 $\times 10^{-6}$ L de tampão de ligação à Anexina V (1X; 50 $\times 10^{-3}$ mol/ L HEPES, 100 $\times 10^{-3}$ mol/ L NaCl e 12,5

$\times 10^{-3}$ mol/ L CaCl_2) e incubadas por 15 min com 5×10^{-6} L de Alexa Fluor[®] 488 Annexin V (25×10^{-3} mol/ L HEPES, 140×10^{-3} mol/ L NaCl, 10^{-3} mol/ L EDTA). Finalmente, 10^{-6} L de iodeto de propídio (PI) foi adicionado.

Células são consideradas em processo de necrose quando apresentam Annexin-Alexa488 negativo/ PI positiva, em apoptose com Annexin-Alexa488 positivo/ PI negativo, viáveis quando apresentam marcação dupla negativa e em estágio tardio de apoptose com marcação dupla positiva. Um controle de eritrosina foi realizado para garantir que a fluorescência não interferisse na análise dos resultados.

5.8. Espectrometria de Massa de Alta Resolução (HRMS) das células MCF7

5.8.1. Preparação da amostra

Células MCF7 (3×10^5 células/ poço) foram semeadas em placa de 24 poços com lamínulas alocadas em cada poço. Após confluência de 80%, a cultura recebeu 1,25, 10 e 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina por 24 h. As lamínulas com as células MCF7 foram removidas, lavadas com PBS e inseridas em tubos Eppendorf de 2×10^{-3} L, no qual 1×10^{-3} L de metanol foi adicionado. Os tubos foram sonicados por aproximadamente 5 min, 1×10^{-3} L de água MilliQ foi adicionada e por fim, os tubos foram agitados em vórtex por 30 s. Antes da análise, as amostras foram filtradas em filtro de polivinil difluoreto com $0,22 \times 10^{-6}$ m e centrifugadas por 15 min a 20817 g. Então, 30×10^{-6} L foram coletados do sobrenadante e diluídos em 470×10^{-6} L de metanol. Nessa solução final foi adicionado ácido fórmico (0,1%) para a análise de modo íon positivo. As análises de espectrometria de massa de alta resolução (HRMS - *high resolution mass spectrometry*) foram realizadas antes e após a irradiação.

5.8.2. Análise HRMS e elucidação estrutural

As amostras foram injetadas diretamente no equipamento ESI-LTQ-XL Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific) com resolução nominal de 30.000 (FWHM), com os seguintes parâmetros: taxa de fluxo de 10×10^{-6} L/ min, temperatura do capilar em 280 °C, voltagem de spray com 5 kV e o gás de bainha em 10 unidades arbitrárias. As análises HRMS foram realizadas no mínimo cinco vezes para cada amostra, na faixa de 500-1500 m/z no modo íon positivo.

O banco de dados LipidMaps[®] (<https://www.lipidmaps.org/>) foi consultado a fim de identificar os íons mais adequados com base na massa exata de cada espécie, adotando o erro máximo de 2 ppm para os adutos $[M + H^+]$, $[M + Na^+]$ e $[M + K^+]$ disponíveis na base de dados. Além da massa exata, os íons das moléculas oxidadas também foram identificados usando os

dados das reações MS/MS (espectroscopia de massas em tandem) [111,112]. As reações MS/MS foram realizadas usando hélio como gás de colisão, com energia para dissociação induzida por colisão (CID) variando de 20 a 60 (unidades arbitrárias). Os espectros do perfil de análise de fragmentação MS/MS foram analisados utilizando o software XCalibur (versão 2.4; Thermo Fisher Scientific) e as estruturas foram confirmadas a partir da modelagem de cálculo teórico para fragmentação molecular com o software Mass Frontier (versão 6.0; Thermo Fisher Scientific).

Todos os dados experimentais foram analisados também por análise de componente principal (PCA) após normalização de quantis. O mapa de calor dos marcadores selecionado pelo modelo PCA foi construído usando a medida da distância euclidiana e o algoritmo de agrupamento de Ward. Todas as análises envolvendo PCA e os marcadores eleitos foram realizadas no software online MetaboAnalyst 5.0 [113].

Os resultados que envolvem espectrometria de massas contaram com o apoio do doutor Carlos Fernando O. R. Melo e do professor Rodrigo R. Catharino do departamento de Ciências Farmacológicas na Universidade de Campinas.

5.9. Análises estatísticas

Os dados experimentais foram tratados utilizando o Microsoft[®] Excel, GraphPad Prism[®] 8 e OriginPro 8.5 e foram avaliados através da análise de variância (*one-way* ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. Nível de significância $p \leq 0,05$ foi utilizado.

6. Resultados e discussão

6.1. Necrose fotoinduzida em células de carcinoma orofaríngeo (HEp-2) mediada pelo xantênico Eritrosina B

6.1.1. Efeitos da foto-oxidação em sistemas modelos de biomembranas tumorais

Em células mamárias, a camada externa da membrana plasmática consiste principalmente por fosfatidilcolinas, enquanto as fosfatidilserinas são predominantemente encontradas na camada interna [114]. Entretanto, essa assimetria entre os lipídeos não é preservada em células tumorais e as fosfatidilserinas são expressas também na membrana mais externa. Portanto, modelos de biomembranas inspirados em monocamadas de Langmuir e vesículas unilamelares gigantes (GUVs) de fosfatidilcolinas (PC), fosfatidilserinas (PS) e da mistura PC/PS representam modelos de membranas tumorais [108,109] e podem ajudar a entender o mecanismo subjacente dos danos fotodinâmicos em células HEp-2.

As isotermas de pressão (π) vs área (\AA^2) e o módulo de compressibilidade obtidas para a monocamada da mistura de DOPC/DOPS (8:2) em subfase aquosa e em 10^{-5} mol/ L de eritrosina são mostradas na Figura 11(c) e 11(f). Os experimentos foram limitados a concentração de 10^{-5} mol/ L de eritrosina, uma vez que, está dentro da faixa de concentração onde os efeitos fotodinâmicos foram observados nos ensaios celulares (seção 6.1.2.). Experimentos controles foram realizados com monocamadas puras de DOPC e DOPS (Figuras 11(a e d) e 11(b e e)), nas mesmas condições. A eritrosina não possui atividade superficial e não forma filmes de Langmuir, como relatado anteriormente [15]. A isoterma π -A de DOPC/DOPS é deslocada para maior área molecular (de $72,2 \pm 1,0 \text{\AA}^2$ para $83,9 \pm 1,2 \text{\AA}^2$) quando a eritrosina é adicionada na subfase, o que é indicativo de adsorção do fotossensibilizador nas monocamadas. Apesar da divergência de uma mistura ideal de DOPC/DOPS [115], o comportamento combinado das monocamadas puras de DOPC e DOPS podem ajudar a explicar o mecanismo de interação com a eritrosina. A isoterma π -A de DOPC apresenta o maior deslocamento de área molecular em subfase de eritrosina, com aumento da área extrapolada em 30 mN/m de $91,4 \pm 0,7 \text{\AA}^2$ para $115,1 \pm 1,1 \text{\AA}^2$. Isso é consistente com a interação eletrostática atrativa que trazem os grupos aniônicos da eritrosina para as proximidades dos grupos colinas catiônicos, como relatado anteriormente [15]. Apesar da aparente carga negativa, a área extrapolada da isoterma π -A de DOPS em 30 mN/ m é deslocada de $71,7 \pm 1,8 \text{\AA}^2$ para $77,9 \pm 1,0 \text{\AA}^2$, permitindo a incorporação da eritrosina. De acordo com Luna *et al.* [115], o contra-íon (Na^+) nem sempre é dissociado da monocamada, neutralizando as moléculas de DOPS. Por isso, a atração eletrostática com os grupos amônia carregados positivamente pode estar

desempenhando um papel na adsorção da eritrosina. Portanto, pode-se presumir que as interações eletrostáticas da mesma natureza que estas observadas para DOPC e DOPS puros são as principais forças que permitem a adsorção da eritrosina na mistura de DOPC/DOPS. A Figura 11(d – f) mostra o módulo compressional (C_s^{-1}) calculado a partir das isoterma π -A referentes as monocamadas de DOPC, DOPS e da mistura de DOPC/DOPS, respectivamente. O C_s^{-1} é um método sensível para avaliar mudanças estruturais durante a compactação das monocamadas [116]. A adição de eritrosina (10^{-5} mol/ L) na subfase das monocamadas de DOPC (Figura 11(d)) e na mistura de DOPC/DOPS (8:2) (Figura 11(f)) não proporciona alterações significativas na elasticidade no geral. Entretanto, ocorre um aumento no seu valor na pressão de 30 mN/m para monocamada de DOPS (Figura 11(e)), sugerindo que a monocamada está mais compactada na presença do FS. Apesar desse maior empacotamento na monocamada de DOPS, ainda assim, não é suficiente para ocorrer transição de fase, permanecendo na fase líquido-condensada (C_s^{-1} varia de 100 a 250 mN/m) [116]. Sendo assim, este resultado sugere a possibilidade das moléculas de eritrosina estarem acomodadas na interface, promovendo a expansão observada nas isotermas π -A, mas sem afetar sua elasticidade e transição de fase.

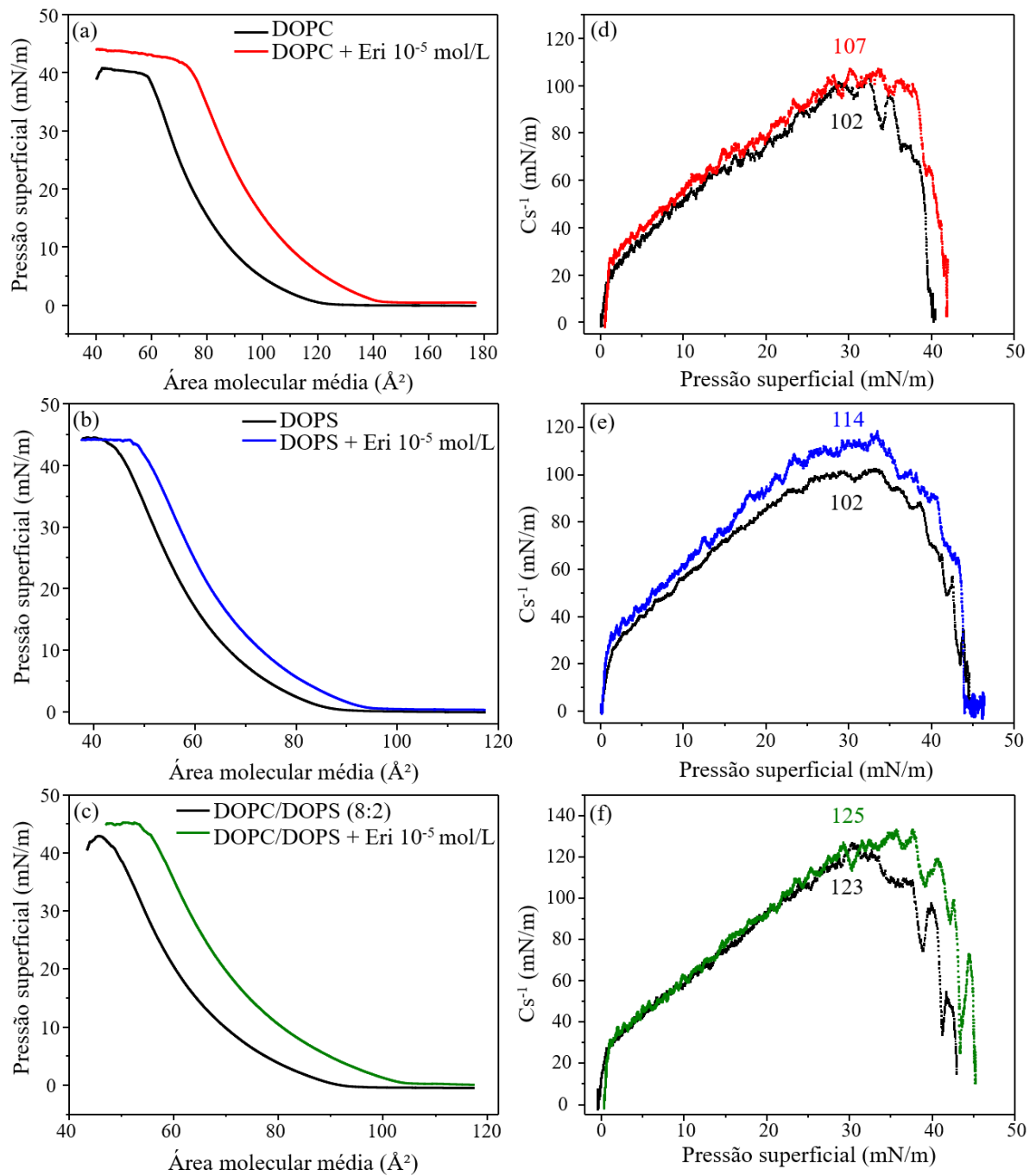


Figura 11: isotermas π - A e módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) para (a e d) DOPC, (b e e) DOPS e (c e f) mistura de DOPC/DOPS (8/2) em subfase de água ultrapura (linha preta) e eritrosina (10^{-5} mol/L; linha colorida). O módulo de elasticidade foi determinado a partir das isotermas π - A utilizando a equação: $C_s^{-1} = -A (d\pi/dA)$.

A área superficial das monocamadas de DOPS e DOPC/DOPS em solução de eritrosina (10^{-5} mol/L) irradiadas (530 nm) e não irradiadas foram mantidas a pressão constante de 30 mN/m e acompanhadas ao longo do tempo, como mostrado nas Figuras 12(a) e 12(b), respectivamente. Os experimentos de estabilidade foram limitados a 150 min, pois a eritrosina sofre fotobranqueamento após esse período (Figura 12(c e d)). A oxidação não controlada

mediada pelas espécies reativas do ambiente resulta na diminuição da área superficial das monocamadas não irradiadas, possibilitando a perda de material para a subfase [117]. Após irradiação, a inclinação da curva é reduzida, sugerindo a compensação da oxidação natural devido ao aumento na área molecular média ocupada pelos fosfolipídeos. De fato, nas monocamadas irradiadas de DOPC [15] e DOPS (Figura 12(a)), os filmes estão menos instáveis em relação a área lipídica ocupada no decorrer do tempo, diminuindo o coeficiente angular da reta. Por outro lado, a mistura de DOPC/DOPS irradiada superou a oxidação não controlada do ambiente. A eritrosina em estado excitado pode transferir energia para o oxigênio molecular gerando oxigênios singletos ($^1\text{O}_2$), espécie reativa capaz de oxidar tecidos biológicos. O $^1\text{O}_2$ pode reagir com as cadeias insaturadas formando grupos hidroperóxidos, os quais são hidrofílicos e migram em direção às cabeças polares, aumentando assim a área molecular ocupada pelos lipídeos [15,27,39], como inserido na Figura 12(b). A propagação das reações oxidativas pode induzir a clivagem dos sítios insaturados das caldas hidrofóbicas, induzindo a abertura de poros nas membranas lipídicas [27]. Portanto, é provável que esses efeitos observados em sistemas miméticos de membrana afetem a permeabilidade das células HEP-2, induzindo o caminho necrótico de morte celular.

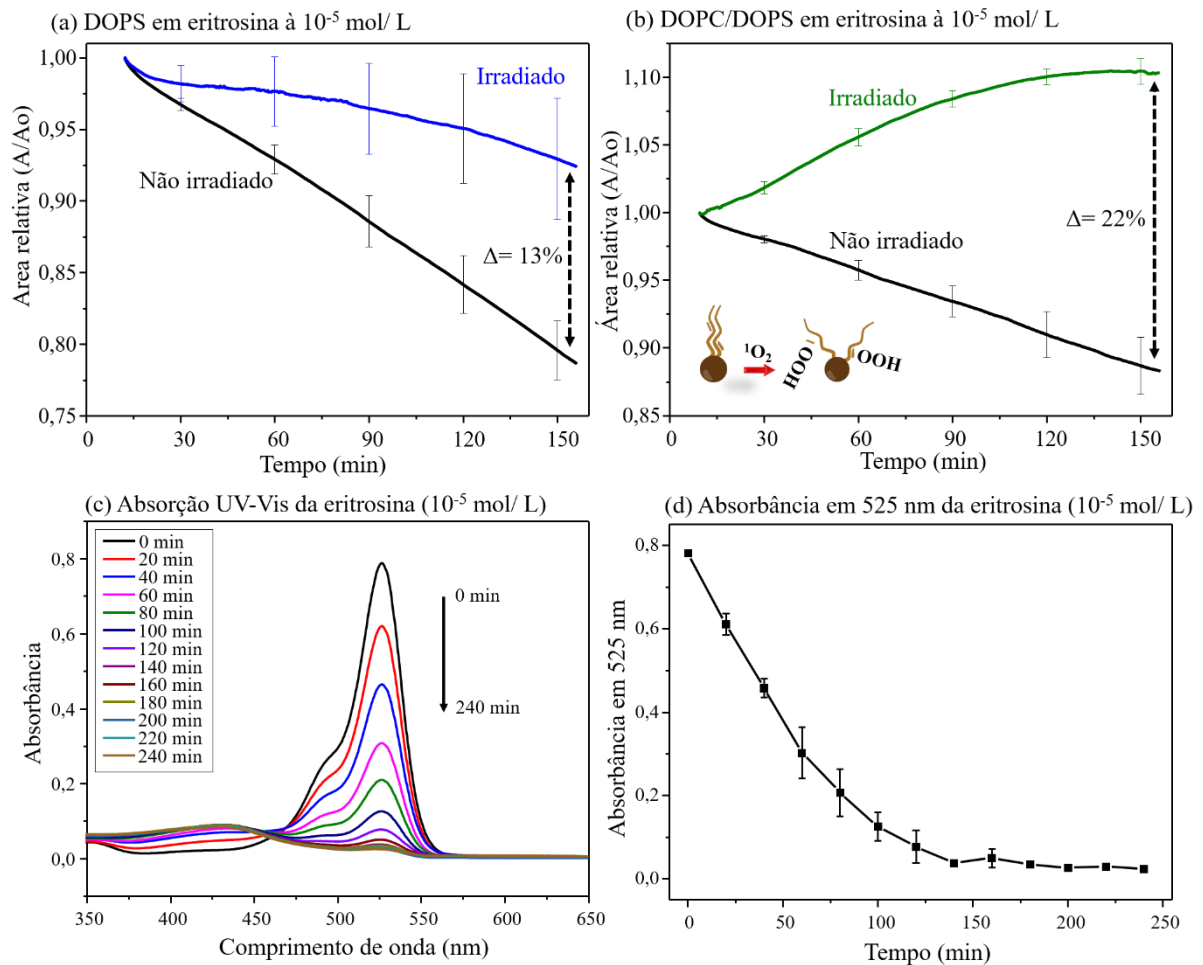


Figura 12: evolução da área superficial relativa de monocamadas de Langmuir irradiadas (530 nm) e não irradiadas de (a) DOPS e (b) DOPC/DOPS em pressão constante de 30 mN/ m e subfase de eritrosina (10^{-5} mol/ L). A_0 é a área extrapolada em 30 mN/ m. A inserção mostra o esquema da hidroperoxidação lipídica levando ao aumento da área molecular média. (c) Espectro de absorção UV-Vis para solução de eritrosina (10^{-5} mol/ L) irradiada com LED verde por 240 min e (d) absorbância em 525 nm pelo tempo para a solução de eritrosina irradiada em (c).

6.1.2. Efeitos da foto-oxidação em células HEP-2

A incorporação da eritrosina pelas células HEP-2, foi monitorada pela absorção e pela emissão do FS. Os experimentos com citometria de fluxo revelam células positivas para fluorescência da eritrosina logo nos primeiros minutos de incubação. A intensidade da fluorescência em 590 nm [47] aumenta significativamente com o aumento da concentração de eritrosina de 1,25 a 100×10^{-6} mol/ L, como mostrado na Figura 13(a) por 220 minutos de incubação. Considerando que a fluorescência apenas pode ser detectada por partículas marcadas, e não por moléculas solúveis, é provável que a eritrosina esteja incorporada nas células HEP-2. Entretanto, o menor tempo de incubação (3 h) não permite a detecção de grandes quantidades de eritrosina, como confirmado pela baixa absorção em 560 nm, ilustrado na Figura

13(b). Concentrações acima de 10×10^{-6} mol/ L aumentam as leituras da absorbância para 24 e 48 h de incubação (Figura 13(b)), sugerindo o aumento da incorporação da eritrosina.

A incorporação dependente da concentração (dose) de eritrosina em células HEP-2 pode ser mapeada por microscopias de fluorescência confocal, como mostrado nas Figuras 13(c – f), após 24 h de incubação na presença de 1,25, 10 e 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina. A membrana plasmática (verde) e o núcleo (azul) foram marcados nas células. Comparado ao controle celular (Figura 13(c)), a fluorescência da eritrosina (vermelho) é pouco observada em $1,25 \times 10^{-6}$ mol/ L (Figura 13(d)), sendo significativamente aumentada nas concentrações de 10 (Figura 13(e)) e 100×10^{-6} mol/ L (Figura 13(f)). Sabemos que a eritrosina tem afinidade por lipídeos das membranas compostas principalmente por fosfolipídeos insaturados [15]. Entretanto, é provável que a eritrosina seja progressivamente adsorvida pela membrana plasmática das células HEP-2 e internalizada, como mostrado nas Figuras 13(e) e 13(f).

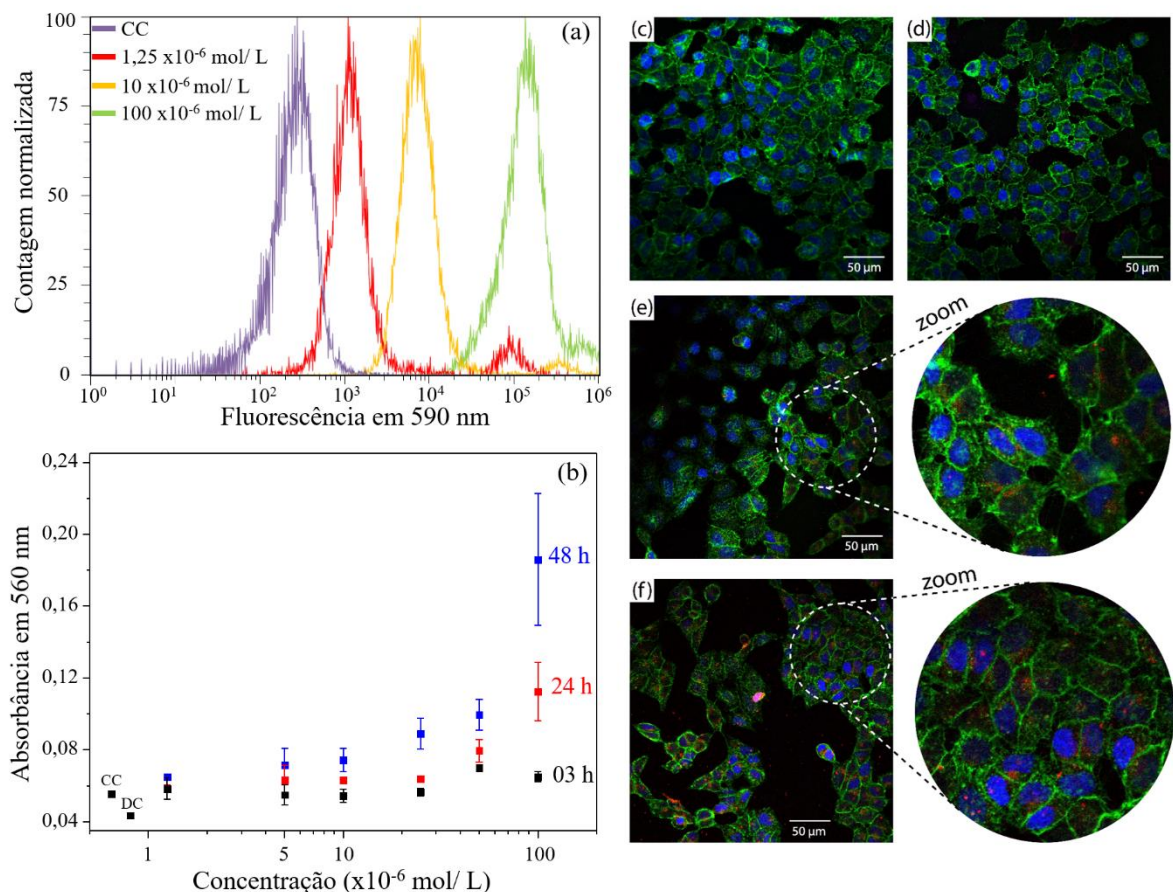


Figura 13: (a) intensidade da fluorescência em 590 nm registrada por citometria de fluxo considerando $1,25$, 10 e 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina, incubados por 220 min. (b) Absorbância em 560 nm registrado pelas diferentes concentrações (10^{-6} a 10^{-4} mol/ L) de eritrosina após 3, 24 e 48 h de incubação em células HEP-2. Microscopias de fluorescência confocal realizadas para (c) o controle celular de HEP-2 e para (d) $1,25$ (e) 10 e (f) 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina. A membrana celular (verde) foi marcada com WGA Alexa Fluor[®] 488 enquanto o núcleo (azul) com DAPI. A fluorescência da eritrosina foi registrada em 620 nm (vermelho).

A incorporação da eritrosina não mostrou uma toxicidade pronunciada no cultivo *in vitro* de células HEP-2 não irradiadas, como mostra o ensaio de MTT da Figura 14. As células continuam viáveis independentemente da concentração de eritrosina até 48 h de incubação (Figura 14(c)), quando a viabilidade diminui nas concentrações acima de 25×10^{-6} mol/ L. Por outro lado, a viabilidade celular é significativamente afetada pela irradiação, resultado do estresse oxidativo induzido pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas por estados excitados da eritrosina [15]. A viabilidade celular é reduzida para 50% (CC_{50}) quando 10, 3,75 e $1,9 \times 10^{-6}$ mol/ L de eritrosina são incubados por 3 (Figura 14(a)), 24 (Figura 14(b)) e 48 h (Figura 14(c)), respectivamente. A diminuição dos valores de CC_{50} relacionado o aumento do tempo de incubação é consistente com o aumento da incorporação da eritrosina pelas células mostrado na Figura 13. Buck *et al.* [50] também observaram baixa toxicidade da eritrosina em células HEP-2 não irradiadas. Entretanto, após fotoativação de 15 min com 19 mW/ cm^2 encontraram um valor de CC_{50} de 84×10^{-6} mol/ L em 6 h de incubação, o que é consistente com os resultados apresentados aqui, especialmente considerando que nosso período de irradiação foi quatro vezes mais longo. Embora a comparação com outros fotossensibilizadores e linhas celulares possa não ser direta, Oluwole *et al.* [118] mostrou que derivados da ftalocianina de zinco (II) não irradiado apresentam baixa toxicidade em células MCF7, com uma modesta redução de 40% de viabilidade após irradiação na maior concentração (80×10^{-6} mol/ L). Oliveira *et al.* [26] mostrou não apenas uma alta eficiência fotodinâmica com os fotossensibilizadores azul de metileno (AM) e violeta de metila (VM) em células HeLa, como também alta toxicidade com os FS não irradiados, com AM_{CC50} e VM_{CC50} de 140 e 60×10^{-6} mol/ L, respectivamente. Portanto, a baixa toxicidade e a alta fototoxicidade evidencia o potencial da eritrosina para ser aplicado como FS em TFD.

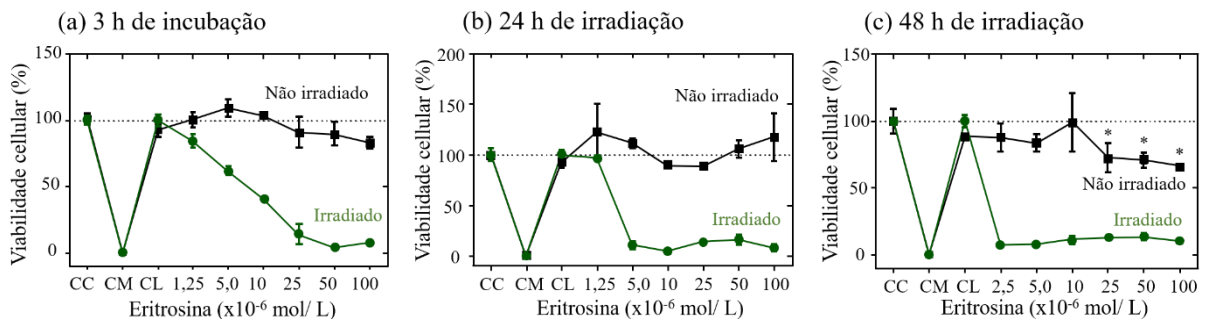


Figura 14: efeitos tóxicos (não irradiado) e fototóxicos (irradiado) da eritrosina em células HEP-2. A viabilidade celular foi mensurada através da adição do sal MTT após (a) 3, (b) 24 e (c) 48 h de incubação. CC corresponde ao controle celular, CM ao controle de morte e CL ao controle de luz.

A citometria de fluxo foi realizada a fim de investigar os processos de morte celular desencadeados pelos danos fotodinâmicos. A Figura 15 correlaciona o espalhamento da luz frontal (FSC) e lateral (SSC) para 24 (Figura 15(a)) e 48 h (Figura 15(b)) de incubação com 1,25, 10 e 100 $\times 10^{-6}$ mol/ L de eritrosina, antes e após a irradiação. A escolha dos tempos de incubação (24 e 48 h) foi baseada na alta eficiência fotodinâmica para atingir o CC_{50} ilustrado pela Figura 14. FSC proporciona informação sobre a dimensão celular enquanto o SSC indica a densidade dos grânulos, relacionado a complexidade celular [119]. O aumento na concentração de eritrosina desloca a população para maiores valores de FSC e menores de SSC, indicando um aumento no tamanho celular e diminuição na granulação, para ambos os períodos de incubação (24 e 48 h) não irradiados. Esse efeito é observado em 10 $\times 10^{-6}$ mol/ L e se torna mais pronunciado a 100 $\times 10^{-6}$ mol/ L de eritrosina, indicando um processo de apoptose tardia [120]. Células em estágios tardios de apoptose apresentam atividade mitocondrial, razão pela qual o sal de MTT é metabolizado indicando viabilidade celular para essa faixa de concentração (Figura 14(b) e 14(c)) [121–123]. A fotoativação da eritrosina diminui significativamente os valores de FSC e SSC para as concentrações de 10 e 100 $\times 10^{-6}$ mol/ L, considerando os experimentos irradiados com 24 e 48 h de incubação. Este resultado sugere o rompimento da membrana plasmática e subsequente liberação do material intracelular, caracterizando o processo necrótico de morte celular [124].

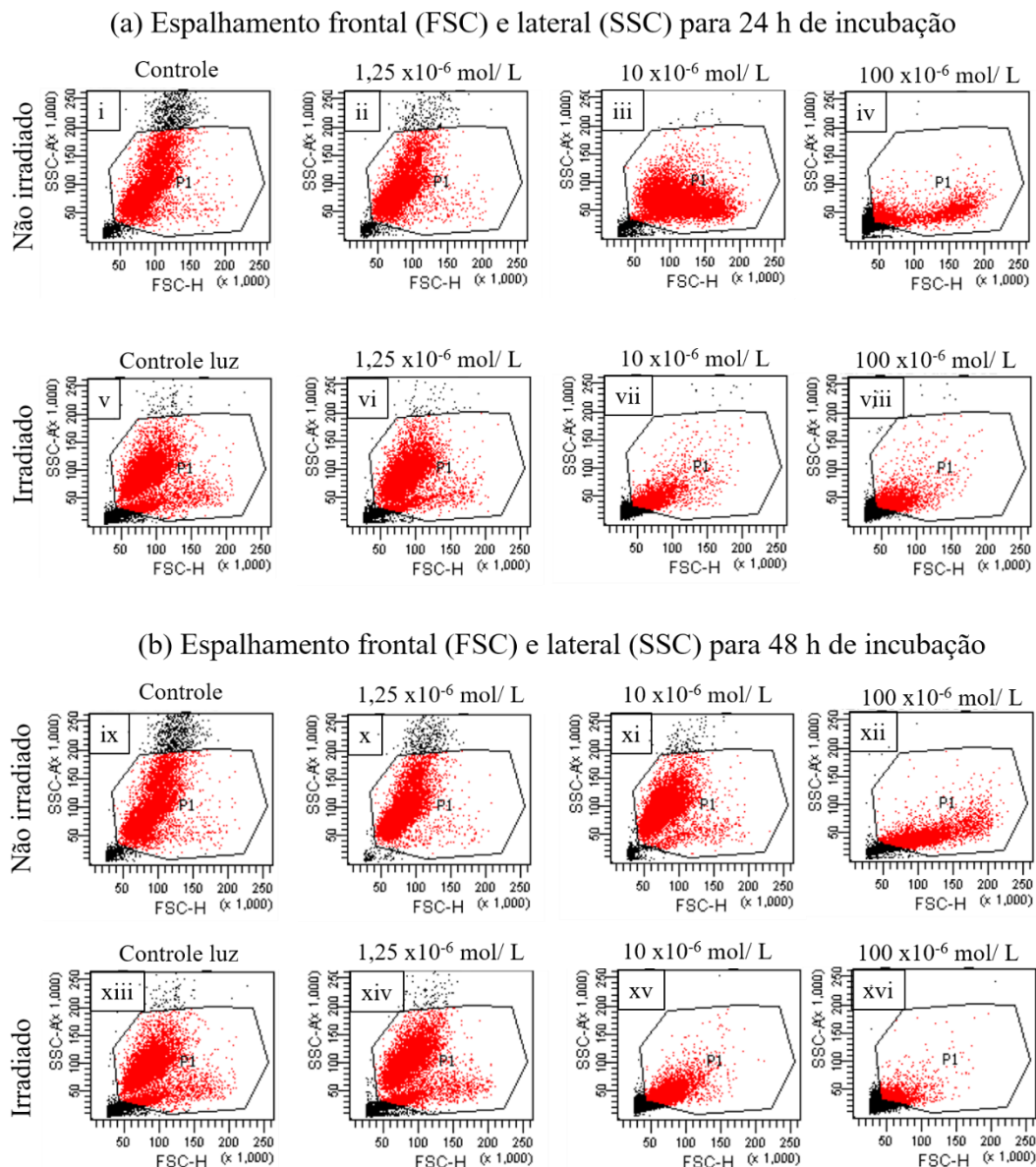


Figura 15: espalhamento de luz frontal (FSC) e lateral (SSC) registrado para (a) (i) controle celular e 24 h de incubação não irradiado de (ii) 1,25, (iii) 10 e (iv) 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina e irradiado para (v) controle de luz, (vi) 1,25, (vii) 10 e (viii) 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina. (b) (ix) Controle celular e 48 h de incubação não irradiado com (x) 1,25, (xi) 10 e (xii) 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina e irradiado para (xiii) controle de luz, (xiv) 1,25, (xv) 10 e (xvi) 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina.

A permeabilização da membrana celular durante a necrose expõe o material genético, o qual pode ser acessado pelo iodeto de propídio (PI). De maneira análoga, células apoptóticas expressam fosfatidilserinas na camada mais externa da membrana plasmática, as quais podem ser marcadas especificamente pela Anexina V [125]. A distribuição de células em apoptose ou necrose, quando incubadas com 1,25 e 10×10^{-6} mol/ L de eritrosina por 24 e 48 h, foram analisadas antes e após a irradiação. Os estágios de morte celular foram identificados como (i) células viáveis para ausência de fluorescência dos marcadores Anexina V e PI, (ii) em apoptose

para marcação fluorescente de apenas Anexina V, (iii) apoptose tardia para marcação fluorescente de ambos Anexina V e PI e (iv) necrose para marcação fluorescente de apenas PI. A porcentagem das células em cada estágio dos processos de morte é sumarizada na Figura 16. $1,25 \times 10^{-6}$ mol/L de eritrosina não irradiada (Figura 16(a)) induz apoptose em células HEp-2 devido ao aumento significativo da população em apoptose para $24,6 \pm 8,6\%$ e em apoptose tardia para $5,3 \pm 0,9\%$, depois de 24 h de incubação. Não houve mudanças significativas na população necrótica. Uma tendência similar é observada para 48 h de incubação com aumento significativo na população em apoptose para $43,4 \pm 13\%$. A fotoativação da eritrosina aumenta a população de células em necrose para $12,0 \pm 4,2$ e $29,8 \pm 3,6\%$ considerando 24 e 48 h de incubação, respectivamente. Apesar do concomitante aumento de células em apoptose tardia para $17,4 \pm 0,6$ e $7,8 \pm 0,1\%$ respectivamente em 24 e 48 h de incubação, a maioria da população permanece viável, confirmando a baixa toxicidade e fototoxicidade indicado pelos ensaios com adição de MTT (Figura 14(c) e 14(d)).

O aumento na concentração de eritrosina para 10×10^{-6} mol/L (Figura 16(b)) aumenta seu sinal de fluorescência e não é mais possível inferir quantitativamente se 24 e 48 h de incubação estão induzindo apoptose ou apoptose tardia. Espera-se, porém, que a integridade da membrana no escuro seja preservada pois não há marcação para PI, descartando necrose. A viabilidade celular é significativamente reduzida após irradiação, em que $64,7 \pm 3,8\%$ e $68,5 \pm 8,9\%$ da população está em necrose considerando 24 e 48 h de incubação, respectivamente. Isto é consistente com os resultados obtidos com eritrosina e alta dose de TFD em células epiteliais orais malignas e pré-malignas, reportados por Garg *et al.* [68]. A porcentagem de células em apoptose tardia ($33,9 \pm 3,6\%$) é apenas significativa para 24 h de incubação. Em relação a concentração de 100×10^{-6} mol/L de eritrosina, o sinal controle de fluorescência foi drasticamente aumentado (resultado não mostrado) e a análise comparativa com os marcadores celulares se tornou inviável. Entretanto, baseado nos ensaios de adição do MTT (Figura 14(c)) e espalhamento de luz (Figura 15), uma alta eficiência fotodinâmica foi observada, compatível com os resultados obtidos para 10×10^{-6} mol/L. Portanto, é provável que o processo de morte celular para concentração de 100×10^{-6} mol/L de eritrosina passe pela rota de necrose, assim como para 10×10^{-6} mol/L.

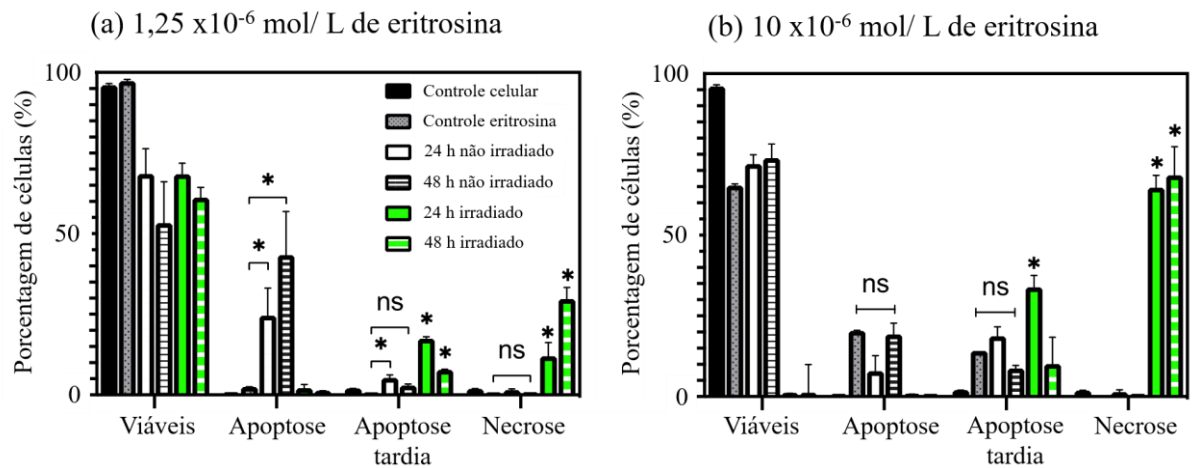


Figura 16: porcentagem de células HEP-2 em apoptose e necrose com base no ensaio de citometria de fluxo com marcação de Anexina V e iodeto de propídio (PI) registrados para (a) $1,25$ e (b) 10×10^{-6} mol/ L de eritrosina incubado por 24 e 48 h, antes e após a irradiação. A população celular foi distribuída da seguinte forma: células não marcadas indicando células viáveis, marcação para Anexina V (Alexa Fluor[®] 488) e PI indicam apoptose tardia e células marcadas com PI indicam necrose. * e ns para $p < 0,05$ e estatisticamente não relevantes, respectivamente.

6.2. Permeabilização da membrana plasmática para explicar a fototoxicidade da Eritrosina B em modelos *in vitro* de células de câncer de mama

6.2.1. Monocamadas de Langmuir como modelo de membrana celular da MCF7

6.2.1.1. Adsorção da Eritrosina B nas monocamadas de extrato lipídico da MCF7

Com o intuito de explorar a composição do extrato lipídico das células MCF7, análises com ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF - *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) foram realizadas. Os espectros de massa obtidos foram analisados pela comparação do espectro de massa da amostra de extrato lipídico com a matriz pura, considerando a intensidade de sinal na matriz dos dados brutos a fim de garantir que todos os sinais escolhidos eram referentes a massa da amostra e não de ruídos decorrentes da matriz. A Figura 17 mostra os 19 sinais de massas encontrados para o extrato. O método de caracterização foi baseado na acurácia das massas de acordo com o banco de dados LipidMaps® (<https://www.lipidmaps.org/>) [111], considerando um erro de massa máximo de 2 ppm [112,126].

Dos 19 sinais que foram identificados como lipídeos, 10 sinais correspondem a glicero-fosfolinas, 2 correspondem a diacilgliceróis, 6 a glicero-fosfoserinas e 1 sinal corresponde a glicero-fosfoetanolamina (Anexo A – Tabela A1). Entretanto, algumas moléculas correspondem a mais do que apenas um sinal, uma vez que alguns lipídeos apresentam íons protonados de sódio ou potássio (aduto). Sendo assim, há 14 lipídeos identificados: 5 tipos de glicero-fosfolinas, 7 diferentes fosfo-serinas, 1 diacilglicerol e 1 glicero-etanolamina.

Todos os lipídeos identificados na análise de espectrometria de massa do extrato lipídico da MCF7 foram também encontrados pela análise de espectrometria de massa das células cultivadas [127]. Isso nos permite afirmar que a extração dos lipídeos derivados da cultura de células MCF7 foi bem-sucedida. Conseqüentemente, os filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS) do extrato lipídico da MCF7 aqui apresentados contêm vários lipídeos de membranas celulares, permitindo uma melhor extrapolação dos resultados obtidos para comparação com os ensaios celulares *in vitro*.

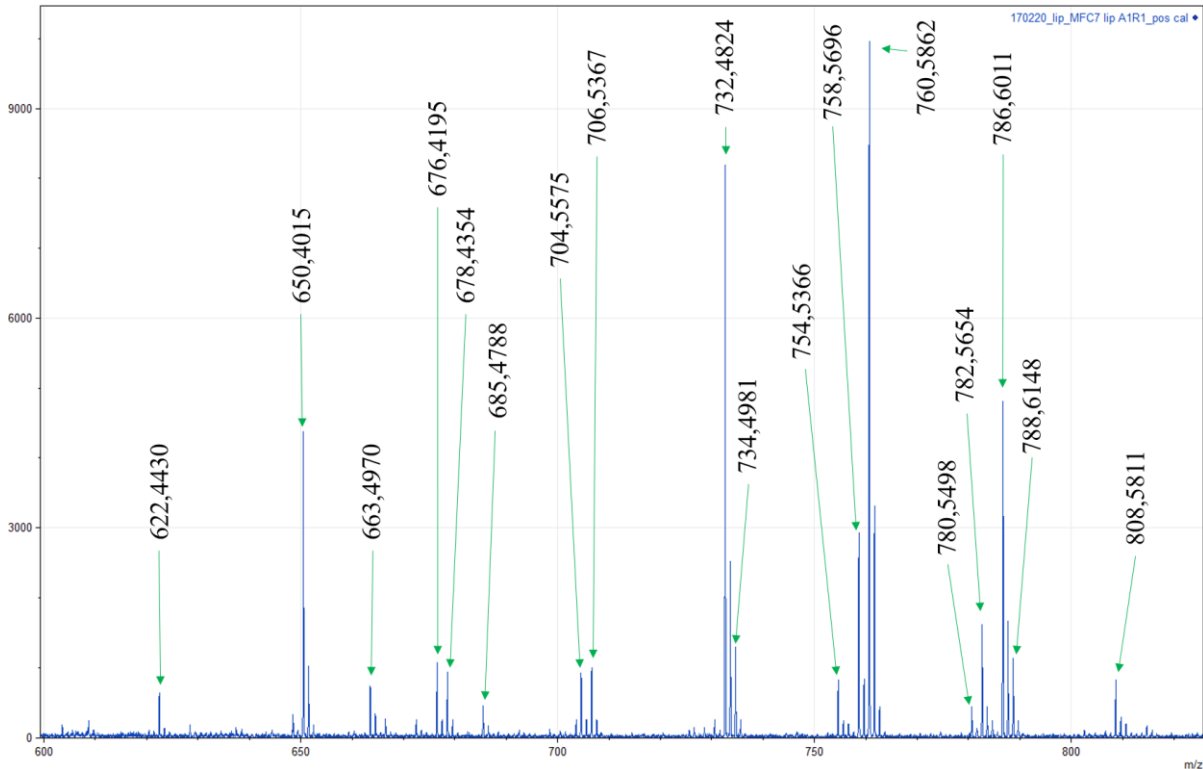


Figura 17: análise MALDI-TOF do extrato lipídico da MCF7.

A pressão superficial (π) vs área (cm^2/mL) e o módulo de compressibilidade (Cs^{-1}) do extrato lipídico da MCF7 em tampão PBS e em 10^{-5} mol/L de eritrosina em solução tampão PBS são ilustradas na Figura 18. O extrato lipídico possui atividade superficial e forma isotermas π -A com transição de fases gás-líquido bem definidas, área extrapolada de $16,6 \text{ cm}^2/\text{mL}$ em 30 mN/m e pressão de colapso em 42 mN/m . A adsorção da eritrosina nas monocamadas (Figura 18(a)) desloca a área extrapolada da isoterma para $21,4 \text{ cm}^2/\text{mL}$, correspondendo a um aumento de 29% na área relativa ($\left[\frac{A-A_0}{A_0}\right] \times 100$). A comparação com fosfolípidos [15,84] não é direta uma vez que não é possível estimar o número de moléculas que compõem as monocamadas de extrato lipídico da MCF7. Entretanto, a mesma concentração de eritrosina na subfase induz um maior aumento na área relativa do extrato lipídico da MCF7 do que em monocamadas puras de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DOPS, aproximadamente 8,6%) e na mistura de DOPC/DOPS (aproximadamente 16%). Em contraste, o aumento de aproximadamente 26% na área relativa de monocamadas puras de 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) é comparável com o extrato da MCF7 (aproximadamente 29%) [84]. Assim, possivelmente as fosfatidilcolinas (PC) podem desempenhar um papel importante no mecanismo de interação com a eritrosina.

O modo de compressibilidade (C_s^{-1}) das monocamadas ilustrado na Figura 18(b) diminui de 55 para 40 mN/m com a adsorção da eritrosina, sugerindo a habilidade de rearranjo das moléculas através da compressão lateral [128,129]. A diminuição no valor de C_s^{-1} ocorre principalmente em 30 mN/m, a qual acredita-se ser a pressão superficial correspondente nas bicamadas lipídicas das membranas celulares [130]. Esse comportamento foi relatado com diferentes tipos de drogas e tem sido associado com a sua inserção na monocamada organizada dos lipídeos [128,129,131,132]. Mudanças no C_s^{-1} das monocamadas são relevantes, uma vez que a eficiência de algumas drogas pode depender da habilidade em modificar a elasticidade da membrana, a fim de facilitar o transporte de massa ou comprometer a integridade da membrana plasmática [133].

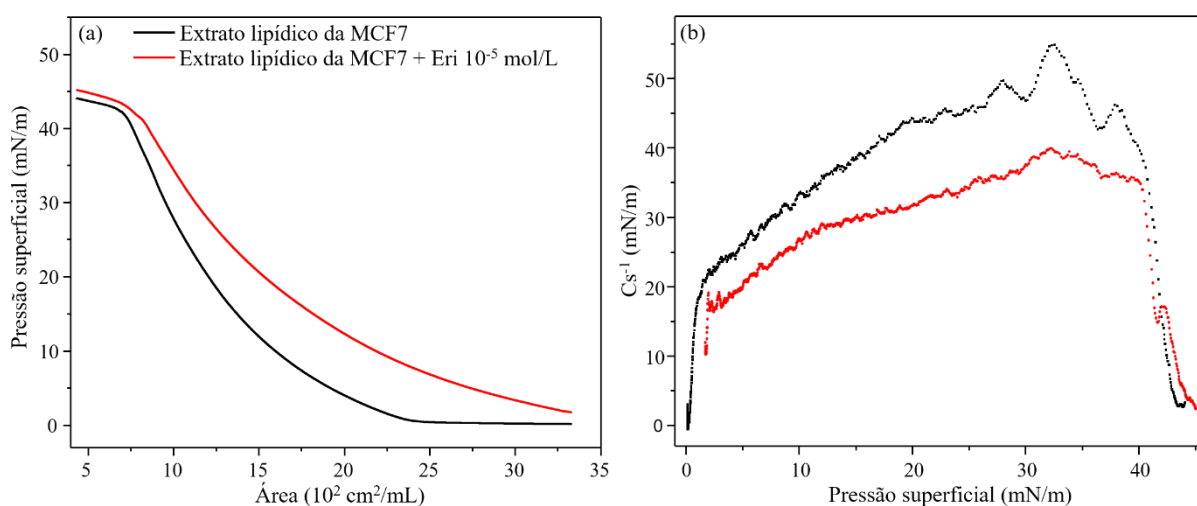


Figura 18: (a) isotermas de pressão superficial (π) vs área (A ; cm²/ mL) e (b) modo de compressibilidade (C_s^{-1} ; $C_s^{-1} = -A (d\pi/dA)$) do extrato lipídico das células MCF7 em tampão PBS e em solução de eritrosina (10⁻⁵ mol/ L).

Filmes de Langmuir-Schaefer (LS) das monocamadas de extrato lipídico da MCF7 contendo eritrosina foram construídos para determinar os mecanismos de adsorção da eritrosina por espectrometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Para isso, filmes LS do extrato lipídico da MCF7 em tampão PBS e em solução de eritrosina a 10⁻⁵ mol/ L foram transferidos para substratos sólidos com a pressão de superfície constante em 30 mN/m. A deposição dos filmes LS foi controlada por espectrometria de absorção UV-Vis de 5 a 40 camadas, como mostrado na Figura 19. O espectro de absorção do filme LS do extrato lipídico da MCF7 mostra uma banda em 196 nm (Figura 19(a)) com crescimento linear monitorado pela absorbância vs número de camadas depositadas (inserção – Figura 19(a); $R^2=0,92$), indicando que quantidades similares de material foram transferidas para o substrato em cada deposição. Uma nova banda de absorção em 545 nm (Figure 19(b)) aparece no filme LS

do extrato lipídico com eritrosina (10^{-5} mol/L), devido a adsorção das moléculas do FS. Uma comparação entre os espectros de absorção UV-Vis da solução aquosa de eritrosina (10^{-5} mol/L) e do filme LS do extrato lipídico da MCF7 com eritrosina é mostrado na Figura 19(c). A solução de eritrosina apresenta duas bandas de absorção na região do UV (em 310 e 354 nm), relacionado a transição eletrônica $n-\pi^*$ no sistema insaturado dos anéis de benzeno e naftaleno. Ademais, a banda de máximo absorção é notada em 525 nm com um ombro em 492 nm, atribuída a transição eletrônica $\pi-\pi^*$ do grupo azo, unido aos anéis fenil e naftil, referentes as formas monoméricas e diméricas, respectivamente [134–137]. No filme LS do extrato lipídico da MCF7 com eritrosina as bandas de monômero e dímero se fundem em uma banda em 546 nm. Esse resultado sugere a presença de agregados do tipo J no filme LS, com dipolos dispostos em uma geometria cabeça-cauda (*head-to-tail geometry*) [137–139]. Além disso, o valor da largura de banda a meia altura (FWHM - *full width at half maximum*) para a banda do monômero no filme LS (41,3 nm) é maior que na solução (31,1 nm), indicando a existência de agregados no filme. A absorbância monitorada em 196 nm ($R^2= 0,88$) mostrou um crescimento linear, enquanto em 545 nm ($R^2= 0,58$) a linearidade foi perdida, o que pode estar relacionado a diferenças na quantidade de eritrosina depositada por camada (inserção – Figura 19(b)).

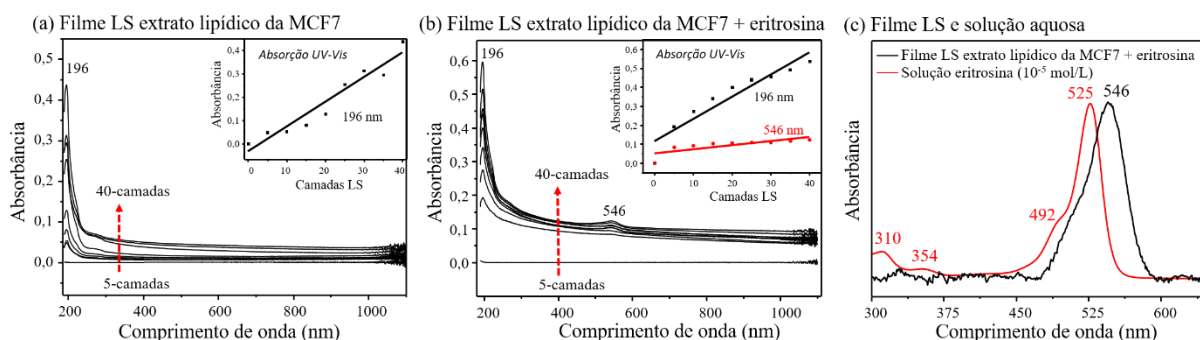


Figura 19: espectro de absorção no UV-Vis para 40 camadas LS do extrato lipídico da MCF7 em (a) tampão PBS e em (b) solução de eritrosina (10^{-5} mol/L) depositados em substrato de quartzo. A inserção mostra a absorbância num comprimento de onda fixo a cada 5 camadas de filme depositado. (c) Espectro de absorção UV-Vis da solução de eritrosina (10^{-5} mol/L) e de 40 camadas LS do extrato lipídico da MCF7 com eritrosina (10^{-5} mol/L). O espectro do filme LS foi corrigido na linha de base para se ajustar ao gráfico.

Os espectros FTIR dos filmes LS de extrato lipídico puro e em subfase de eritrosina (10^{-5} mol/L) são mostrados na Figura 20. O espectro obtido para o filme *cast* do extrato lipídico da MCF7 também é fornecido como referência de sistema não organizado. As principais atribuições dos modos vibracionais estão na Tabela 1. A porção polar (Figura 20(a)) do filme *cast* e LS do extrato lipídico possui modos vibracionais referentes a grupos carbonil, éster e fosfato. Com a estruturação do filme LS, o modo de vibração carbonil em 1740 cm^{-1} não é mais

observado, devido a reorientação do $\nu(\text{C}=\text{O})$ não hidratado [85,140–142]. Além disso, a razão da intensidade (I_s/I_{as}) entre a $\nu_s(\text{CH}_2)$ e $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ diminui de 1,20 no filme *cast* para 1,07 no filme LS, sugerindo o aumento da ordem conformacional das cadeias (Figura 20(b)) [143]. A adsorção da eritrosina aumenta o modo vibracional do $\nu(\text{C}=\text{O})$ não hidratado em 1738 cm^{-1} e a intensidade da razão (I_s/I_{as}) do $\nu_s(\text{CH}_2)$ e $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ de 1,07 para 1,21, sugerindo a reorientação dos grupos carbonil e a diminuição da ordenação das cadeias alifáticas, respectivamente. Em trabalhos anteriores [15] observamos que as interações eletrostáticas atrativas são as principais forças que permitem a adsorção da eritrosina aniônica no grupo colina catiônico das fosfatidilcolinas do DOPC e DPPC. O modo vibracional da colina não foi observado aqui devido ao aumento desproporcional dos grupos aniônicos nas membranas plasmáticas de células tumorais [144], o que é indicativo de que a adsorção da eritrosina não é apenas governada pelas interações eletrostáticas atrativas. Na verdade, interações secundárias com os grupos carbonil, resultando na reorientação e desorganização das cadeias, podem ser a origem da adsorção da eritrosina nas monocamadas, como ilustrado na Figura 20(c).

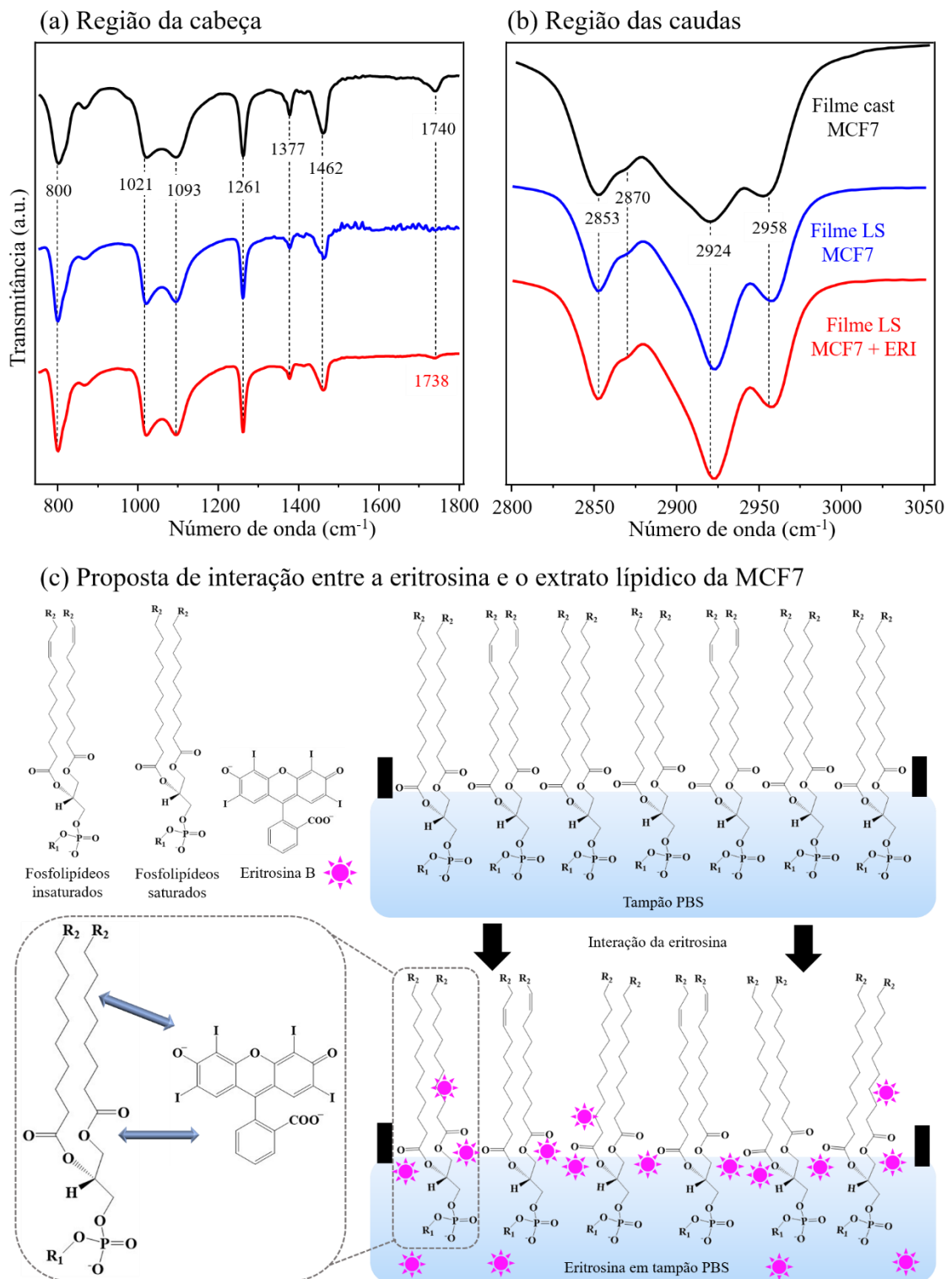


Figura 20: espectros FTIR dos filmes Langmuir-Schaefer (LS) do extrato lípidico da MCF7 (azul) e do extrato celular em subfase de eritrosina (10^{-5} mol/L; vermelho). Os filmes são compostos por 40 camadas e foram depositados em substrato de germânio. O filme *cast* do extrato lípidico da MCF7 (preto) é fornecido como referência. Os espectros FTIR estão divididos na região da (a) cabeça e das (b) caudas dos lipídeos. (c) Proposta de interação entre os lipídeos do extrato com a eritrosina considerando as mudanças nos resultados do FTIR. O esquema ilustra a interação da eritrosina principalmente com o grupo carbonil e CH_2 dos fosfolípidos. Os fosfolípidos podem ter diferentes tamanhos (R_2) e grupos polares (R_1).

Tabela 1: atribuições dos principais modos vibracionais dos filmes *cast* do extrato lipídico da MCF7 e da eritrosina, e dos filmes LS do extrato em tampão PBS e em solução de eritrosina (10^{-5} mol/ L).

Atribuições		Número de onda (cm^{-1})			
		Extrato lipídico da MCF7			Eritrosina
Ref.		Filme <i>cast</i>	PBS	Eritrosina	Filme <i>cast</i>
[145]	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ cadeias laterais de lipídeos e proteínas	2957	2958	2958	-
[145]	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ principalmente de lipídeos	2924	2924	2923	-
[145]	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ principalmente proteínas com pouca contribuição de lipídeos	2871	2870	2870	-
[145]	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ principalmente lipídeos	2853	2853	2853	-
[145]	$\nu(\text{C}=\text{O})$ ésters	1740	-	1738	-
[146]	$\nu(\text{C}=\text{C}, \text{Aromático})$	-	-	-	1607
[146]	$\delta(\text{C}-\text{C})$	-	-	-	1547
[145,147]	$\delta(\text{CH}_2)$ lipídeos	1460	1462	1462	-
[146]	$\delta(\text{O}-\text{H})$	-	-	-	1449
[148]	CH_2 de proteínas e lipídeos	1377	1377	1377	-
[146]	C-O-C (grupo éter)	-	-	-	1345
[149]	$\nu(\text{C}-\text{O})$	1260	1261	1261	-
[146]	$\nu(\text{C}-\text{O}$ grupo éster)	-	-	-	1235
[145,149]	$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ fosfolipídeos e ácidos nucleicos	1094	1093	1094	-
[149]	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{PO}_2^-)$	1020	1021	1021	-
[146]	C-I (ligação)	-	-	-	963
[150]	CH_2 <i>rocking</i>	800	800	800	-

6.2.1.2. Fotoativação da Eritrosina B

A evolução da área superficial relativa (A/A_0) irradiadas e não-irradiadas das monocamadas de extrato lipídico da MCF7 em tampão PBS e em solução de eritrosina (10^{-5} mol/ L) foram monitoradas com pressão superficial constante de 30 mN/m, como mostrado respectivamente na Figura 21(a) e 21(b). A diminuição na área superficial das monocamadas não-irradiadas sugere perda do material para a subfase devido a oxidação não controlada pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) do ambiente [151]. Modificações significantes na área superficial (valor de $p < 1\%$) não foram observadas após a irradiação da monocamada do extrato lipídico puro (Figura 21(a)), o que diverge da diferença (valor de $p < 1\%$) de ca. 3,5% medido na monocamada de extrato lipídico com eritrosina (10^{-5} mol/ L; Figura 21(b)). Ademais,

experimentos subsidiários de irradiação com monocamadas de lipídeos saturados (resultado não mostrado) contendo eritrosina, não mostraram nenhuma modificação significativa na área, revelando o papel desempenhado pelas insaturações da oxidação fotoinduzida. De fato, estados tripleto excitados da eritrosina conseguem transferir energia para o oxigênio molecular, produzindo oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), o qual podem reagir com a cadeia insaturada formando os hidroperóxidos (Figura 21(c)). A natureza hidrofílica desses grupos favorece a migração em direção as cabeças polares na interface ar/ água [15,27,39,152–154]. Embora consistente com os dados relatados anteriormente, o aumento de ca. 3,5% na área superficial é pelo menos quatro vezes menor do que o aumento induzido pela fotoativação da eritrosina em monocamadas de fosfolipídeos insaturados [15,84]. Essa diferença está relacionada com a complexidade do extrato celular, o qual possivelmente contém em sua composição não apenas proteínas, polissacarídeos e diferentes fosfolipídeos, como também um pequeno número de cadeias insaturadas, confirmada pela ausência do modo vibracional da $\nu(\text{HC}=\text{CH})$ em 3000 cm^{-1} na Figura 20(b).

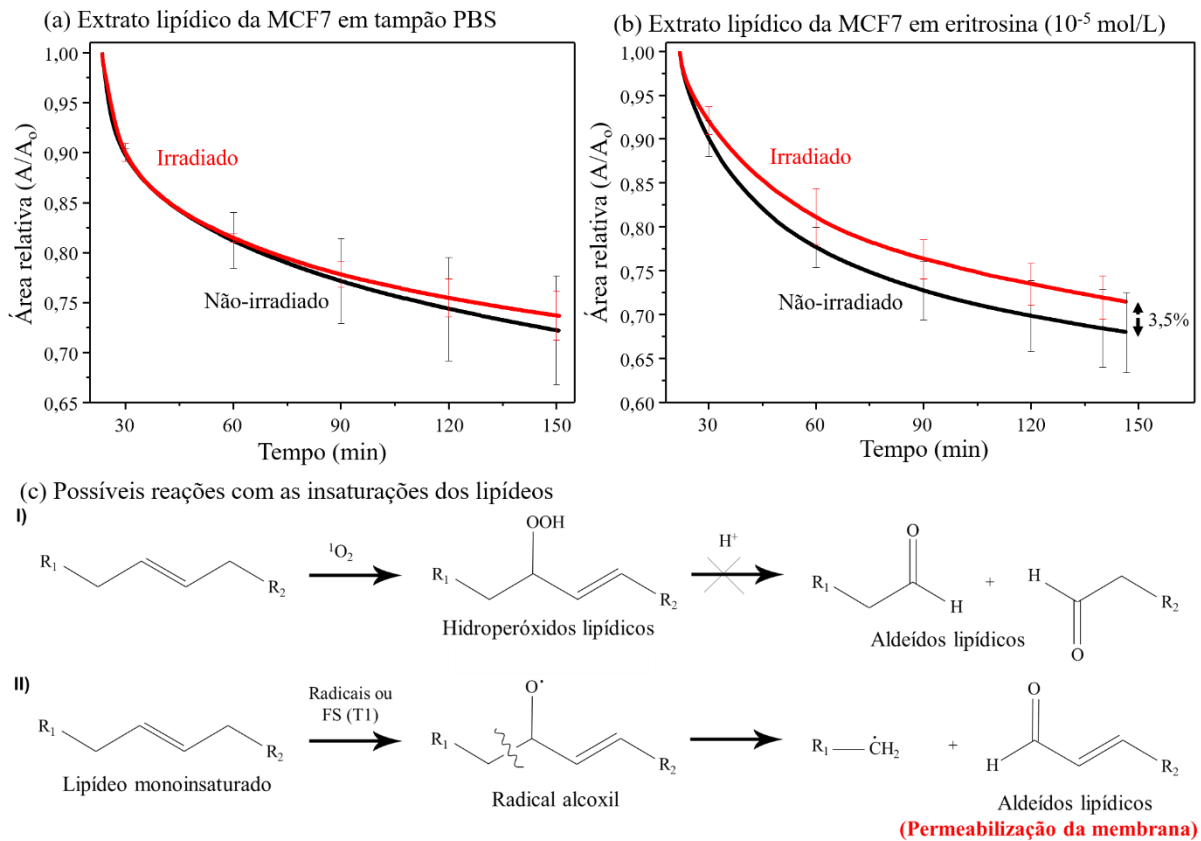


Figura 21: evolução da área relativa (A/A_0) para as monocamadas do extrato lipídico da MCF7 em (a) tampão PBS e em (b) solução de eritrosina (10^{-5} mol/L) para os filmes não-irradiado (preto) e irradiado (vermelho). A_0 é a área extrapolada nas isotermas do extrato lipídico da MCF7 em 30 mN/m. O valor de p foi calculado a partir do teste anova *one way Tukey* para checar a diferença significava entre as monocamadas irradiadas e não-irradiadas. (c) Esquema das possíveis reações que resultam em aldeídos de fosfolipídeos e permeabilização de membrana: I) clivagem de hidroperóxido e (II) cisão de radical alcoxil (Adaptado de [155]).

6.2.2. Efeitos tóxico e fototóxico da Eritrosina B em cultivo *in vitro* da MCF7

Os efeitos tóxicos e fototóxicos de diferentes concentrações da eritrosina (de 10^{-3} a 10^{-6} mol/L) incubada nas células MCF7 por 3, 24 e 48 h foram monitorados pelo ensaio com adição do sal do MTT como mostrado na Figura 22(a), 22(b) e 22(c)), respectivamente. Não foram observados efeitos tóxicos significativos até 24 h de incubação (Figura 22(a) e 22(b)), independente da concentração de eritrosina. O aumento da viabilidade acima de 100% para as concentrações acima de 50×10^{-6} mol/L, sugerem alta taxa de metabolização mitocondrial devido ao início da cascata apoptótica [121,156,157]. Uma redução significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 20% na viabilidade celular é observada em 48 h de incubação (Figura 22(c)) nas concentrações acima de 80×10^{-6} mol/L. A incorporação da eritrosina nas células pode ser visualizada pelas microscopias confocais, como ilustrado na Figura 22(d – g) para 24 h de incubação com 1,25, 10 e 100×10^{-6} mol/L de eritrosina. A membrana celular (verde) e o núcleo

(azul) das células foram marcados, enquanto a fluorescência da eritrosina foi registrada em vermelho. Quanto maior a concentração de eritrosina, maior o sinal de fluorescência detectado, sugerindo maior incorporação do fotossensibilizador. Além disso, a adsorção da eritrosina na membrana celular é provável, uma vez que ambos os sinais de fluorescência se sobrepõem, corroborando os dados das monocamadas de Langmuir (Figura 18).

A fototoxicidade desencadeada pela irradiação reduz a viabilidade celular em mais de 75% em $2,5 \times 10^{-6}$ mol/ L de eritrosina incubada por 3 e 24 h, atingindo quase 90% em 48 h de incubação. Embora a eficiência fotodinâmica de FS derivados da cercosporina [158], hipericina [159] e ftalocianina [159] ter sido explorada em células MCF7, a comparação com esses resultados não são diretas devido as diferenças no tempo de incubação e da irradiação. Como a alta taxa de mortalidade é observada em poucas horas de incubação (3 h) e baixa concentração de eritrosina ($2,5 \times 10^{-6}$ mol/ L), uma maior eficiência fotodinâmica em reduzir a viabilidade celular pode ser sugerida.

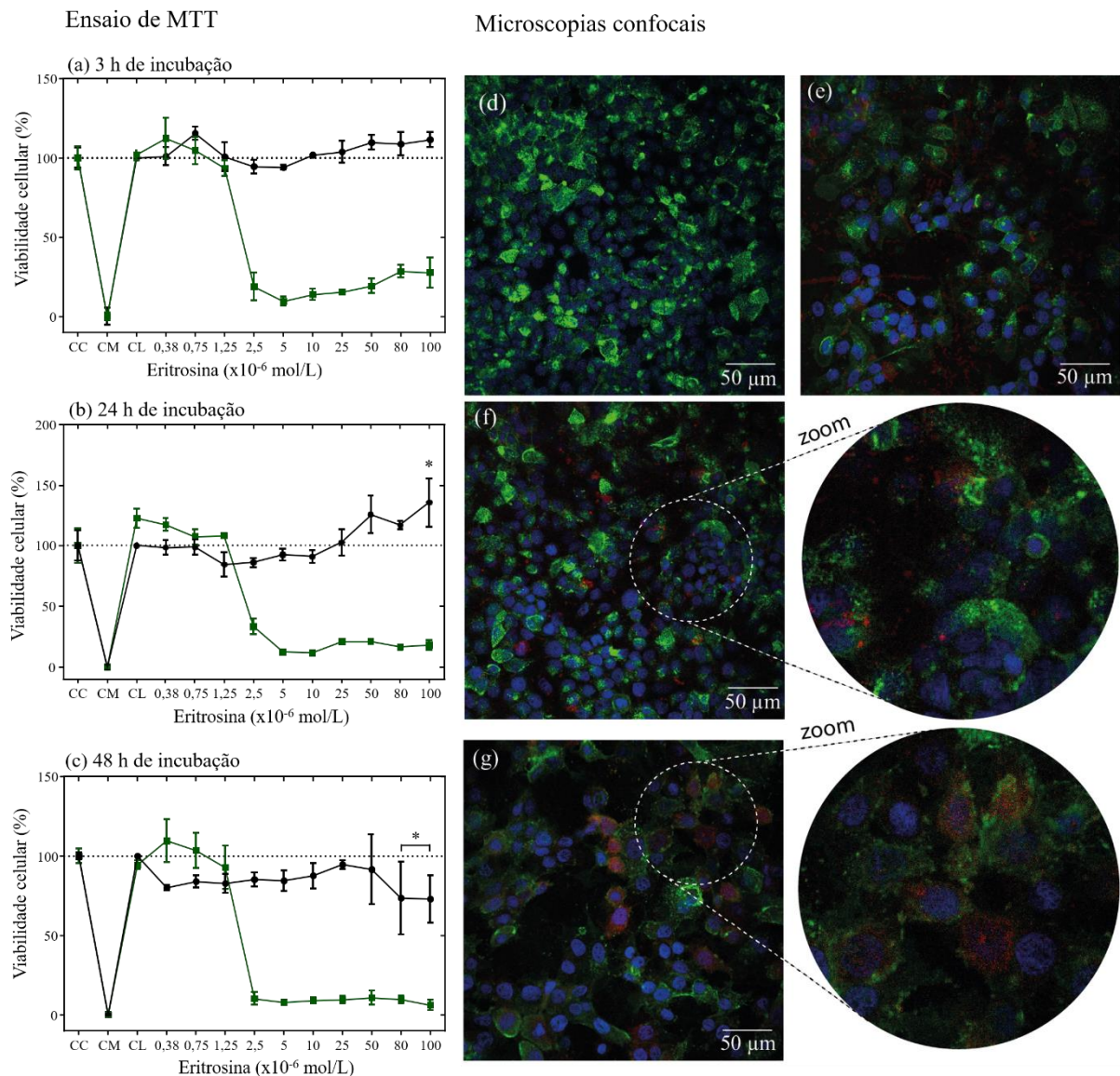


Figura 22: efeitos tóxicos (linha preta) e fototóxicos (linha verde) da eritrosina na cultura *in vitro* de células MCF7 acessado pelo ensaio de MTT. A viabilidade celular foi mensurada para células incubadas por (a) 3, (b) 24 e (c) 48 h com diferentes concentrações de eritrosina (de 10^{-3} a 10^{-6} mol/L). CC corresponde ao controle celular, CM ao controle de morte e CL ao controle de luz. Imagens de microscopias de fluorescência confocais registradas para (d) controle celular e 24 h de incubação com (e) 1,25, (f) 10 e (g) 100×10^{-6} mol/L de eritrosina. A membrana plasmática (verde) das células MCF7 foram marcadas com WGA Alexa Fluor® e o núcleo (azul) com DAPI, enquanto a fluorescência da eritrosina (vermelho) foi registrada em 620 nm.

Para determinar os mecanismos de morte celular desencadeados pelos danos fotodinâmicos nas células MCF7, a citometria de fluxo foi realizada com 3, 24 e 48 h de incubação e com 1,25, 10 e 100×10^{-6} mol/L de eritrosina. O espalhamento de luz frontal (FSC) e lateral (SSC) mostrado na Figura 23 para as culturas não-irradiadas e irradiadas fornecem informações sobre o tamanho celular e a granulometria, respectivamente [120]. Células não-irradiadas e incubadas por 3 h com 1,25, 10 e 100×10^{-6} mol/L de eritrosina foram pouco

afetadas. Independente da concentração, o aumento no tempo de incubação de 24 para 48 h direcionam a população para valores maiores de FSC e menores de SSC devido ao aumento das dimensões celulares e diminuição na granulometria, respectivamente. Esses efeitos são característicos de processo de apoptose tardia, o que pode indicar comprometimento da membrana celular, mesmo na ausência da irradiação [120,124]. Nesse estágio, a atividade mitocondrial é elevada [121,123,157], motivo pelo qual as leituras de viabilidade celular (MTT; Figura 22(b) e 22(c)) permanecem elevadas. A população celular é drasticamente reduzida após irradiação, especialmente a partir de $1,25 \times 10^{-6}$ mol/ L e 3 h de incubação. Os eventos contabilizados estão em valores mais baixos de FSC e SSC, sugerindo fragmentos celulares. Isto indica perda da permeabilidade celular devido a ruptura da membrana plasmática, o que é característico do processo necrótico de morte celular.

Espalhamento de luz frontal (FSC) e lateral (SSC)

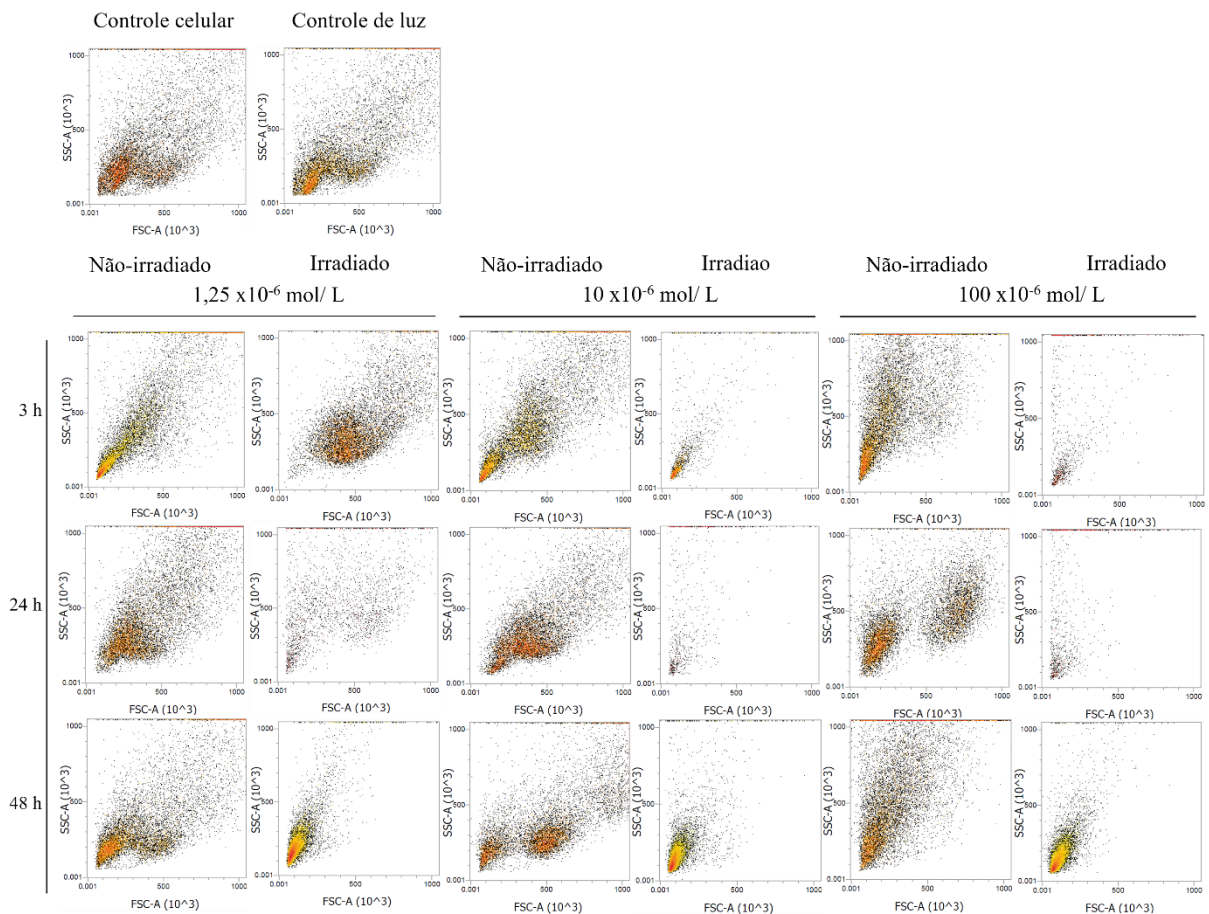


Figura 23: (a) espalhamento de luz frontal (FSC) e lateral (SSC) analisados para o controle de celular e de luz das células MCF7. Células não-irradiadas e irradiadas incubadas com 1,25, 10 e 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina por 3, 24 e 48 h.

Células em apoptose ou necrose também foram caracterizadas pelo protocolo de dupla marcação com Anexina V/ iodeto de propídio (PI), quando incubadas por 3, 24 e 48 h com 1,25

e 10×10^{-6} mol/ L de eritrosina, como mostrado na Figura 24 para células MCF7. Os resultados com 100×10^{-6} mol/ L de eritrosina foram significativamente comprometidos pela alta fluorescência e não são mostrados. Fosfatidilserinas são expressas na camada externa da membrana plasmática quando as células estão em apoptose, as quais podem ser especificamente marcadas com Anexina V. Por outro lado, o conteúdo nuclear é exposto nas células em necrose permitindo a marcação com PI [120,144]. A ausência de marcação (duplo negativo) caracteriza as células viáveis (i) enquanto o sinal de fluorescência para Anexina V indica células em apoptose (ii). Células necróticas são positivas para PI (iii) e fluorescência dupla positiva para Anexina V/ PI indicam apoptose tardia (iv) [120]. 82,98±9,31% das células não-irradiadas, incubadas por 3 h com $1,25 \times 10^{-6}$ mol/ L estão em apoptose (Figura 24(a)). A população em apoptose tardia aumenta para 35,50±11% e 53,09±23% quando o tempo de incubação aumenta para 24 e 48 h, respectivamente. Considerando a concentração de 10×10^{-6} mol/ L de eritrosina (Figura 24(b)), 78,60±1,72% da população estão em apoptose com 3 h de incubação enquanto 43,13±18% e 44,22±7,81% das células estão em apoptose tardia dentro de 24 e 48 h de incubação, respectivamente. Ademais, 7,22±3,74% das células estão em necrose com 48 h de incubação. Apesar dos valores altos dos desvios padrões, o aumento da população em apoptose e apoptose tardia com o aumento da concentração da eritrosina e do tempo de incubação é consistente com o aumento de eritrosina absorvida pelas células, sugerido pelas microscopias confocais (Figura 22(d–g)). Além disso, esse resultado corrobora com o aumento da taxa mitocondrial expressa pelo ensaio com MTT em 24 e 48 h de incubação (Figura 22(b) e 22(c)). Em resumo, mesmo apresentando viabilidade celular pelo MTT (Figura 22(a – c)), a cascata apoptótica é desencadeada a partir de 3 h de incubação com $1,25 \times 10^{-6}$ mol/ L, revelando o início da toxicidade.

A citometria de fluxo para células irradiadas (Figura 24(c) e 24(d)) exhibe principalmente o aumento da população em apoptose e apoptose tardia com o aumento da concentração e do tempo de incubação, o qual é muito similar aos resultados não-irradiados. O elevado número de células viáveis e a pequena população em necrose soa discrepante comparado a alta fototoxicidade identificado pelo ensaio de MTT, especialmente para a concentração de 10×10^{-6} mol/ L de eritrosina. Entretanto, este resultado é uma implicação direta da ruptura da membrana plasmática e da fragmentação celular sugerida pelo espalhamento de luz (Figura 23). Fragmentos celulares com dimensões micrométricas são detectadas no fluxo e é provável que apresentem marcação dupla-negativa para Anexina V/ PI, contribuindo com o aumento da população viável. Além disso, as células intactas sofreram danos fotodinâmicos muito leves, suportando o perfil apoptótico semelhante das células não-irradiadas. Portanto, considerando a

fragmentação sugerida pelo espalhamento de luz (Figura 23), a irradiação deve ter desencadeado necrose na maioria da população celular enquanto as células não fragmentadas estão em apoptose decorrentes da toxicidade da eritrosina. Resultados similares foram reportados por Wu et al. [160] na fotossensibilização de células MCF7 pelo fotossensibilizador cloridato de palmatina.

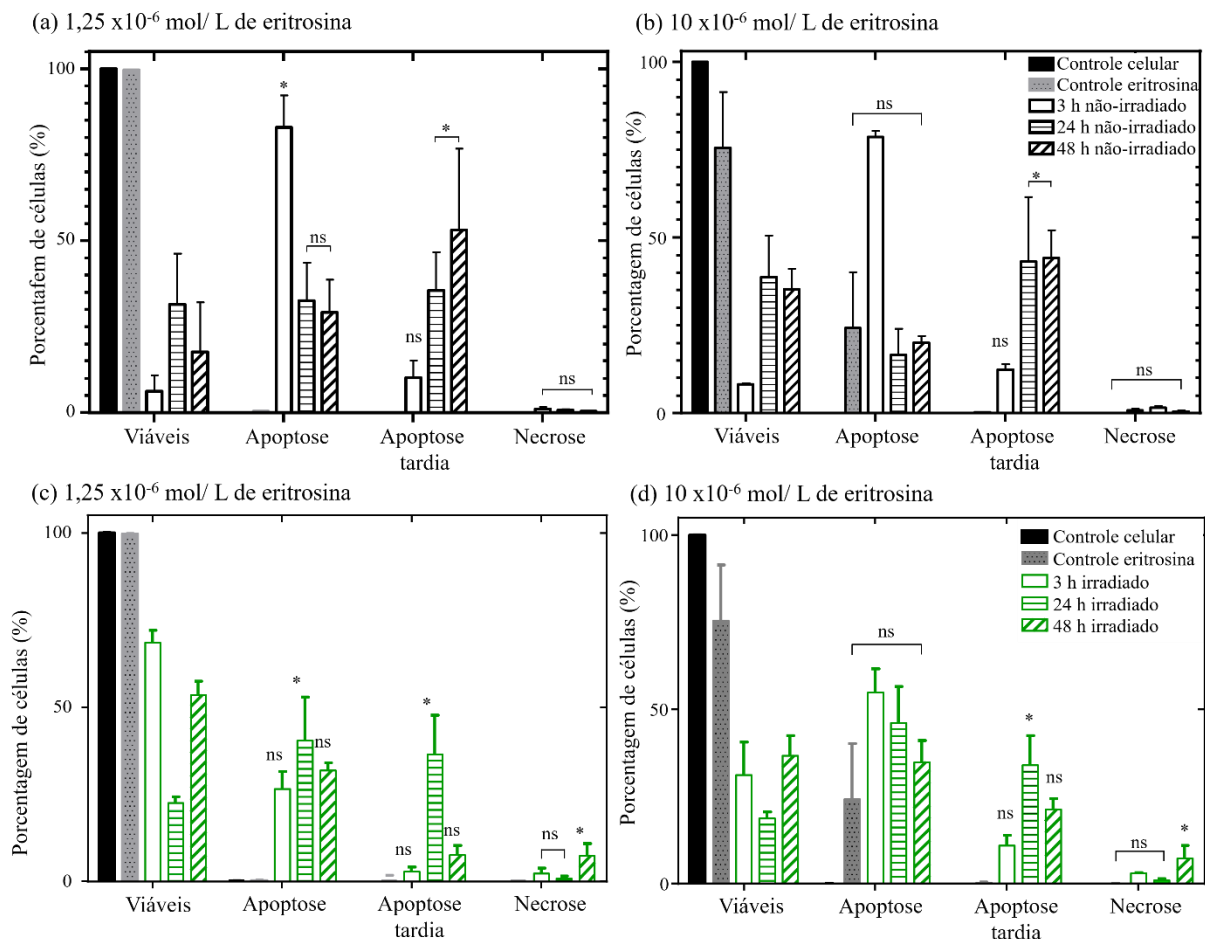


Figura 24: citometria de fluxo com marcadores para membrana plasmática (Anexina V) e núcleo (iodeto de propídio; PI) para células MCF7 com (a e c) 1,25 e (b e d) 10 x10⁻⁶ mol/ L de eritrosina incubados por 3, 24 e 48 h não-irradiados e irradiados, respectivamente. * e ns para $p < 0,05$ e estatisticamente não relevantes, respectivamente.

Com o intuito de caracterizar os produtos de oxidação gerados, a espectroscopia de massa foi realizada para células MCF7 não-irradiadas e irradiadas incubadas com 1,25, 10 e 100 x10⁻⁶ mol/ L por 24 h. Análise de componentes principais (PCAs) foram realizadas em todos os espectros de massa, revelando um padrão de agrupamento diferente entre o controle de luz e as amostras incubadas com eritrosina irradiada, como ilustrado na Figura 26(a). 25 valores de massas foram apontados como os marcadores mais relevantes no PCA para diferenciar as amostras irradiadas com eritrosina, a partir dos quais foram possíveis identificar por acurácia de massa e reação MS/MS, os 5 compostos que correspondem aos fosfolípídeos

oxidados apresentados na Tabela 2. Ademais, a análise dos dados nos permite inferir quais dos lipídeos encontrados no controle podem ser os precursores das espécies oxidadas. Alguns fosfolipídeos encontrados no controle parecem ser consumidos uma vez que o sinal de massa diminuiu significativamente, como mostrado na Figura 25. O mapa de calor na Figura 26(b) sintetiza a intensidade dos sinais dos principais íons do espectro registrado para o controle (vermelho) e para eritrosina irradiada (verde). A escala azulada refere-se a menor intensidade do sinal enquanto a avermelhada ao maior. Portanto, os lipídeos oxidados em 748 m/z (Anexo B – Figura B1) e 610 m/z (Anexo B – Figura B2) podem ser o resultado da oxidação da fosfatidilserinas em $732,4824\text{ m/z}$ [PS (14:0/18:2)]. Os fosfolipídeos oxidados em 818 m/z (Anexo B – Figura B3) e 704 m/z (Anexo B – Figura B4) podem ser o resultado da oxidação da fosfatidilcolinas em $786,6011\text{ m/z}$ [PC (20:02/16:0)] e o fosfolipídeo oxidado em 792 m/z (Anexo B – Figura B5) pode resultar da oxidação da fosfatidilcolina em $760,5862\text{ m/z}$ [PC (12:0/22:1)].

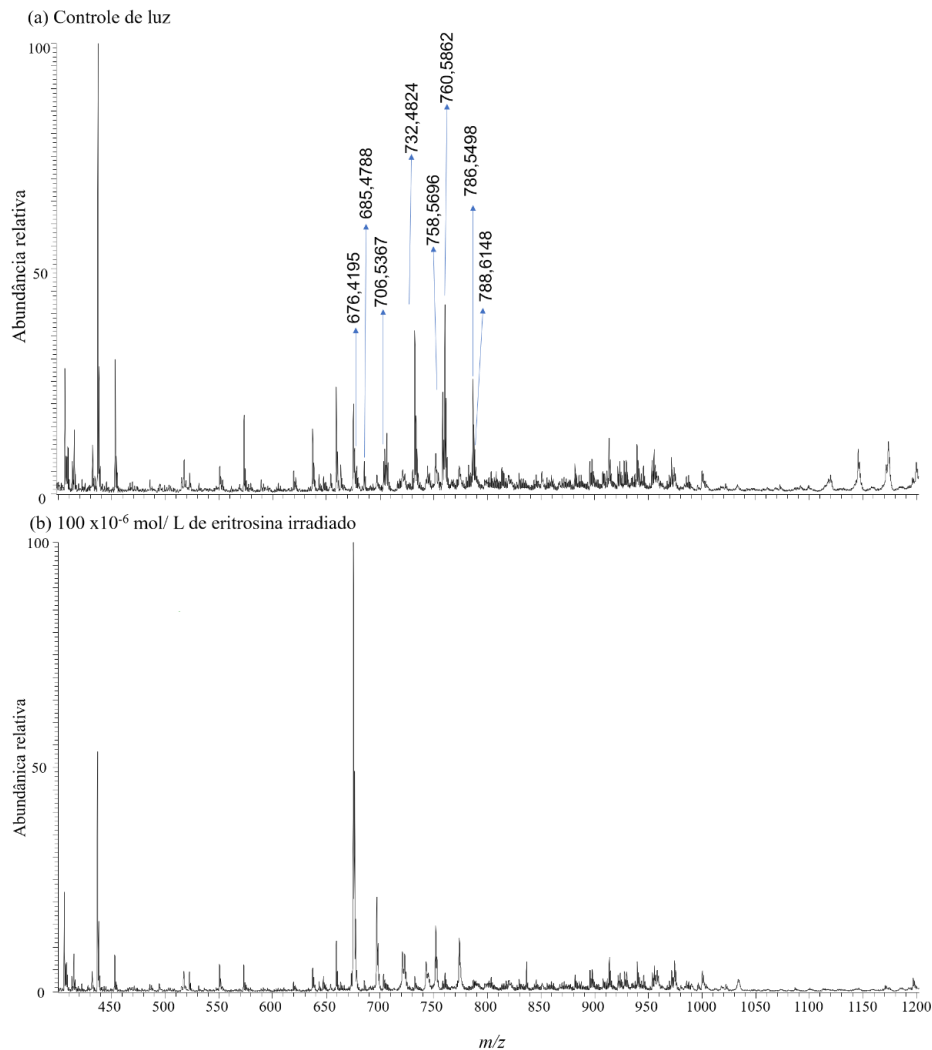


Figura 25: espectro HRMS no modo íon positivo realizado para células MCF7 (a) controle de luz e (b) irradiadas com $1,25 \times 10^{-6}$ mol/ L de eritrosina incubadas por 24 h.

(a) Análise de componentes principais (PCAs) (b) Mapa de calor

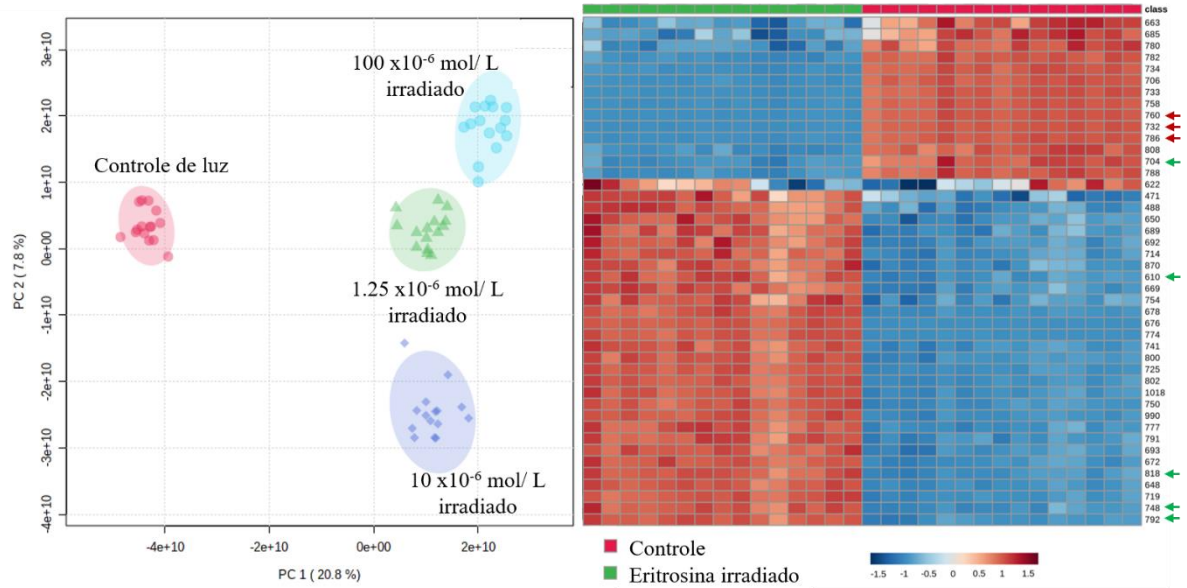


Figura 26: (a) análise de componentes principais (PCAs) realizado nos dados de espectrometria de massa gerado para células MCF7 irradiadas e incubadas com 1,25, 10 e 100 $\times 10^{-6}$ mol/ L de eritrosina por 24 h. (b) Resultado de agrupamento para os 44 principais recursos no gráfico do PCA, mostrado como um mapa de calor (distância medida pelo algoritmo Euclidiano e de agrupamento Ward), indicando as concentrações relativas de cada intensidade de sinal em cada grupo respectivo. As setas vermelhas indicam os lipídeos oxidados identificados na Tabela 2 e as setas verdes especificam os lipídeos não oxidados correspondentes.

Tabela 2: lipídeos oxidados presentes nas células expostas a eritrosina e irradiadas.

Massa de íon fosfolipídeos oxidado (m/z)	Classe	Molécula	MS/MS (m/z)	Oxidação
748	Fosfatidilserinas	PS (14:0/11-hidroxi-9,12-octadecadienoil)	716, 671, 492, 730, 701	Álcool
610	Fosfatidilserinas	PS (14:0/8-Oxo-octanoil)	283, 355, 311, 255, 564	Aldeído
818	Fosfatidilcolinas	PC (16:0/13-hidroxi-11,14-docedienoil)	786, 562, 536, 520, 800	Hidroperóxido
704	Fosfatidilcolinas	PC (16:0/13-Oxo-11-undecenoil)	611, 480, 657, 672, 686	Aldeído
792	Fosfatidilcolinas	PC (12:0/10-hidroperoxi-11-docenoil)	745, 760, 774, 536, 700	Hidroperóxido

Em resumo, considerando a adsorção da eritrosina na membrana plasmática visualizado pela microscopia confocal (Figura 22(d – g)), reações de oxidação da mesma natureza a aquelas observadas nas monocamadas (Figura 21) são provavelmente desencadeadas nas células. A propagação das reações de oxidação pode liderar a clivagem das cadeias nos sítios de insaturações, induzindo a abertura de poros na membrana lipídica [27]. Grupos hidroperóxidos podem gerar decomposição, diretamente dos produtos de $^1\text{O}_2$, resultando na clivagem de hidroperóxidos (Esquema I, Figura 21(c)). Em adição, estados tripletos excitados da eritrosina podem interagir com os lipídeos insaturados e/ ou previamente formar grupos hidroperóxidos, resultando na formação de cisão- β e aldeídos (Esquema II, Figura 21(c)) [155]. Portanto, a permeabilização celular da MCF7 pode estar sendo desencadeada pela hidroperoxidação e a subsequente abertura de poros, confirmada pela ruptura da membrana e a fragmentação celular observada na citometria de fluxo (Figuras 23 e 24).

7. Conclusão

Essa dissertação teve como objetivo avaliar a fotossensibilização de células derivadas do carcinoma de orofaringe e mamário pelo fotossensibilizador eritrosina, desde efeitos moleculares ao mecanismo de morte celular induzido em cultivo *in vitro*. Para isso, os resultados foram separados de acordo com as linhagens celulares, trazendo primeiro um conjunto de dados sobre as células derivadas do carcinoma de orofaringe (HEp-2) e em um segundo momento as células derivadas do câncer de mama (MCF7). Para avaliar a interação molecular com eritrosina, monocamadas de Langmuir forma utilizadas. Para o primeiro conjunto de dados, os filmes de Langmuir foram construídos com os fosfolipídeos DOPC, DOPS e a mistura DOPC/DOPS. Esses lipídeos mimetizam as membranas plasmáticas celulares. Já para o conjunto de dados envolvendo as células MCF7, produzimos monocamadas com fosfolipídeos proveniente das células, conferindo maior similaridade com os sistemas *in vitro*.

Especificamente, a eritrosina é adsorvida através das interações eletrostáticas com a cabeça dos lipídeos DOPC, DOPS e também na mistura DOPC/DOPS. Nas monocamadas compostas pelo extrato lipídico da MCF7, a caracterização FTIR dos filmes Langmuir-Schaefer (LS) revelaram que a adsorção da eritrosina acontece por interações secundárias que afetam a orientação do grupo carbonil e a organização das cadeias lipídicas. Sob irradiação, as monocamadas de extrato lipídico contendo eritrosina se tornam mais estáveis sugerindo um aumento geral da área superficial ocupada pelos lipídeos devido a hidroxidação. Embora consistente com resultados anteriores envolvendo as monocamadas dos fosfolipídeos insaturados DOPC e DOPS, o aumento de aproximadamente 3,5% é quatro vezes menor do que o aumento induzido pela eritrosina em monocamadas de fosfolipídeos puros e insaturados, destacando o impacto da complexidade da membrana. A interação da eritrosina com as células HEp-2 mostrou ser dependente da dose e do tempo. Embora os experimentos com adição do sal de MTT revelem toxicidade para concentrações acima de 25×10^{-6} mol/L em 48 h de incubação, a citometria de fluxo indicou que a apoptose pode ter iniciado antes, em 24 h de incubação com $1,25 \times 10^{-6}$ mol/L de eritrosina. O efeito fototóxico foi observado quando a eritrosina foi irradiada, reduzindo a viabilidade celular para 50% com concentrações de 10, 3,75 e $1,9 \times 10^{-6}$ mol/L para 3, 24 e 48 h, respectivamente. Um aumento significativo na população de células necróticas foi iniciado em $1,25 \times 10^{-6}$ mol/L de eritrosina até 10×10^{-6} mol/L, em 24 e 48 h de incubação, quando a viabilidade foi drasticamente reduzida e a maioria das células sofreu necrose. A correlação com o espalhamento de luz frontal (FSC) e lateral (SSC) reforçaram a ruptura da membrana plasmática e a perda do material intracelular. Com as células MCF7, a

incorporação da eritrosina, já em 3 h de incubação com $1,25 \times 10^{-6}$ mol/ L desencadeia a cascata apoptótica, apesar da viabilidade medida nos ensaios de MTT. Por outro lado, a irradiação também diminui significativamente a viabilidade celular em mais de 75% em $2,5 \times 10^{-6}$ mol/ L de eritrosina incubada por 3 e 24 h, chegando perto de 90% em 48 h de incubação. O espalhamento de luz frontal (FSC) e lateral (SSC) revelam a ruptura da membrana plasmática, o que é consistente com o processo de morte celular por necrose. De fato, a decomposição de hidroperóxidos possivelmente causou a permeabilização da membrana devido à clivagem das cadeias lipídicas, detectado via espectrometria de massas. Tomados em conjunto, esses resultados não apenas esclarecem os efeitos tóxicos e fototóxicos induzidos pela eritrosina, mas também revela o mecanismo subjacente de morte celular sob estresse fotodinâmico, o qual é relevante para as aplicações da terapia fotodinâmica.

Anexo A

Tabela A1: lipídeos presentes no extrato de membrana usado para montar filmes de Langmuir-Schaefer (LS). **LipidMaps*

Massa experimental	Massa teórica	Erro (ppm)	Aduto	Molécula	ID*
				PC(6:0/18:0) e/ou	LMGP01011228
622.4430	622.4442	-1.9	[M+H] ⁺	PC(14:0/10:0) e/ou	LMGP01012250
				PC(12:0/12:0) e/ou	LMGP01010429
650.4015	650.4028	-2.0	[M+H] ⁺	PS(12:0/14:1) e/ou	LMGP03010046
				PS(14:1/12:0)	LMGP03010109
				DG(18:3/22:6/0:0) e/ou	LMGL02010242
663.4970	663.4983	-2.0	[M+H] ⁺	DG(18:4/22:5/0:0) e/ou	LMGL02010520
				DG(20:4/20:5/0:0) e/ou	LMGL02010217
672.4198	672.4211	-1.9	[M+Na] ⁺	PS(12:0/14:1) e/ou	LMGP03010046
				PS(14:1/12:0)	LMGP03010109
676.4195	676.4184	1.6	[M+H] ⁺	PS(14:1/14:1)	LMGP03010919
				PS(12:0/16:1) e/ou	LMGP03010049
678.4354	678.4341	1.9	[M+H] ⁺	PS(14:0/14:1) e/ou	LMGP03010094
				PS(14:1/14:0) e/ou	LMGP03010111
				PS(16:1/12:0)	LMGP03010201
				DG(18:3/22:6/0:0) e/ou	LMGL02010242
685.4788	685.4802	-2.0	[M+Na] ⁺	DG(18:4/22:5/0:0) e/ou	LMGL02010520
				DG(20:4/20:5/0:0) e/ou	LMGL02010217
				PS(12:0/18:2) e/ou	LMGP03010053
704.5575	704.5589	-2.0	[M+H] ⁺	PS(14:1/16:1) e/ou	LMGP03010115
				PS(16:1/14:1) e/ou	LMGP03010204
				PS(18:2/12:0) e/ou	LMGP03010340
				PS(14:1/16:0) e/ou	LMGP03010114
706.5367	706.5381	-2.0	[M+H] ⁺	PS(16:0/14:1) e/ou	LMGP03010193
				PS(16:1/14:0) e/ou	LMGP03010203
				PS(18:1/12:0)	LMGP03010322
732.4824	732.4810	1.9	[M+H] ⁺	PS(12:0/20:2) e/ou	LMGP03010060
				PS(14:1/18:1) e/ou	LMGP03010120

				PS(18:1/14:1) e/ou	LMGP03010324
				PS(18:2/14:0) e/ou	LMGP03010342
				PS(20:2/12:0) e/ou	LMGP03010558
				PS(14:0/18:2) e/ou	LMGP03010927
				PS(16:1/16:1)	LMGP03010964
				PS(12:0/20:1) e/ou	LMGP03010059
				PS(14:1/18:0) e/ou	LMGP03010119
				PS(16:1/16:0) e/ou	LMGP03010207
734.4981	734.4967	1.9	[M+H] ⁺	PS(18:0/14:1) e/ou	LMGP03010309
				PS(20:1/12:0) e/ou	LMGP03010528
				PS(18:1/14:0) e/ou	LMGP03010882
				PS(16:0/16:1)	LMGP03010909
				PE(16:0/18:2) e/ou	LMGP02010042
				PE(22:2/12:0) e/ou	LMGP02011071
				PE(12:0/22:2) e/ou	LMGP02010379
				PE(20:2/14:0) e/ou	LMGP02010873
754.5366	754.5381	-2.0	[M+K] ⁺	PE(20:1/14:1) e/ou	LMGP02010844
				PE(18:2/16:0) e/ou	LMGP02011194
				PE(18:1/16:1) e/ou	LMGP02011198
				PE(16:1/18:1) e/ou	LMGP02011220
				PE(14:1/20:1) e/ou	LMGP02010441
				PE(14:0/20:2)	LMGP02010416
				PC(22:2/12:0) e/ou	LMGP01012035
				PC(12:0/22:2) e/ou	LMGP01011336
				PC(16:0/18:2) e/ou	LMGP01010585
				PC(16:1/18:1) e/ou	LMGP01010688
758.5696	758.5694	0.3	[M+H] ⁺	PC(18:0/16:2) e/ou	LMGP01010745
				PC(18:1/16:1) e/ou	LMGP01010887
				PC(18:2/16:0) e/ou	LMGP01010920
				PC(20:1/14:1) e/ou	LMGP01011808
				PC(20:2/14:0) e/ou	LMGP01011837
				PC(14:1/20:1) e/ou	LMGP01011398

				PC(14:0/20:2)	LMGP01011373
				PC(16:0/18:1) e/ou	LMGP01010005
				PC(22:1/12:0) e/ou	LMGP01012004
				PC(12:0/22:1) e/ou	LMGP01011335
				PC(18:1/16:0) e/ou	LMGP01010884
760.5862	760.5851	1.4	[M+H] ⁺	PC(16:1/18:0) e/ou	LMGP01011483
				PC(14:0/20:1) e/ou	LMGP01011372
				PC(14:1/20:0) e/ou	LMGP01011397
				PC(18:0/16:1) e/ou	LMGP01010744
				PC(20:0/14:1) e/ou	LMGP01011787
				PC(20:1/14:0)	LMGP01011807
				PC(22:2/12:0) e/ou	LMGP01012035
				PC(12:0/22:2) e/ou	LMGP01011336
				PC(16:0/18:2) e/ou	LMGP01010585
				PC(16:1/18:1) e/ou	LMGP01010688
				PC(18:0/16:2) e/ou	LMGP01010745
780.5498	780.5514	-2.0	[M+Na] ⁺	PC(18:1/16:1) e/ou	LMGP01010887
				PC(18:2/16:0) e/ou	LMGP01010920
				PC(20:1/14:1) e/ou	LMGP01011808
				PC(20:2/14:0) e/ou	LMGP01011837
				PC(14:1/20:1) e/ou	LMGP01011398
				PC(14:0/20:2)	LMGP01011373
				PC(16:0/18:1) e/ou	LMGP01010005
				PC(22:1/12:0) e/ou	LMGP01012004
				PC(12:0/22:1) e/ou	LMGP01011335
				PC(18:1/16:0) e/ou	LMGP01010884
782.5654	782.5670	-2.0	[M+Na] ⁺	PC(16:1/18:0) e/ou	LMGP01011483
				PC(14:0/20:1) e/ou	LMGP01011372
				PC(14:1/20:0) e/ou	LMGP01011397
				PC(18:0/16:1) e/ou	LMGP01010744
				PC(20:0/14:1) e/ou	LMGP01011787
				PC(20:1/14:0)	LMGP01011807

				PC(18:1/18:1) e/ou	LMGP01010836
				PC(18:2/18:0) e/ou	LMGP01010935
				PC(22:1/14:1) e/ou	LMGP01012007
				PC(14:1/22:1) e/ou	LMGP01012133
				PC(16:0/20:2) e/ou	LMGP01011469
786.6011	786.6007	0.5	[M+H] ⁺	PC(18:0/18:2) e/ou	LMGP01010766
				PC(16:1/20:1) e/ou	LMGP01011489
				PC(20:2/16:0) e/ou	LMGP01011841
				PC(14:0/22:2) e/ou	LMGP01011377
				PC(20:1/16:1) e/ou	LMGP01011812
				PC(22:2/14:0)	LMGP01012037
				PC(16:0/20:1) e/ou	LMGP01011468
				PC(14:0/22:1) e/ou	LMGP01012129
				PC(22:1/14:0) e/ou	LMGP01012218
				PC(18:0/18:1) e/ou	LMGP01010753
788.6148	788.6164	-2.0	[M+H] ⁺	PC(18:1/18:0) e/ou	LMGP01010840
				PC(20:1/16:0) e/ou	LMGP01011811
				PC(22:0/14:1) e/ou	LMGP01011980
				PC(20:0/16:1) e/ou	LMGP01011790
				PC(14:1/22:0) e/ou	LMGP01011404
				PC(16:1/20:0)	LMGP01011488
				PC(18:1/18:1) e/ou	LMGP01010836
				PC(18:2/18:0) e/ou	LMGP01010935
				PC(22:1/14:1) e/ou	LMGP01012007
				PC(14:1/22:1) e/ou	LMGP01012133
				PC(16:0/20:2) e/ou	LMGP01011469
808.5811	808.5827	-2.0	[M+Na] ⁺	PC(18:0/18:2) e/ou	LMGP01010766
				PC(16:1/20:1) e/ou	LMGP01011489
				PC(20:2/16:0) e/ou	LMGP01011841
				PC(14:0/22:2) e/ou	LMGP01011377
				PC(20:1/16:1) e/ou	LMGP01011812
				PC(22:2/14:0)	LMGP01012037

Anexo B

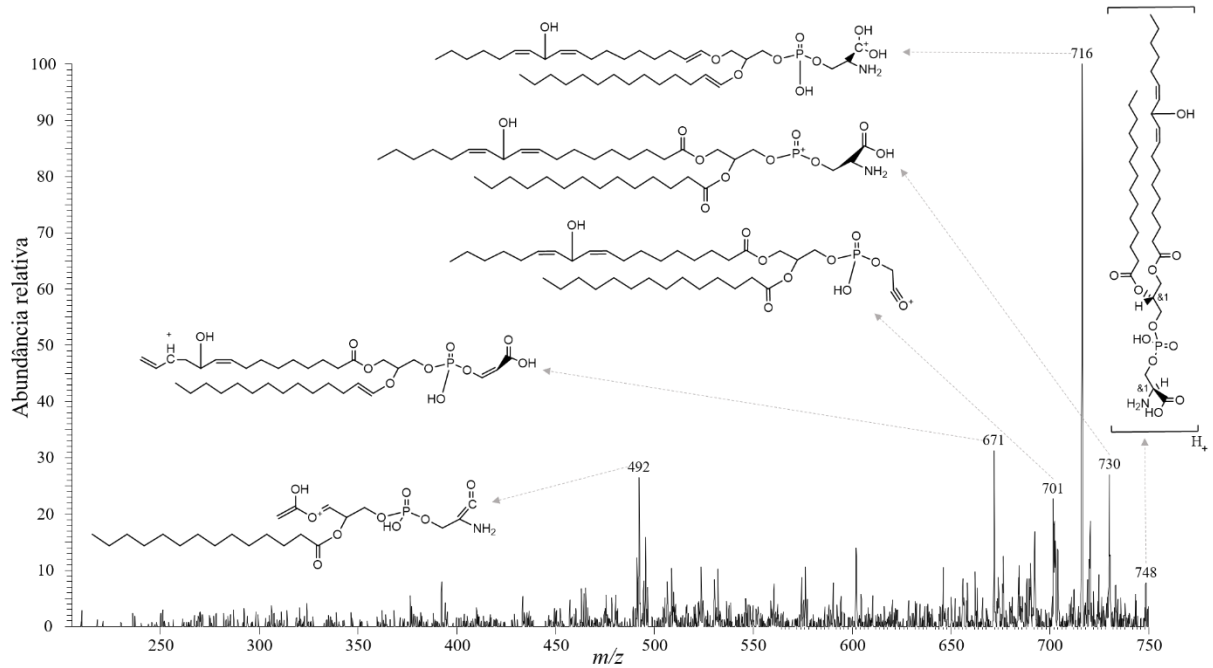


Figura B1: espectro MS/MS de 748 m/z para espécies de lipídeos oxidados presentes nas células MCF7 após irradiação com eritrosina.

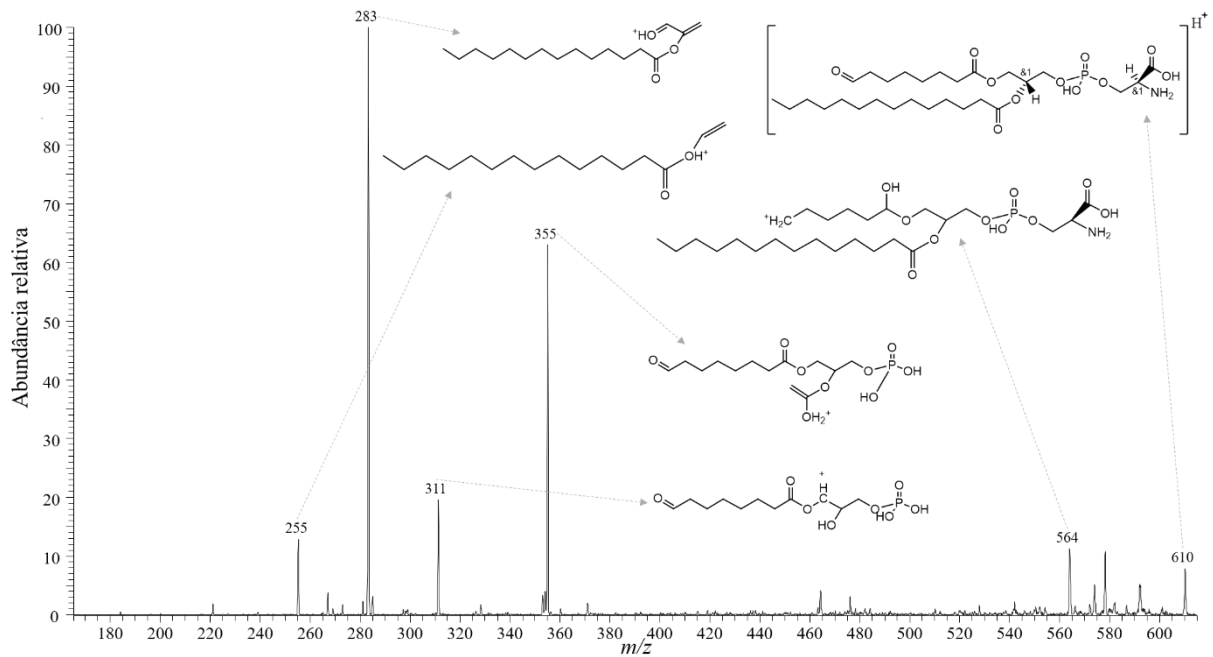


Figura B2: espectro MS/MS de 610 m/z para espécies de lipídeos oxidados presentes nas células MCF7 após irradiação com eritrosina.

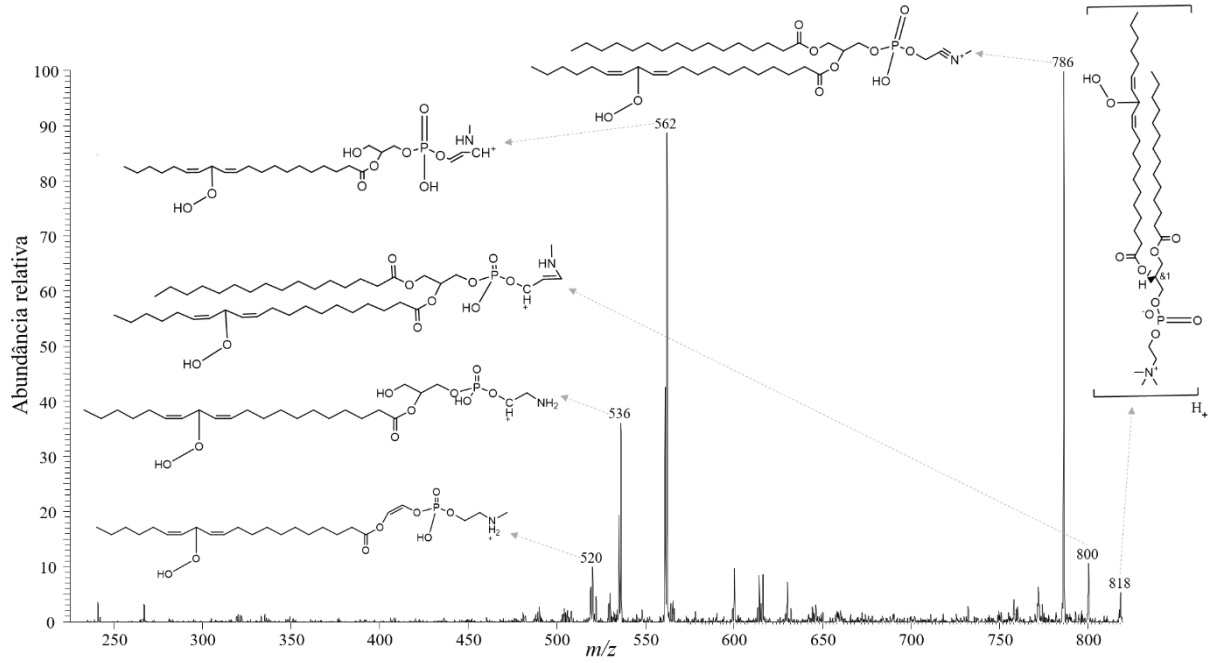


Figura B3: espectro MS/MS de 818 m/z para espécies de lipídeos oxidados presentes nas células MCF7 após irradiação com eritrosina.

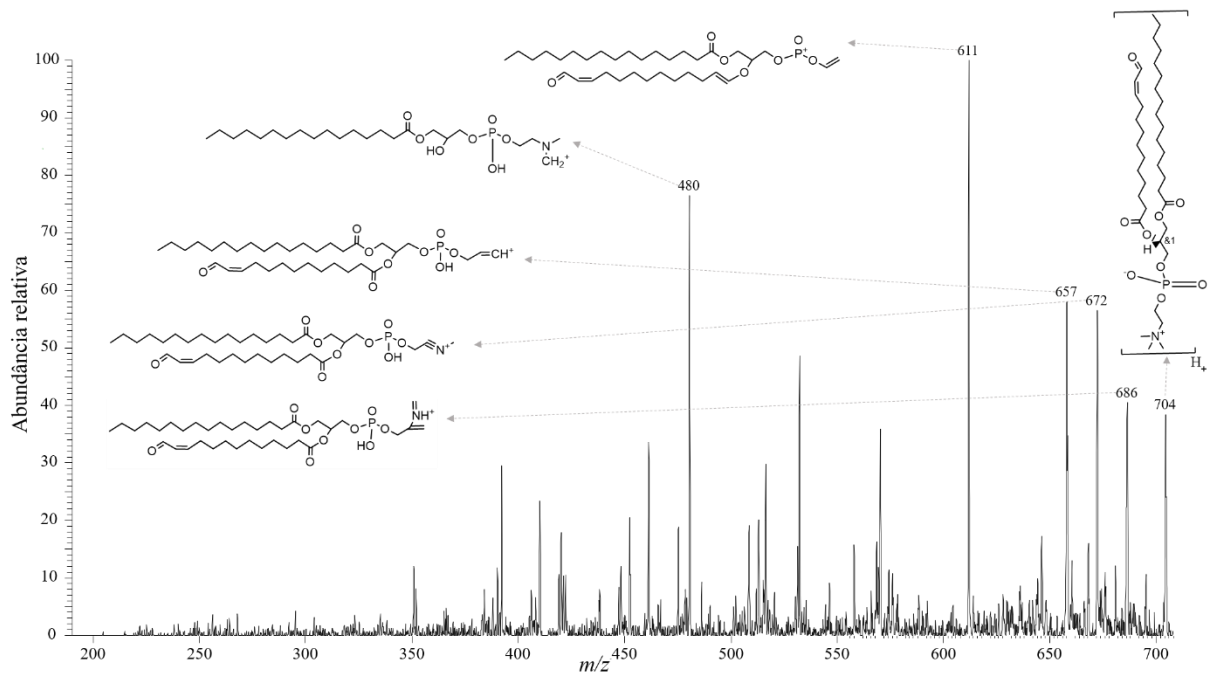


Figura B4: espectro MS/MS de 704 m/z para espécies de lipídeos oxidados presentes nas células MCF7 após irradiação com eritrosina.



Figura B5: espectro MS/MS de 792 m/z para espécies de lipídeos oxidados presentes nas células MCF7 após irradiação com eritrosina.

Referências

- [1] E.P. Fonseca, S.G.O. Fonseca, C.S. Milagres, A.G. Lopes, Mortalidade por câncer bucal e orofaringe no Brasil entre 2002 e 2011, *Rev. Da Fac. Ciências Gerenciais Manhuaçu*. 11 (2014) 10.
- [2] M.R. Guerra, C.V.M. Gallo, G. Azevedo, S. Mendonça, Riscos de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos, *Rev. Bras. Cancerol.* 51 (2005) 227–234.
- [3] M.M. de Oliveira, D.C. Malta, H. Guauche, L. de Moura, G.A. e Silva, Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: dados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013, *Rev. Bras. Epidemiol.* 18 (2015) 146–157. doi:10.1590/1980-5497201500060013.
- [4] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Siegel, L. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries., *CA A J. Clin.* 00 (2018) 1–31. doi:10.3322/caac.21492.
- [5] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA. Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209–249. doi:10.3322/caac.21660.
- [6] M.S.C. dos Santos, Entrega de fotozensibilizadores mediada por nanofolhas de óxido de grafeno para terapias fotodinâmica e fototérmica combinadas no tratamento de carcinoma mamário in vitro e in vivo, Universidade de Brasília, 2017.
- [7] H. Falconer, L. Yin, H. Grönberg, D. Altman, Ovarian Cancer Risk After Salpingectomy: A Nationwide Population-Based Study, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 107 (2015) dju410–dju410. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/dju410>.
- [8] J. Li, J. Liu, C. Chen, Remote Control and Modulation of Cellular Events by Plasmonic Gold Nanoparticles: Implications and Opportunities for Biomedical Applications, *ACS Nano.* 11 (2017) 2403–2409. doi:10.1021/acsnano.7b01200.
- [9] S.B. Devarakonda, M.R. Myers, M. Lanier, C. Dumoulin, R.K. Banerjee, Assessment of Gold Nanoparticle-Mediated-Enhanced Hyperthermia Using MR-Guided High-Intensity Focused Ultrasound Ablation Procedure, *Nano Lett.* 17 (2017) 2532–2538. doi:10.1021/acs.nanolett.7b00272.
- [10] R. Roelandts, The history of phototherapy: Something new under the sun?, *J. Am. Acad. Dermatol.* 46 (2002) 926–930. doi:https://doi.org/10.1067/mjd.2002.121354.
- [11] H.J. Vreman, R.J. Wong, D.K. Stevenson, Phototherapy: Current methods and future directions, *Semin. Perinatol.* 28 (2004) 326–333. doi:https://doi.org/10.1053/j.semperi.2004.09.003.
- [12] D. de Melo-Diogo, C. Pais-Silva, D.R. Dias, A.F. Moreira, I.J. Correia, Strategies to Improve Cancer Photothermal Therapy Mediated by Nanomaterials, *Adv. Healthc. Mater.* 6 (2017) 1–20. doi:10.1002/adhm.201700073.
- [13] M. Mocna, Hyperthermia in Oncology, *AIP Conf. Proc.* 958 (2007) 256–257. doi:10.1063/1.2825805.
- [14] N.S. Abadeer, C.J. Murphy, Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C.* 120 (2016) 4691–4716. doi:10.1021/acs.jpcc.5b11232.
- [15] P.H.B. Aoki, L.F.C. Morato, F.J. Pavinatto, T.M. Nobre, C.J.L. Constantino, O.N. Oliveira, Molecular-Level Modifications Induced by Photo-Oxidation of Lipid

- Monolayers Interacting with Erythrosin, *Langmuir*. 32 (2016) 3766–3773. doi:10.1021/acs.langmuir.6b00693.
- [16] A. V Reshetnickov, G. V Ponomarev, O.Y. Abakumova, T.A. Tsvetkova, A. V Karmenyan, A.G. Rebeko, R.P. Baum, Novel drug form of chlorin E6, *Opt. Methods Tumor Treat. Detect. Mech. Tech. Photodyn. Ther.* IX. 3909 (2000) 124–130. <https://doi.org/10.1117/12.379889>.
- [17] O. Penon, M.J. Marín, D.A. Russell, L. Pérez-García, Water soluble, multifunctional antibody-porphyrin gold nanoparticles for targeted photodynamic therapy, *J. Colloid Interface Sci.* 496 (2017) 100–110. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.02.006>.
- [18] S.-H. Chen, W.-W. Huang, K. Dehvari, Y.-C. Ling, A. V Ghule, S.-L. Tsai, J.-Y. Chang, Photosensitizer–conjugated Cu-In-S heterostructured nanorods for cancer targeted photothermal/photodynamic synergistic therapy, *Mater. Sci. Eng. C*. 97 (2019) 793–802. doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.107>.
- [19] M. Li, Y. Wang, H. Lin, F. Qu, Hollow CuS nanocube as nanocarrier for synergetic chemo/photothermal/photodynamic therapy, *Mater. Sci. Eng. C*. 96 (2019) 591–598. doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.020>.
- [20] N. Wang, Z. Zhao, Y. Lv, H. Fan, H. Bai, H. Meng, Y. Long, T. Fu, X. Zhang, W. Tan, Gold nanorod-photosensitizer conjugate with extracellular pH-driven tumor targeting ability for photothermal/photodynamic therapy, *Nano Res.* 7 (2014) 1291–1301. doi:10.1007/s12274-014-0493-0.
- [21] J. Song, Y. Wei, Q. Chen, D. Xing, Cyclooxygenase 2-mediated apoptotic and inflammatory responses in photodynamic therapy treated breast adenocarcinoma cells and xenografts, *J. Photochem. Photobiol. B*. 134 (2014) 27–36. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.03.015.
- [22] D.E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer*. 3 (2003) 380. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1071>.
- [23] T. Reynolds, Photodynamic therapy expands its horizons., *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (1997) 112–114. doi:10.1093/jnci/89.2.112.
- [24] T. Dai, B.B. Fuchs, J.J. Coleman, R.A. Prates, C. Astrakas, T.G. St. Denis, M.S. Ribeiro, E. Mylonakis, M.R. Hamblin, G.P. Tegos, Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform, *Front. Microbiol.* 3 (2012) 1–16. doi:10.3389/fmicb.2012.00120.
- [25] G. Calixto, J. Bernegossi, L. de Freitas, C. Fontana, M. Chorilli, Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review, *Molecules*. 21 (2016) 342–359. doi:10.3390/molecules21030342.
- [26] C.S. Oliveira, R. Turchiello, A.J. Kowaltowski, G.L. Indig, M.S. Baptista, Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 824–833. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.023.
- [27] P.H.B. Aoki, A.P. Schroder, C.J.L. Constantino, C.M. Marques, Bioadhesive giant vesicles for monitoring hydroperoxidation in lipid membrane, *Soft Matter*. 11 (2015) 5995–5998. <http://arxiv.org/abs/1612.08814>.
- [28] H.H. Jaffé, A.L. Miller, The fates of electronic excitation energy, *J. Chem. Educ.* 43 (1966) 469–473. doi:10.1021/ed043p469.

- [29] E.B. Priestley, A. Haug, Phosphorescence spectrum of pure crystalline naphthalene, *J. Chem. Phys.* 49 (1968) 622–629. doi:10.1063/1.1670118.
- [30] N.L. Oleinick, R.L. Morris, I. Belichenko, The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how, *Photochem. Photobiol. Sci.* 1 (2002) 1–21. doi:10.1039/b108586g.
- [31] J.N. Ribeiro, A.V. Flores, R.C. Mesquita, J.H. Nicola, E.M.D. Nicola, Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer, *Physicae.* 5 (2005) 1–10. doi:10.5196/physicae.5.2.
- [32] C. Pavani, Y. Iamamoto, M.S. Baptista, Mechanism and efficiency of cell death of type II photosensitizers: Effect of zinc chelation, *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 774–781. doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01102.x.
- [33] S.B. Brown, E.A. Brown, I. Walker, Review The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment *Photodynamic therapy, Lancet Oncol.* 5 (2004) 497–508. doi:10.1016/S1470-2045(04)01529-3.
- [34] E. Skovsen, J.W. Snyder, J.D.C. Lambert, P.R. Ogilby, Lifetime and Diffusion of Singlet Oxygen in a Cell, *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005) 8570–8573. doi:10.1021/jp051163i.
- [35] G.E. Ronsein, S. Miyamoto, E. Bechara, P. Di Mascio, G.R. Martinez, Singlet oxygen-mediated protein oxidation: Damage mechanisms, detection techniques and biological implication, *Quim. Nova.* 29 (2006) 563–568.
- [36] I.J. MacDonald, T.J. Dougherty, Basic principles of photodynamic therapy, *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 5 (2001) 105–129. doi:10.1002/jpp.328.
- [37] S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kędzierska, K. Knap-Czop, J. Kotlińska, O. Michel, K. Kotowski, J. Kulbacka, Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations, *Biomed. Pharmacother.* 106 (2018) 1098–1107. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049.
- [38] P.H.B. Aoki, E.G.E. Carreon, D. Volpati, M.H. Shimabukuro, C.J.L. Constantino, R.F. Aroca, O.N. Oliveira, F. V Paulovich, SERS Mapping in Langmuir–Blodgett Films and Single-Molecule Detection, *Appl. Spectrosc.* 67 (2013) 563–569. doi:10.1366/12-06909.
- [39] L.S.A. Pereira, S.A. Camacho, A.A. Malfatti-Gasperini, K. Jochelevicius, T.M. Nobre, O.N. Oliveira, P.H.B. Aoki, Evidence of photoinduced lipid hydroperoxidation in Langmuir monolayers containing Eosin Y, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 171 (2018) 682–689. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.08.002.
- [40] S.A. Thompson, A. Aggarwal, S. Singh, A.P. Adam, J.P.C. Tome, C.M. Drain, Compromising the plasma membrane as a secondary target in photodynamic therapy-induced necrosis, *Bioorganic Med. Chem.* 26 (2018) 5224–5228. doi:10.1016/j.bmc.2018.09.026.
- [41] I. Suzuki, N. Inada, V. Marangoni, A.P. da Silva, T. Corrêa, V. Zucolotto, C. Kurachi, V. Bagnato, New formulations nanostructured containing curcumin for optimization in photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 12 (2015) 359–359. doi:https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.07.134.
- [42] D. Silva, B. Martins, J. Semensato, D. Severino, M.S. Baptista, M.J. Politi, N. Hioka, W. Caetano, Photophysical properties and interactions of xanthene dyes in aqueous micelles, *Journal Photochem. Photobiol. A Chem.* 247 (2012) 8–15. doi:10.1016/j.jphotochem.2012.07.009.

- [43] J.G. Waite, A.E. Yousef, Chapter 3 Antimicrobial Properties of Hydroxyxanthenes, *Adv. Appl. Microbiol.* 69 (2009) 79–98. doi:[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)69003-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)69003-1).
- [44] P.H.B. Aoki, *Sistemas Bioinspirados Aplicados no Estudo de Interação e Sensoriamento de Derivados Xantênicos*, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” 2014.
- [45] D.S. Pellosi, B.M. Estevão, C.F. Freitas, T.M. Tsubone, W. Caetano, N. Hioka, Photophysical properties of erythrosin ester derivatives in ionic and non-ionic micelles, *Dye. Pigment.* 99 (2013) 705–712. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.06.026>.
- [46] C. Fracalossi, J.Y. Nagata, D.S. Pellosi, R.S.S. Terada, N. Hioka, M.L. Baesso, F. Sato, P.L. Rosalen, W. Caetano, M. Fujimaki, Singlet oxygen production by combining erythrosine and halogen light for photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans*, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 15 (2016) 127–132. doi:[10.1016/j.pdpdt.2016.06.011](https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.06.011).
- [47] S.N. Letuta, S.N. Pashkevich, A.T. Ishemgulov, Y.D. Lantukh, E.K. Alidzhanov, S.S. Sokabaeva, V. V. Bryukhanov, Delayed luminescence of erythrosine in biological tissue and photodynamic therapy dosimetry, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 163 (2016) 232–236. doi:[10.1016/j.jphotobiol.2016.08.036](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.036).
- [48] I.R. Calori, D.S. Pellosi, G. B., P.C.S. Pereira, M.J. Politi, N. Hioka, W. Caetano, Distribution of Xanthene Dyes in DPPC Vesicles: Rationally Accounting for Drug Partitioning Using a Membrane Model, *J. Braz. Chem. Soc.* 27 (2016) 1938–1948. doi:[10.5935/0103-5053.20160079](https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160079).
- [49] O. Kravchenko, T.C. Sutherland, B. Heyne, Photobleaching of Erythrosine B in Aqueous Environment Investigation Beyond pH^\dagger , *Photochem. Photobiol.* n/a (2021). doi:<https://doi.org/10.1111/php.13396>.
- [50] S.T.G. Buck, F. Bettanin, E. Orestes, P. Homem-De-Mello, H. Imasato, R.B. Viana, J.R. Perussi, A.B.F. Da Silva, Photodynamic Efficiency of Xanthene Dyes and Their Phototoxicity against a Carcinoma Cell Line: A Computational and Experimental Study, *J. Chem.* 2017 (2017) 1–9. doi:[10.1155/2017/7365263](https://doi.org/10.1155/2017/7365263).
- [51] L.S. Herculano, G.V.B. Lukasiwicz, E. Sehn, W. Caetano, D.S. Pellosi, N. Hioka, N.G.C. Astrath, L.C. Malacarne, Photodegradation in micellar aqueous solutions of erythrosin esters derivatives, *Appl. Spectrosc.* 69 (2015) 883–888. doi:[10.1366/15-07865](https://doi.org/10.1366/15-07865).
- [52] E. Gandin, Y. Lion, A. Van de Vorst, Quantum yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives, *Photochem. Photobiol.* 37 (1982) 271–278. doi:[10.1111/j.1751-1097.1983.tb04472.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1983.tb04472.x).
- [53] V.R. Batistela, D.S. Pellosi, F.D. De Souza, W.F. Da Costa, S.M. De Oliveira Santin, V.R. De Souza, W. Caetano, H.P.M. De Oliveira, I.S. Scarminio, N. Hioka, PKa determinations of xanthene derivatives in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV-Vis spectrophotometric data, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 79 (2011) 889–897. doi:[10.1016/j.saa.2011.03.027](https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.03.027).
- [54] A.C.P. da Silva, C.F. De Freitas, A.L. Tessaro, W. Caetano, S.M. De Oliveira Santin, N. Hioka, G.F. Palioto, ATIVIDADE FOTODINÂMICA E CONCEITOS: UM EXPERIMENTO DEMONSTRATIVO, *Quim. Nova.* 41 (2018) 706–712. doi:<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170215>.
- [55] Color Additives History, (n.d.). <https://www.fda.gov/industry/color-additives/color->

- additives-history (accessed January 1, 2021).
- [56] E. Pinilla-Peñalver, M.J. Villaseñor, A.M. Contento, Á. Ríos, Erythrosine B – coated gold nanoparticles as an analytical sensing tool for the proper determination of both compounds based on surface-enhanced Raman spectroscopy, *Microchem. J.* 157 (2020) 104937. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104937>.
- [57] J. Yang, E. Wang, S. Zhou, Q. Yang, Effects of (R)- and (S)-propranolol hydrochloride enantiomers on the resonance Rayleigh scattering spectra with erythrosine B as probe and their analytical applications, *Talanta*. 134 (2015) 754–760. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.030>.
- [58] M.M. Tolba, M.M. Salim, Insights for applying erythrosine B as a green fluorescence probe for estimation of anticancer tamoxifen and its analog; clomiphene in nanogram concentration, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 263 (2021) 120156. doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120156>.
- [59] H. Salem, F.A. Abo Elsoud, D. Heshmat, A. Magdy, Resonance Rayleigh scattering technique-using erythrosine B, as novel spectrofluorimetric method for determination of anticancer agent nilotinib: Application for capsules and human plasma, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 251 (2021) 119428. doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119428>.
- [60] S. Wood, D. Metcalf, D. Devine, C. Robinson, Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms, *J. Antimicrob. Chemother.* 57 (2006) 680–684. doi:10.1093/jac/dkl021.
- [61] A.F. Silva, A.R. dos Santos, D.A.C. Trevisan, E. Bonin, C.F. Freitas, A.F.P. Batista, N. Hioka, M. Simões, J.M. Graton Mikcha, Xanthene Dyes and Green LED for the Inactivation of Foodborne Pathogens in Planktonic and Biofilm States, *Photochem. Photobiol.* 95 (2019) 1230–1238. doi:<https://doi.org/10.1111/php.13104>.
- [62] N.N. Yassunaka, C.F. de Freitas, B.R. Rabello, P.R. Santos, W. Caetano, N. Hioka, T.U. Nakamura, B.A. de Abreu Filho, J.M.G. Mikcha, Photodynamic Inactivation Mediated by Erythrosine and its Derivatives on Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria, *Curr. Microbiol.* 71 (2015) 243–251. doi:10.1007/s00284-015-0827-5.
- [63] K. Jhahharia, A. Parolia, K.V. Shetty, L.K. Mehta, Biofilm in endodontics: A review, *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* 5 (2015) 1–12. doi:10.4103/2231-0762.151956.
- [64] I. Kanwar, A.K. Sah, P.K. Suresh, Biofilm-mediated Antibiotic-resistant Oral Bacterial Infections: Mechanism and Combat Strategies, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2017) 2084–2095. doi:10.2174/1381612822666161124154549.
- [65] L.M. Tokubo, P.L. Rosalen, J. de Cássia Orlandi Sardi, I.A. Freires, M. Fujimaki, J.E. Umeda, P.M. Barbosa, G.O. Tecchio, N. Hioka, C.F. de Freitas, R.S. Suga Terada, Antimicrobial effect of photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on *Streptococcus mutans* biofilm, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 23 (2018) 94–98. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.05.004>.
- [66] A.C.B.P. Costa, V.M.C. Rasteiro, C.A. Pereira, R.D. Rossoni, J.C. Junqueira, A.O.C. Jorge, The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*, *Mycoses.* 55 (2012) 56–63. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02042.x.
- [67] F.M. Tomé, L. De Paula Ramos, F. Freire, C.A. Pereira, I.C.B. de Oliveira, J.C. Junqueira, A.O.C. Jorge, L.D. de Oliveira, Influence of sucrose on growth and sensitivity

- of *Candida albicans* alone and in combination with *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy, *Lasers Med. Sci.* 32 (2017) 1237–1243. doi:10.1007/s10103-017-2201-2.
- [68] A.D. Garg, M. Bose, M.I. Ahmed, W.A. Bonass, S.R. Wood, In Vitro Studies on Erythrosine-Based Photodynamic Therapy of Malignant and Pre-Malignant Oral Epithelial Cells, *PLoS One.* 7 (2012) e34475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034475>.
- [69] E. V Bergmann, O.A. Capeloto, A.T.S. Catanio, G.A.S. Flizikowski, N.M. Kimura, C.F. Freitas, L.S. Herculano, N.G.C. Astrath, L.C. Malacarne, Photoactivation of Erythrosine in simulated body fluids., *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 259 (2021) 119867. doi:10.1016/j.saa.2021.119867.
- [70] C.F. de Freitas, N.L. da Rocha, I.S. Pereverzieff, V.R. Batistela, L.C. Malacarne, N. Hioka, W. Caetano, Potential of triblock copolymers Pluronic® P-84 and F-108 with erythrosine B and its synthetic ester derivatives for photodynamic applications, *J. Mol. Liq.* 322 (2021) 114904. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114904>.
- [71] D.L. Nelson, M.M. Cox, Lipídeos, in: *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 6th ed., Artmed, Porto Alegre, 2014: p. 1250.
- [72] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Estrutura da Membrana, in: *Biol. Mol. Da Célula*, 5th ed., Artmed, Porto Alegre, 2010: p. 1728.
- [73] D.L. Nelson, M.M. Cox, Membranas Biológicas e Transporte, in: *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 6th ed., Artmed, Porto Alegre, 2014: p. 1250.
- [74] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes., *Nature.* 387 (1997) 569–572.
- [75] F.J. Pavinatto, Interações entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Lanmuir-Blodgett (LB), Universidade de São Paulo, 2010.
- [76] H. Brockman, Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions?, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999) 438–443. doi:[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)80061-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)80061-X).
- [77] T. Harayama, H. Riezman, Understanding the diversity of membrane lipid composition., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19 (2018) 281–296. doi:10.1038/nrm.2017.138.
- [78] A.C. Machado, L. Caseli, Interaction of nitrofurantoin with lipid langmuir monolayers as cellular membrane models distinguished with tensiometry and infrared spectroscopy, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 188 (2020) 110794. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110794>.
- [79] I. Felsztyna, M.E. Sánchez-Borzzone, V. Miguel, D.A. García, The insecticide fipronil affects the physical properties of model membranes: A combined experimental and molecular dynamics simulations study in Langmuir monolayers, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1862 (2020) 183378. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183378>.
- [80] E.M. Materon, G.F. Nascimento, F.M. Shimizu, A.S. Câmara, B. Sandrino, R.C. Faria, O.N. Oliveira, Role of sphingomyelin on the interaction of the anticancer drug gemcitabine hydrochloride with cell membrane models, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 196 (2020) 111357. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111357>.
- [81] L.F.C. Morato, G.C.M. Ruiz, W.M. Pazin, O.P. Gomes, O.N. Oliveira, A. Batagin-Neto, C.J.L. Constantino, Effects of insecticide acephate on membrane mimetic systems: The role played by electrostatic interactions with lipid polar headgroups, *J. Mol. Liq.* 332

- (2021) 115868. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115868>.
- [82] M. Jurak, K. Szafran, P. Cea, S. Martín, Analysis of Molecular Interactions between Components in Phospholipid-Immunosuppressant-Antioxidant Mixed Langmuir Films, *Langmuir*. 37 (2021) 5601–5616. doi:10.1021/acs.langmuir.1c00434.
- [83] K. Inoue, K. Fujimoto, C. Takada, A. Ge, S. Ye, Effect of Head Group on Low-Level Ozone Oxidation of Unsaturated Phospholipids on a Water Surface, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 94 (2020) 486–489. doi:10.1246/bcsj.20200250.
- [84] M.J. Bistaffa, M.B. Kobal, P.S.S. Souza, K.A. Toledo, S.A. Camacho, P.H.B. Aoki, Photo-Induced Necrosis on Oropharyngeal Carcinoma (HEp-2) Cells Mediated by the Xanthene Erythrosine, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 20 (2020) 6180–6190. doi:10.1166/jnn.2020.18123.
- [85] L.G. Moreira, A.M. Almeida, S.A. Camacho, B.M. Estevão, O.N. Oliveira, P.H.B. Aoki, Chain Cleavage of Bioinspired Bacterial Membranes Photoinduced by Eosin Decyl Ester, *Langmuir*. 36 (2020) 9578–9585. doi:10.1021/acs.langmuir.0c01600.
- [86] A.M. Almeida, O.N. Oliveira, P.H.B. Aoki, Role of Toluidine Blue-O Binding Mechanism for Photooxidation in Bioinspired Bacterial Membranes, *Langmuir*. 35 (2019) 16745–16751. doi:10.1021/acs.langmuir.9b03045.
- [87] T.F. Schmidt, L. Caseli, O.N. Oliveira, R. Itri, Binding of Methylene Blue onto Langmuir Monolayers Representing Cell Membranes May Explain Its Efficiency as Photosensitizer in Photodynamic Therapy, *Langmuir*. 31 (2015) 4205–4212. doi:10.1021/acs.langmuir.5b00166.
- [88] O.I. Bacellar, M.T. Tsubone, C. Pavani, S.M. Baptista, Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death, *Int. J. Mol. Sci.* . 16 (2015). doi:10.3390/ijms160920523.
- [89] L.F.C. Morato, EFEITOS DO INSETICIDA ACEFATO EM MODELOS SIMPLES DE MEMBRANAS LIPÍDICAS BASEADOS EM FILMES DE LANGMUIR E GUVS: INTERAÇÕES EM NÍVEL MOLECULAR E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” 2021.
- [90] I. Langmuir, THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. II. LIQUIDS.1, *J. Am. Chem. Soc.* 39 (1917) 1848–1906. doi:10.1021/ja02254a006.
- [91] I. Langmuir, THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS., *J. Am. Chem. Soc.* 38 (1916) 2221–2295. doi:10.1021/ja02268a002.
- [92] A.M. Almeida, Fotossensibilização de sistemas miméticos de membrana celular induzida pelo fenotiazínico azul de toluidina, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” 2020.
- [93] S.A. Camacho, Síntese de nanopartículas de ouro para amplificação do espalhamento Raman (SERS) e da fluorescência (SEF) visando aplicações sensoriais, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” 2018.
- [94] T.M. Gonçalves, Caracterização de filmes finos obtidos por deposição de vapor químico assistido a plasma (PECVD) e deposição e implantação iônica por imersão em plasma (PIID), Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” 2012.
- [95] C.D.G. Cougo, Utilização da Técnica Infravermelho com Transformada de Fourier

- (FTIR) para Estimativa das Concentrações de Carboidratos e de Lipídeos em *Scenedesmus* sp., Universidade do Rio Grande do Sul, 2017.
- [96] A. Fernandes, Uso de espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (IVTF) e quimiometria para classificação de vinho e suco de uva, Universidade Tecnológica do Paraná, 2015.
- [97] C.A. Lima, Caracterização bioquímica de lesões neoplásicas via espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier, Universidade de São Paulo, 2015.
- [98] V. da S. Oliveira, Análise da autenticidade de cédulas de real utilizando espectroscopia NIR portátil e quimiometria, Universidade Federal de Pernambuco, 2018.
- [99] S.H. Lee, S. Park, L.P. Lee, Optical Methods in Studies of Olfactory System, in: *Bioelectron. Nose Integr. Biotechnol. Nanotechnol.*, 2014: pp. 191–290. doi:10.1007/978-94-017-8613-3.
- [100] A.H. Coons, H.J. Creech, N. Jones, Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group, *Proc. Soc. Exp. Biol. Anf Med.* 47 (1941) 200–202. doi:https://doi.org/10.3181/00379727-47-13084P.
- [101] K.M. Mckinnon, Flow Cytometry Instrumentation – An Overview, *Curr. Protoc. Cytom.* 87 (2019) 1–16. doi:10.1002/cpcy.52.
- [102] K.M. da S. Braga, V. de S. Pimenta, F.A. Rodrigues, T.P. dos Santos, E.G. de Araújo, Citometria de fluxo: histórico, princípios básicos e aplicações em pesquisa, *Enciclopédia Biosfera.* 13 (2016) 304. doi:10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2016_027.
- [103] N.I., O que é citometria de fluxo e qual sua aplicação para a saúde, *Bio Em Foco.* (2020) 4. <https://bioemfoco.com.br/noticia/o-que-e-citometria-de-fluxo-e-qual-sua-aplicacao-para-a-saude/> (accessed December 24, 2020).
- [104] P.S.S. Souza, L.V. Barbosa, L.F.A. Diniz, G.S. da Silva, B.R.P. Lopes, P.M.R. Souza, G.C. de Araujo, D. Pessoa, J. de Oliveira, F.P. Souza, K.A. Toledo, Neutrophil extracellular traps possess anti-human respiratory syncytial virus activity: Possible interaction with the viral F protein, *Virus Res.* 251 (2018) 68–77. doi:https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.04.001.
- [105] A.H. Metherel, A.Y. Taha, H. Izadi, K.D. Stark, The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed)., *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* 81 (2009) 417–423. doi:10.1016/j.plefa.2009.07.003.
- [106] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification., *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 8 (1959) 911–917.
- [107] J.A. Prescher, C.R. Bertozzi, Chemistry in Living Systems, *Nat. Chem. Biol.* 1 (2005) 13–21. doi:10.1038/nchembio0605-13.
- [108] L.F.G. Salis, G.N. Jaroque, J.F.B. Escobar, C. Giordani, A.M. Martinez, D.M.M. Fernández, F. Castelli, M.G. Sarpietro, L. Caseli, Interaction of 3',4',6'-trimyristoyl-uridine derivative as potential anticancer drug with phospholipids of tumorigenic and non-tumorigenic cells, *Appl. Surf. Sci.* 426 (2017) 77–86. doi:10.1016/J.APSUSC.2017.07.094.
- [109] N.B. Leite, A. Aufderhorst-Roberts, M.S. Palma, S.D. Connell, J.R. Neto, P.A. Beales, PE and PS Lipids Synergistically Enhance Membrane Poration by a Peptide with Anticancer Properties, *Biophys. J.* 109 (2015) 936–947. doi:10.1016/j.bpj.2015.07.033.

- [110] J. Kurniawan, J.F. Ventrici de Souza, A.T. Dang, G. Liu, T.L. Kuhl, Preparation and Characterization of Solid-Supported Lipid Bilayers Formed by Langmuir–Blodgett Deposition: A Tutorial, *Langmuir*. 34 (2018) 15622–15639. doi:10.1021/acs.langmuir.8b03504.
- [111] G. Liebisch, E. Fahy, J. Aoki, E.A. Dennis, T. Durand, C.S. Ejsing, M. Fedorova, I. Feussner, W.J. Griffiths, H. Köfeler, A.H.J. Merrill, R.C. Murphy, V.B. O'Donnell, O. Oskolkova, S. Subramaniam, M.J.O. Wakelam, F. Spener, Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures., *J. Lipid Res.* 61 (2020) 1539–1555. doi:10.1194/jlr.S120001025.
- [112] V.B. O'Donnell, E.A. Dennis, M.J.O. Wakelam, S. Subramaniam, LIPID MAPS: Serving the next generation of lipid researchers with tools, resources, data, and training., *Sci. Signal.* 12 (2019). doi:10.1126/scisignal.aaw2964.
- [113] Z. Pang, J. Chong, G. Zhou, D.A. de Lima Morais, L. Chang, M. Barrette, C. Gauthier, P.-É. Jacques, S. Li, J. Xia, MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights, *Nucleic Acids Res.* (2021). doi:10.1093/nar/gkab382.
- [114] V.K. Kalra, C.M. Gupta, A. Zachowski, T. Pomorski, Lipid Asymmetry of Membranes BT - Manual on Membrane Lipids, in: R. Prasad (Ed.), *Spring Lab Man.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1996: pp. 112–143. doi:10.1007/978-3-642-79837-5_6.
- [115] C. Luna, K.M. Stroka, H. Bermudez, H. Aranda-Espinoza, Thermodynamics of monolayers formed by mixtures of phosphatidylcholine/phosphatidylserine, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 85 (2011) 293–300. doi:https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.037.
- [116] G.C.M. Ruiz, Interação do hormônio 17 α -etinilestradiol e modelos complexos da membrana celular, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho,” 2020.
- [117] J.F.D. Liljeblad, V. Bulone, E. Tyrode, M.W. Rutland, C.M. Johnson, Phospholipid Monolayers Probed by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy: Instability of Unsaturated Phospholipids, *Biophys. J.* 98 (2010) L50–L52. doi:https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.009.
- [118] D.O. Oluwole, F. Sara, E. Prinsloo, D. Edith, A. Yuzer, T. Nyokong, M. Ince, Photophysicochemical properties and photodynamic therapy activity of highly water-soluble Zn(II) phthalocyanines, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 203 (2018) 236–243. doi:10.1016/j.saa.2018.05.090.
- [119] B. Boster, Flow Cytometry Fundamental Principle, How FACS works, (n.d.). <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/flow-cytometry-principle> (accessed October 19, 2018).
- [120] I. Vermes, C. Haanen, C. Reutelingsperger, Flow cytometry of apoptotic cell death, *J. Immunol. Methods.* 243 (2000) 167–190. doi:10.1016/S0022-1759(00)00233-7.
- [121] M.T. Silva, Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program, *Febs Lett.* 584 (2010) 4491–4499. doi:10.1016/j.febslet.2010.10.046.
- [122] L. Troiana, R. Ferraresi, E. Lugli, E. Nemes, E. Roat, M. Nasi, M. Pinti, A. Cossarizza, Multiparametric analysis of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis by polychromatic flow cytometry., *Springer Nat.* 2 (2007) 2719–2727. doi:10.1038/nprot.2007.405.
- [123] C. Wang, R.J. Youle, The Role of Mitochondria in Apoptosis, *Annu. Rev. Genet.* 43

- (2009) 95–118. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134850.
- [124] G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M. V Blagosklonny, W.S. El-deiry, Classification of cell death : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 3–11. doi:10.1038/cdd.2008.150.
- [125] T. Bushnell, How To Use Flow Cytometry: To Measure Apoptosis, Necrosis, and Autophagy, <https://Expertcytometry.Com>. (2017) 1. <https://expertcytometry.com/flow-cytometry-measure-apoptosis-necrosis-autophagy/> (accessed October 19, 2018).
- [126] D.S. Wishart, Y.D. Feunang, A. Marcu, A.C. Guo, K. Liang, R. Vázquez-Fresno, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, N. Karu, Z. Sayeeda, E. Lo, N. Assempour, M. Berjanskii, S. Singhal, D. Arndt, Y. Liang, H. Badran, J. Grant, A. Serra-Cayuela, Y. Liu, R. Mandal, V. Neveu, A. Pon, C. Knox, M. Wilson, C. Manach, A. Scalbert, HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018., *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) D608–D617. doi:10.1093/nar/gkx1089.
- [127] T. Harayama, H. Riezman, G. Liebisch, E. Fahy, J. Aoki, E.A. Dennis, T. Durand, C.S. Ejsing, M. Fedorova, I. Feussner, W.J. Griffiths, H. Köfeler, A.H.J. Merrill, R.C. Murphy, V.B. O'Donnell, O. Oskolkova, S. Subramaniam, M.J.O. Wakelam, F. Spener, Understanding the diversity of membrane lipid composition., *J. Lipid Res.* 61 (2020) 281–296. doi:10.1194/jlr.S120001025.
- [128] J.V.N. Ferreira, J.H.G. Lago, L. Caseli, Thymol in cellular membrane models formed by negative charged lipids causes aggregation at the air-water interface, *Chem. Phys. Lett.* 717 (2019) 87–90. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.01.006>.
- [129] A. Sakai, A.P. de Sousa Mesquista, H.B. Nader, C.C. Lopes, W. Nakanishi, K. Ariga, L. Caseli, The lipid composition affects Trastuzumab adsorption at monolayers at the air-water interface, *Chem. Phys. Lipids.* 227 (2020) 104875. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104875>.
- [130] A. Blume, A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers., *Biochim. Biophys. Acta.* 557 (1979) 32–44. doi:10.1016/0005-2736(79)90087-7.
- [131] J.V.N. Ferreira, T.M. Capello, L.J.A. Siqueira, J.H.G. Lago, L. Caseli, Mechanism of Action of Thymol on Cell Membranes Investigated through Lipid Langmuir Monolayers at the Air-Water Interface and Molecular Simulation., *Langmuir.* 32 (2016) 3234–3241. doi:10.1021/acs.langmuir.6b00600.
- [132] G.N. Jaroque, P. Sartorelli, L. Caseli, Interfacial vibrational spectroscopy and Brewster angle microscopy distinguishing the interaction of terpineol in cell membrane models at the air-water interface., *Biophys. Chem.* 246 (2019) 1–7. doi:10.1016/j.bpc.2018.12.003.
- [133] A.E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E.M. V Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface., *Nat. Mater.* 8 (2009) 543–557. doi:10.1038/nmat2442.
- [134] H.M. Zeyada, H.M. El-Mallah, T. Atwee, D.G. El-Damhogi, Spectroscopic studies of UV irradiated erythrosine B thin films prepared by spin coating technique, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 179 (2017) 120–124. doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.02.039>.
- [135] M.A. Hasnat, M.M. Uddin, A.J.F. Samed, S.S. Alam, S. Hossain, Adsorption and

- photocatalytic decolorization of a synthetic dye erythrosine on anatase TiO₂ and ZnO surfaces., *J. Hazard. Mater.* 147 (2007) 471–477. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.01.040.
- [136] M. Kaur, M. Datta, Adsorption Equilibrium and Kinetics of Toxic Dye-Erythrosine B Adsorption onto Montmorillonite, *Sep. Sci. Technol.* 48 (2013) 1370–1381. doi:10.1080/01496395.2012.727939.
- [137] S. De, S. Das, A. Girigoswami, Environmental effects on the aggregation of some xanthene dyes used in lasers, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 61 (2005) 1821–1833. doi:10.1016/j.saa.2004.06.054.
- [138] A.S. Davydov, THE THEORY OF MOLECULAR EXCITONS, *Sov. Phys. Uspekhi.* 7 (1964) 145–178. doi:10.1070/pu1964v007n02abeh003659.
- [139] B.Y.M.G.U. Ron, Energy Transfer in Hydrogen-Bonded N-Heterocyclic Complex and Their Possible Role as Energy Sinks, *Excit. States.* 63 (1968) 325–337.
- [140] B. Sandrino, J.F.A. de Oliveira, T.M. Nobre, P. Appelt, A. Gupta, M.P. de Araujo, V.M. Rotello, O.N. Oliveira, Challenges in Application of Langmuir Monolayer Studies To Determine the Mechanisms of Bactericidal Activity of Ruthenium Complexes, *Langmuir.* 33 (2017) 14167–14174. doi:10.1021/acs.langmuir.7b02247.
- [141] U.P. Fringeli, The structure of lipids and proteins studied by attenuated total reflection (ATR) infrared spectroscopy. II. Oriented layers of a homologous series: phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine., *Zeitschrift Fur Naturforschung. Sect. C, Biosci.* 32 (1977) 20–45. doi:10.1515/znc-1977-1-205.
- [142] I. Zawisza, A. Lachenwitzer, V. Zamlynny, S.L. Horswell, J.D. Goddard, J. Lipkowski, Electrochemical and photon polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy study of the electric field driven transformations of a phospholipid bilayer supported at a gold electrode surface., *Biophys. J.* 85 (2003) 4055–4075. doi:10.1016/S0006-3495(03)74819-X.
- [143] R. Mendelsohn, G. Mao, C.R. Flach, Infrared reflection–absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid–protein interaction in Langmuir films, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1798 (2010) 788–800. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.11.024.
- [144] I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, C. Reutelingsperger, A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V., *J. Immunol. Methods.* 184 (1995) 39–51. doi:10.1016/0022-1759(95)00072-i.
- [145] A. Inan Genç, S. Gok, S. Banerjee, F. Severcan, Valdecoxib Recovers the Lipid Composition, Order and Dynamics in Colon Cancer Cell Lines Independent of COX-2 Expression: An ATR-FTIR Spectroscopy Study, *Appl. Spectrosc.* 71 (2017) 105–117. doi:10.1177/0003702816654164.
- [146] H.M. Zeyada, H.M. El-Mallah, T. Atwee, D.G. El-Damhogi, Spectroscopic studies of UV irradiated erythrosine B thin films prepared by spin coating technique, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 179 (2017) 120–124. doi:10.1016/j.saa.2017.02.039.
- [147] B.R. Shakya, P. Shrestha, H.-R. Teppo, L. Rieppo, The use of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy in skin cancer research: a systematic review, *Appl. Spectrosc. Rev.* 56 (2021) 347–379. doi:10.1080/05704928.2020.1791152.

- [148] J. Depciuch, A. Stanek-Widera, N. Khinevich, H. V. Bandarenka, M. Kandler, V. Bayev, J. Fedotova, D. Lange, J. Stanek-Tarkowska, J. Cebulski, The spectroscopic similarity between breast cancer tissues and lymph nodes obtained from patients with and without recurrence: A preliminary study, *Molecules*. 25 (2020). doi:10.3390/molecules25143295.
- [149] L.G. Moreira, A.M. Almeida, T. Nield, S.A. Camacho, P.H.B. Aoki, Modulating photochemical reactions in Langmuir monolayers of Escherichia coli lipid extract with the binding mechanisms of eosin decyl ester and toluidine blue-O photosensitizers, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 218 (2021) 112173. doi:https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112173.
- [150] G. Socrates, Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts, 2001. <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1238>.
- [151] J.F.D. Liljeblad, V. Bulone, E. Tyrode, M.W. Rutland, C.M. Johnson, Phospholipid monolayers probed by vibrational sum frequency spectroscopy: instability of unsaturated phospholipids, *Biophys. J.* 98 (2010) L50–L52. doi:10.1016/j.bpj.2010.02.009.
- [152] G.R. Buettner, The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate., *Arch. Biochem. Biophys.* 300 (1993) 535–543. doi:10.1006/abbi.1993.1074.
- [153] G. van Ginkel, J.M. Muller, F. Siemsen, A.A. van 't Veld, L.J. Korstanje, M.A.M. van Zandvoort, M. Lou Wratten, A. Sevanian, Impact of oxidized lipids and antioxidants, such as vitamin E and lazaroids, on the structure and dynamics of unsaturated membranes, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 88 (1992) 1901–1912. doi:10.1039/FT9928801901.
- [154] J. Wong-Ekkabut, Z. Xu, W. Triampo, I.-M. Tang, D.P. Tieleman, L. Monticelli, Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study., *Biophys. J.* 93 (2007) 4225–4236. doi:10.1529/biophysj.107.112565.
- [155] I.O.L. Bacellar, M.C. Oliveira, L.S. Dantas, E.B. Costa, H.C. Junqueira, W.K. Martins, A.M. Durantini, G. Cosa, P. Di Mascio, M. Wainwright, R. Miotto, R.M. Cordeiro, S. Miyamoto, M.S. Baptista, Photosensitized Membrane Permeabilization Requires Contact-Dependent Reactions between Photosensitizer and Lipids, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 9606–9615. doi:10.1021/jacs.8b05014.
- [156] X. Wang, The expanding role of mitochondria in apoptosis., *Genes Dev.* 15 (2001) 2922–2933.
- [157] L. Troiano, R. Ferraresi, E. Lugli, E. Nemes, E. Roat, M. Nasi, M. Pinti, A. Cossarizza, Multiparametric analysis of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis by polychromatic flow cytometry., *Nat. Protoc.* 2 (2007) 2719–2727. doi:10.1038/nprot.2007.405.
- [158] C. Lines, M. Mastrangelopoulou, M. Grigalavicius, K. Berg, M. Mathilde, Cytotoxic and Photocytotoxic Effects of Cercosporin on Human Tumor, (2018). doi:10.1111/php.12997.
- [159] Y. Zhang, K. Shang, X. Wu, S. Song, Z. Li, Z. Pei, Y. Pei, Highly efficient green synthesis and photodynamic therapeutic study of hypericin and its derivatives, *RSC Adv.* 8 (2018) 21786–21792. doi:10.1039/C8RA03732A.
- [160] J. Wu, Q. Xiao, N. Zhang, C. Xue, A.W. Leung, H. Zhang, Q.-J. Tang, C. Xu, Palmatine

hydrochloride mediated photodynamic inactivation of breast cancer MCF-7 cells: Effectiveness and mechanism of action, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 15 (2016) 133–138. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.07.006>.