

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ALEXANDRE MENDES DE ALMEIDA JUNIOR

Sinergia fototerápica a partir de nanobastões de ouro conjugados com azul
de toluidina: uma comparação entre modelos bacterianos e tumoral

Botucatu

2024

ALEXANDRE MENDES DE ALMEIDA JUNIOR

Sinergia fototerápica a partir de nanobastões de ouro conjugados com azul de toluidina: uma comparação entre modelos bacterianos e tumoral

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Benites Aoki

Co-orientadora: Sabrina Aléssio Camacho

Botucatu

2024

A447s Almeida Junior, Alexandre Mendes de
Sinergia fototerápica a partir de nanobastões de ouro conjugados com azul de toluidina: uma comparação entre modelos bacterianos e tumoral / Alexandre Mendes de Almeida Junior. -- Botucatu, 2024
112 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientadora: Pedro Henrique Benites Aoki
Coorientadora: Sabrina Aléssio Camacho

1. Terapia fotodinâmica. 2. Terapia fototérmica. 3. Nanobastões de ouro. 4. Azul de toluidina-O. 5. Sinergia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ALEXANDRE MENDES DE ALMEIDA JUNIOR, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 24 dias do mês de maio do ano de 2024, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de ALEXANDRE MENDES DE ALMEIDA JUNIOR, intitulada **Sinergia fototerápica a partir de nanobastões de ouro conjugados com azul de toluidina: uma comparação entre modelos bacteriano e tumoral**. 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 Câmpus de Assis, Prof. Dr. WALLANCE MOREIRA PAZIN (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física e Meteorologia / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru, Prof. Dr. DIOGO SILVA PELLOSI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Universidade Federal do Paraná - UFPR, Pró-reitor de Pós-graduação e Pesquisa LEANDRO JOSÉ RANIERO (Participação Virtual) do(a) Pesquisa e Desenvolvimento / Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP, Profa. Dra. CRISTINA KURACHI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP). Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: **Aprovado**. 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

 Documento assinado digitalmente
PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI
Data: 27/05/2024 08:04:42-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, prof. Pedro Aoki, cuja orientação valiosa, conselhos e apoio ao longo desses anos foram fundamentais não apenas para a execução deste projeto, mas também para meu desenvolvimento pessoal e profissional. Sua forma de trabalho é inspiradora. Seu método dedicado é inspirador, sendo uma fonte constante de motivação e aprendizado.

Agradeço a minha coorientadora, Dra. Sabrina Aléssio, por sua orientação e apoio contínuos, citando, em particular, o apoio dado quando me deparei com dificuldades na síntese dos nanobastões, ainda durante a pandemia e as restrições impostas. Sua disposição em ajudar e os momentos de descontração no laboratório foram essenciais para tornar a execução deste trabalho mais eficiente e agradável.

Agradeço especialmente aos professores Drs. Osvaldo Novais (USP/São Carlos), Karina Alves (UNESP/Assis), Dayane Batista e Katia Conceição (UNIFESP/São José dos Campos) pela colaboração, dedicação e ensinamentos, que ampliaram o escopo do projeto de pesquisa, ao explorar novas perspectivas e abordagens. A contribuição de todos vocês, sem dúvida, enriqueceu profundamente a discussão apresentada neste trabalho.

Aos amigos e amigas Satoshi, Mirella, Ronaldo, Sabiá, Vanessa e a todo o pessoal do grupo “*Chatuba Nation*” e “*Baby dogs crew*”, expresso meu profundo agradecimento pelo apoio incondicional ao longo do desenvolvimento desta pesquisa. A amizade que construímos ao longo desses anos de trabalho conjunto foi uma fonte constante de alegria e motivação. Os momentos de descontração (as “quintas malucas”) compartilhados entre nós trouxeram uma energia renovadora, impulsionando-me a seguir em frente.

Expresso minha gratidão à CAPES pelo apoio financeiro a esta pesquisa, tornando possível a realização deste trabalho.

Dedico este trabalho aos meus familiares, principalmente meu pai Alexandre, minha mãe Edmeire e meu irmão Gabriel, cuja demonstração de amor, apoio e compreensão não faltaram e foram fundamentais para me manter firme e seguir em frente. Mesmo distantes, suas palavras de encorajamento foram uma fonte constante de motivação. Sem isso nada seria possível.

Por fim, dedico especialmente este trabalho à memória de meu avô, Manoel Gonsalves Filho, o vovô Neco.

Vai Corinthians!

Apresentação

A presente tese de doutorado originou-se do trabalho desenvolvido durante meu mestrado, no qual iniciamos os estudos de terapia fotodinâmica (TFD) em modelos de bactérias. A motivação para o trabalho surgiu de dados sobre o crescente número de infecções causada por bactérias multirresistentes a antibióticos, ressaltando a necessidade de métodos alternativos de tratamento¹. Neste contexto, iniciamos as investigações envolvendo a molécula azul de toluidina-O (TBO), um importante fotossensibilizador da família dos fenotiazínicos, cujos efeitos foto-oxidativos e mecanismos de interação molecular eram poucos explorados. O principal alvo deste estudo foi a membrana plasmática bacteriana, reconhecida por conferir proteção e ser principal estrutura atribuidora de resistência destes patógenos. Devido à complexidade destas estruturas, optamos por estudar os efeitos da TFD sobre sistemas de membranas celulares bioinspiradas, utilizando filmes de Langmuir e concentrando-se nas monocamadas de fosfolipídios. O estudo de interação e fotoativação entre TBO e biomembranas teve como finalidade avançar na compreensão dos mecanismos de inibição celular na TFD, os quais acreditamos ser relevantes para o aprimoramento da técnica.

Com base nesta pesquisa, propomos um projeto de doutorado com o objetivo de aprimorar os efeitos inibitórios da fototerapia, desta vez explorando a terapia fototérmica (TFT). O projeto visa desenvolver uma nanoestrutura complexa que possa gerar um efeito sinérgico entre as TFD e TFT, maximizando a indução da morte celular por meio de calor e estresse oxidativo simultâneos. Os estudos iniciais focaram no uso de nanoestruturas plasmônicas, em particular nanobastões de ouro recobertos com sílica (AuSHINRs), que apresentam ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) ajustável em um amplo espectro de comprimento de onda no infravermelho próximo^{2,3}. O objetivo foi criar uma nanoestrutura cujo LSPR coincidissem com o comprimento de onda de excitação do TBO, permitindo a conjugação com as AuSHINRs para uma fotoativação combinada. Desta maneira, daríamos continuidade aos estudos envolvendo o TBO e sua eficácia na inibição bacteriana.

Os primeiros experimentos focaram nos mecanismos de interação e nos efeitos fototérmicos das AuSHINRs em sistemas modelo de membranas bacterianas em filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS) de DOPE, Lysyl-PG, DOPG e CL. Observamos a incorporação das AuSHINRs por meio do deslocamento da área molecular nas

isotermas π -A, o qual efeito foi mais expressivo sobre as estruturas aniônicas de DOPG e CL. O FTIR dos filmes LS revelou maior número de modificações nas monocamadas de DOPG e CL, devido a existência de forças eletrostáticas atrativas entre os grupos fosfatos aniônicos e as AuSHINRs carregadas positivamente. Além disso, foi observado a existência de repulsões eletrostáticas entre grupos polares de etanolamina catiônica (DOPE) e lisil (Lysyl-PG) que podem ter enfraquecido as interações com as AuSHINRs. Após a irradiação destes sistemas, nenhuma diferença estatística foi observada na área superficial das monocamadas de DOPE e Lysyl-PG em subfase coloidal de AuSHINRs, o que é evidência da inserção restrita de nanoestruturas. Em contraste, a monocamada de DOPG diminuiu sua área superficial em 4,0%, enquanto a monocamada de CL aumentou cerca de 3,7%. Tais resultados concordam com as reações oxidativas desencadeadas por espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas pela fotoativação das AuSHINRs. Assim, pode se concluir que a inserção mais profunda das AuSHINRs no DOPG pode ter favorecido a clivagem da cadeia, enquanto a hidroperoxidação é o resultado mais provável na CL, onde as AuSHINRs estão circundando os grupos polares. Além disso, experimentos preliminares em cultura de *Escherichia coli* demonstraram que as interações eletrostáticas com AuSHINRs não inibem o crescimento bacteriano, mas os efeitos fotoinduzidos são altamente tóxicos, resultando em uma redução substancial da viabilidade celular.

Uma descoberta relevante foi a capacidade das próprias partículas de AuSHINRs produzirem ROS durante o processo de indução de calor durante a irradiação. Sendo assim, a conjugação das AuSHINRs com TBO (AuSHINRs@TBO) impulsionaria a geração de ROS, produzindo um efeito foto-oxidativo mais abundante e letal nas células alvo. Para esta segunda etapa de experimentos, optamos por estudar tais efeitos sobre um sistema celular mais complexo, direcionando nosso foco para a terapia antitumoral. Essa motivação surgiu a partir do mesmo princípio anteriormente descrito, o surgimento de células resistentes à fármacos, agora relacionado a neoplasias e a drogas quimioterápicas. Nesse contexto, escolhemos trabalhar com uma linhagem de carcinoma de colorretal humano (Caco-2), que também apresenta uma natureza agressiva e alta taxa de letalidade

Portanto, a segunda vertente do trabalho aborda a fototoxicidade aumentada de AuSHINRs@TBO contra células de Caco-2 através dos efeitos sinérgicos entre TFD e

TFT. Os testes *in vitro* de atividade metabólica mitocondrial (MTT) realizados em culturas de Caco-2 indicaram um efeito fototérmico das AuSHINRs. A fototoxicidade em células Caco-2 foi aumentada com as AuSHINRs@TBO onde processos oxidativos, como a hidroperoxidação, também se mostraram presentes, levando a uma redução da viabilidade celular de 85,5 para 39,0%. Os mecanismos em nível molecular responsáveis por esses efeitos foram investigados em membranas tumorais bioinspiradas usando monocamadas de Langmuir de extrato lipídico de Caco-2. A espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS) revelou que a incorporação de AuSHINRs@TBO é também devida a interações eletrostáticas atrativas com grupos carregados negativamente do extrato lipídico Caco-2, resultando na expansão das isotermas π -A. Após a irradiação, as monocamadas de extrato lipídico de Caco-2 contendo AuSHINRs@TBO (1:1 v/v) exibiram um aumento de 1% na área superficial. Isto é atribuído à geração de ROS e sua interação com monocamadas de extrato lipídico Caco-2, levando à formação de hidroperóxido. Os efeitos oxidativos são facilitados pela penetração de AuSHINRs@TBO nos grupos polares do extrato, permitindo reações oxidativas com insaturações das cadeias carbônicas. Ainda, os mecanismos foram consistentes com os resultados da microscopia confocal de fluorescência, onde a membrana plasmática de Caco-2 foi o local primário do processo de indução da morte celular.

Por fim, a estrutura da tese é organizada em três capítulos. O Capítulo I oferece uma contextualização detalhada do estudo, apresentando os conceitos teóricos que embasam a produção de sistemas miméticos de membrana e as técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho. O Capítulo II detalha os resultados da interação e fotoativação das AuSHINRs, com ênfase na aplicação da TFT sobre as membranas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Finalmente, o Capítulo III explora a fototoxicidade e os mecanismos de interação das AuSHINRs@TBO em monocamadas de Langmuir, bem como em culturas de células Caco-2.

Resumo

Devido ao aumento da resistência aos tratamentos convencionais, novas estratégias são necessárias para enfrentar infecções bacterianas e neoplasias, as quais destacam-se a terapia fotodinâmica (TFD) e terapia fototérmica (TFT). A combinação entre elas mostra-se promissora, potencializando a indução da morte celular por meio da indução de calor e estresse oxidativo simultâneos. Neste contexto, o presente projeto foi dividido em duas etapas. Primeiramente, foi avaliado a eficiência de um novo sistema de TFT baseado em nanoestruturas plasmônicas, especificamente nanobastões de ouro (AuSHINRs), para a inativação bacteriana. Na segunda etapa, as AuSHINRs foram conjugadas com azul de toluidina-O (TBO), produzindo uma molécula complexa (AuSHINRs@TBO) capaz de alcançar o efeito sinérgico entre TFT e TFD, desta vez aplicada para a inativação de células tumorais. Em ambos os casos, a eficiência das terapias não depende da internalização celular das partículas, mas sim da sua incorporação na membrana plasmática. Esta estrutura é principal barreira atribuidora de resistência de células malignas e o foco principal de estudo deste projeto. Os mecanismos de interação e os efeitos fotoinduzidos em nível molecular foram investigados em membranas celulares bioinspiradas, utilizando filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer de extrato lipídico e fosfolipídios puros. As análises de espectroscopias no infravermelho (FTIR e PM-IRRAS) revelaram que a incorporação das partículas em cada sistema é resultado de interações eletrostáticas atrativas com grupos lipídicos carregados negativamente, resultando na expansão das isotermas π -A. Após a irradiação, as monocamadas lipídicas apresentaram diferentes comportamentos em relação à área de superfície, dependendo do grau de incorporação das partículas nos filmes. Além disso, foram investigados tais mecanismos em sistemas *in vitro* mais complexos, utilizando a *Escherichia coli* como modelo bacteriano e Caco-2 como modelo de célula neoplásica. Em ambos os casos, foram avaliados os efeitos citotóxicos e fotoinduzidos, como uma redução substancial da viabilidade de *E. coli* expostas a AuSHINRs irradiadas, e aumento da morte celular em Caco-2, destacada pelo efeito sinérgico das AuSHINRs@TBO.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, terapia fototérmica, nanobastões de ouro, azul de toluidina-O, sinergia.

Abstract

Due to the increasing resistance to conventional treatments, new strategies are needed to address bacterial infections and neoplasms, among which photodynamic therapy (PDT) and photothermal therapy (PTT) stand out. The combination of these therapies shows promise, enhancing cell death induction through simultaneous heat and oxidative stress. In this context, this project was divided into two stages. Firstly, the efficiency of a novel PTT system based on plasmonic nanostructures, specifically gold nanorods (AuSHINRs), for bacterial inactivation was evaluated. In the second stage, AuSHINRs were conjugated with toluidine blue-O (TBO), producing a complex molecule (AuSHINRs@TBO) capable of achieving synergistic effects between PTT and PDT, this time applied for the inactivation of tumor cells. In both cases, the therapy efficiency does not depend on cellular internalization of the particles, but rather on their incorporation into the plasma membrane. This structure is the main barrier attributing resistance to malignant cells and the primary focus of study in this project. The interaction mechanisms and photoinduced effects at the molecular level were investigated in bioinspired cell membranes using Langmuir and Langmuir-Schaefer films of lipid extract and pure phospholipids. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and polarization modulation-infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS) analyses revealed that the particle incorporation in each system results from attractive electrostatic interactions with negatively charged lipid groups, resulting in expansion of the π -A isotherms. After irradiation, the lipid monolayers showed different behaviors regarding surface area, depending on the degree of particle incorporation into the films. Furthermore, these mechanisms were investigated in more complex *in vitro* systems using *Escherichia coli* as a bacterial model and Caco-2 as a neoplastic cell model. In both cases, cytotoxic and photoinduced effects were evaluated, such as substantial reduction in viability of *E. coli* exposed to irradiated AuSHINRs, and increased cell death in Caco-2, which is highlighted by the synergistic effect of AuSHINRs@TBO.

Keywords: photodynamic therapy, photothermal therapy, gold nanorods, toluidine blue-O, synergy.

Lista de figuras

- Figura 1.** (a) representação dos três componentes fundamentais da TFD: fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio. (b) demonstração simplificada do diagrama de Jablonski e rotas (tipos I e II) para geração de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Li *et al.* ⁵⁴ 20
- Figura 2.** Estrutura molecular e espectro de absorbância de TBO a uma concentração de 10^{-5} mol/L. 22
- Figura 3.** (a) representação da ressonância plamônica de superfície localizada (LSPR) e subsequente a liberação de energia térmica ao redor da nanopartícula. (b) espectros de extinção UV-Vis de AuNRs, cujas bandas de oscilações eletrônicas transversais (TM) e longitudinais (LM) estão em evidência. O deslocamento dos espectros para comprimentos de onda maiores implica no aumento do tamanho longitudinal das nanoestruturas durante o processo de síntese dos nanobastões. Adaptado de Melnikau *et al.* ¹¹⁰ 25
- Figura 4.** Estrutura molecular de um fosfolipídio insaturado, destacando os grupos químicos pertencentes a região polar (cabeça) e apolar (caudas). 27
- Figura 5.** Representação das diferenças estruturais e moleculares presentes nos compartimentos celulares de bactérias (a) Gram-negativas e (b) Gram-positivas. 29
- Figura 6.** Representação da complexidade estrutural da membrana plasmática de uma célula eucariótica. 31
- Figura 7.** Representação do método de Wilhelmy para mensurar a pressão superficial da monocamada lipídica, por meio da imersão parcial de uma placa de platina sobre a subfase aquosa. 33
- Figura 8.** Representações da (a) cuba de Langmuir, por meio da qual são produzidos as (b) monocamadas lipídicas, e (c) isotermas π -A, das quais são possíveis determinar as transições de fases e grau de empacotamento dos filmes durante a compressão das barreiras. 35
- Figura 9.** Representação para filmes (a) LB e (b) LS, demonstrando as transferências verticais e horizontais de uma monocamada na interface ar-água e os suportes sólidos (substratos), respectivamente. Adaptado de Oliveira Jr. *et al.* ¹³⁸ 36
- Figura 10.** Ilustração dos parâmetros experimentais da espectroscopia PM-IRRAS, posicionada sobre a cuba de Langmuir. 39
- Figura 11.** Esquema ilustrando o princípio da reflexão e refração da luz, comparando (a) a refração de luz não polarizada; (b) a refração de luz polarizada ao incidir no ângulo de

Brewster; e (c) a reflexão da luz polarizada em um microscópio especializado para análise no ângulo de Brewster. 41

Figura 12. Representação esquemática simplificada da configuração experimental. (a) Síntese e caracterização das AuSHINRs. (b) Interações e fotorreações à nível molecular entre AuSHINRs e filmes de Langmuir, e estruturas moleculares dos fosfolipídios estudados. (c) Atividade antimicrobiana das AuSHINRs aplicadas em culturas *in vitro* de *Escherichia coli*. 48

Figura 13. (a) Espectros de extinção UV-Vis de AuNRs e AuSHINRs, ambos diluídos em água ultrapura (1:1 v/v). (b) Imagens de TEM registradas para AuNRs (i e ii) e AuSHINRs (iii e iv). (c) Aquecimento fotoinduzido desencadeado pelas AuSHINRs usando uma fonte de LED de 630 nm (20 mW/cm²). As quedas destacadas na temperatura são devidas à interrupção momentânea da irradiação, subsidiando o efeito de conversão de luz em calor. 50

Figura 14. Histogramas da distribuição de tamanho calculados para AuNRs e AuSHINRs a partir de imagens de TEM. Tamanhos médios do (a) comprimento (L), (b) largura (W) e (c) espessura da camada de sílica (SS). 51

Figura 15. Isotermas π -A das monocamadas de (a) DOPE, (b) Lysyl-PG, (c) DOPG e (d) CL em água ultrapura e AuSHINRs ($1,2 \times 10^{10}$ AuSHINRs/mL). A compressão coloidal é fornecida como referência não tensoativa. 53

Figura 16. Os filmes LS depositados em subfase de (esquerda) água ultrapura e (direita) solução de AuSHINRs foram monitorados até 40 camadas. Os espectros UV-Vis foram lidos a cada 5 camadas para as monocamadas puras de (a) DOPE, (b) Lysyl-PG, (c) DOPG e (d) CL, e monocamadas em suspensão coloidal de (e) DOPE + AuSHINRs, (f) Lysyl-PG + AuSHINRs, (g) DOPG + AuSHINRs e (h) CL + AuSHINRs LS films. 55

Figura 17. Espectros FTIR dos grupos polares da cabeça e alifáticos das cadeias carbônicas dos filmes LS de DOPE e Lysyl-PG, em água ultrapura e suspensão coloidal de AuSHINRs. Os espectros FTIR foram coletados a partir de 40 camadas depositadas em substrato de Ge. O espectro dos filmes *drop-casting* das AuSHINRs (azul) é fornecido como referência. 57

Figura 18. Espectros FTIR dos grupos polares da cabeça e alifáticos das cadeias carbônicas dos filmes LS de DOPG e CL, em água ultrapura e suspensão coloidal de AuSHINRs. Os espectros FTIR foram coletados a partir de 40 camadas depositadas em substrato de Ge. O espectro dos filmes *drop-casting* das AuSHINRs (azul) é fornecido como referência. 57

Figura 19. Representação esquemática dos mecanismos de inserção entre AuSHINRs e monocamadas de (a) DOPE e (b) DOPG. 59

Figura 20. Evolução das áreas moleculares relativas (A/A_0) das monocamadas de Langmuir de (a) DOPE, (b) Lysyl-PG, (c) DOPG e (d) CL, irradiadas e não irradiadas, em subfase de AuSHINRs ($1,2 \times 10^{10}$ AuSHINRs/mL). A_0 é a área molecular extrapolada das isotermas em 30 mN/m. 60

Figura 21. Espectros de absorção das AuSHINRs ($1,2 \times 10^{10}$ AuSHINRs/mL) na presença de DPBF medidos a cada 10 segundos durante a irradiação com uma fonte de LED de 630 nm (20 mW/cm^2). 61

Figura 22. Fotografias retiradas das placas de cultura 24 horas posteriormente à técnica de contagem de placa por gota (diluições de 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} e não diluído), cujo meio bacteriano foi incubado com AuSHINRs na (a) ausência e (b) presença de luz irradiante (170 mW/cm^2), com (c) apenas meia de cultura (controle negativo) e (d) tetraciclina (controle positivo). (e) Porcentagem de crescimento bacteriano dos poços celulares, irradiado e não irradiado, na ausência e presença de AuSHINRs. 63

Figura 23. (a) Espectros de UV-Vis das AuNRs, AuSHINRs e AuSHINRs@TBO, todas diluídas em água ultrapura (1:1 v/v). (b) Imagens de TEM capturadas para (i) AuNRs, (ii) AuSHINRs e (iii) AuSHINRs@TBO. (c) Espectro de fluorescência das AuSHINRs, solução de TBO (10^{-3} mol/L) e coloide de AuSHINRs@TBO, respectivamente. O gráfico inserido mostra o aquecimento fotoinduzido das AuSHINRs e AuSHINRs@TBO com uma fonte de LED de 630 nm (20 mW/cm^2). 70

Figura 24. Histogramas ilustrando a distribuição de tamanho das AuSHINRs e AuSHINRs@TBO foram gerados com base nas imagens de TEM. As dimensões médias de ambos (a,c) comprimento (L), (b,d) largura (W) e (e,f) espessura da camada de sílica foram determinadas. 71

Figura 25. (a) Isotermas π -A do extrato lipídico de Caco-2, da dispersão da solução de coloide de AuSHINRs@TBO e misturas de Caco-2: AuSHINRs@TBO (10:1, 5:1 e 1:1 v/v) em PBS. (b) Imagens de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) registradas em 0 e 30 mN/m para (i, ii) extrato lipídico de Caco-2 e (iii, iv) misturas de Caco-2: AuSHINRs@TBO (1:1 v/v). 73

Figura 26. Espectros de PM-IRRAS registrados para o extrato lipídico de Caco-2 puro e monocamadas de AuSHINRs@TBO: Caco-2 (1:1 v/v), antes e depois da irradiação. As medições foram realizadas em subfase de PBS a 30 mN/m. Os espectros foram divididos para destacar os modos vibracionais das (a) cabeças polares e (b) cadeias alifáticas. ... 75

Figura 27. Progressão da área relativa (A/A_0) de monocamadas de Caco-2: AuSHINRs@TBO (1:1 v/v) irradiadas e não irradiadas registradas em 30 mN/m. 77

Figura 28. Representação esquemática do mecanismo de foto-oxidação de AuSHINRs@TBO em monocamadas de extrato lipídico de Caco-2. 78

Figura 29. Viabilidade celular de Caco-2 após exposição a (a) AuSHINRs e (b) AuSHINRs@TBO irradiados e não irradiados em proporções de diluição volumétrica (v/v) de 1:10, 1:9, 1:8 e 1:7 no meio de cultura. 79

Figura 30. Microscopias confocais do controle celular de Caco-2 e da incubação de 24 horas com AuSHINRs e AuSHINRs@TBO irradiados e não irradiados em proporções de diluição de 1:9 e 1:8 v/v. Irradiação em 640 nm com uma irradiância de 20 mW/cm². O núcleo foi marcado usando DAPI (em azul), e a membrana foi corada com WGA (em verde). 80

Lista de tabelas

Tabela 1. Potencial zeta e dimensões média das AuNRs e AuSHINRs.	51
Tabela 2. Mudanças relativas reportadas nas áreas ocupadas por lipídios $(A-A_0)/A_0$ induzidas pela inserção de AuSHINRs. A_0 e A são as áreas extrapoladas à 30 mN/m em água ultrapura e solução de AuSHINRs, respectivamente.	53
Tabela 3. Atribuições dos principais modos vibracionais dos filmes LS de DOPE, Lysyl-PG, DOPG e CL depositados em subfases de água ultrapura e AuSHINRs.	58
Tabela 4. Diâmetro hidrodinâmico (nm) medido por espalhamento dinâmico de luz (DLS) para cada etapa realizada para limpar e concentrar as AuSHINRs@TBO.....	67
Tabela 5. Potencial zeta e espessura média da camada de sílica das AuSHINRs e AuSHINRs@TBO.	72
Tabela 6. Os deslocamentos relativos na área por lipídio $[(A-A_0)/A_0] \times 100$, induzidos pela incorporação de AuSHINRs@TBO. A_0 é a área extrapolada em 30 mN/m em PBS, e A é a área correspondente na presença de AuSHINRs@TBO.....	73
Tabela 7. Atribuições dos principais modos vibracionais das monocamadas de extrato lipídico de Caco-2 puro e deslocamentos induzidos pela incorporação de AuSHINRs@TBO (1:1 v/v) e irradiação.	75

Sumário

1. Capítulo I: conceitos teóricos	17
1.1. Introdução	17
1.2. Terapia fotodinâmica (TFD)	19
1.3. Terapia Fototérmica (TFT)	23
1.4. Membrana plasmática	26
1.5. Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS)	31
1.6. Espectroscopia no infravermelho	37
1.7. Microscopia de ângulo de Brewster (BAM)	39
2. Capítulo II: resultados fotoquímicos desencadeados por nanobastões de ouro recobertos com sílica em nanoarquitetura bioinspirada para membranas bacterianas	42
2.1. Introdução	42
2.2. Materiais e Métodos	44
2.2.1. Reagentes	44
2.2.2. Síntese e caracterização das nanobastões de ouro revestidos com sílica (AuSHINRs)	44
2.2.3. Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS)	46
2.2.4. Avaliação da geração de oxigênio singlete ($^1O_2$)	46
2.2.5. Atividade microbiana	47
2.3. Resultados e Discussão	49
2.3.1. Nanobastões de ouro recobertos com sílica (AuSHINRs)	49
2.3.2. Inserção das AuSHINRs nas membranas inspiradas em bactérias	52
2.3.3. Efeitos fotoinduzidos em monocamadas lipídicas desencadeados por AuSHINRs.	60
2.4. Conclusões	64
3. Capítulo III: potencializando a fototoxicidade em células tumorais colorretal humana através da nanoarquitetura para sinergia entre as terapias fototérmicas e fotodinâmicas	65
3.1. Introdução	65
3.2. Materiais e Métodos	66
3.2.1. Preparação e caracterização de nanobastões de ouro recobertos com sílica e conjugados com azul de toluidina (AuSHINRs@TBO)	66
3.2.2. Cultura celular de Caco-2	67
3.2.3. Extração lipídica de Caco-2	68
3.2.4. Monocamadas de Langmuir e caracterização do extrato lipídico de Caco-2	68

3.3.	Resultados e discussão.....	69
3.3.1.	<i>Nanobastões de ouro recobertos com sílica e conjugados com azul de toluidina-O (AuSHINRs@TBO).....</i>	69
3.3.2.	A incorporação de AuSHINRs@TBO em monocamadas de Langmuir de Caco-2 72	
3.3.3.	<i>Efeitos fotoinduzidos por AuSHINRs@TBO em monocamadas de extrato lipídico de Caco-2</i>	76
3.3.4.	<i>Impacto fotoinduzido em culturas de células Caco-2 por AuSHINRs@TBO</i>	78
3.4.	Conclusões.....	81
4.	Considerações Finais.....	82
5.	Referências.....	86

Siglas

$^1\text{O}_2$	oxigênio singleto
AFT	agentes fototérmicos
AuNPs	nanopartículas de ouro
AuNRs	nanobastões de ouro
AuSHINRs	nanobastões de ouro recobertos com sílica
BAMm	microscopia de ângulo de Brewster
CL	cardiolipina, 1'-3'-bis [1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo]-glicerol
CTAB	brometo de hexadeciltrimetilamônio
DLS	espalhamento dinâmico de luz
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOPG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG)
DPBF	1,3-ifenilisobenzofurano
FS	fotosensibilizador
FTIR	espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
LB	Langmuir-Blodgett
LS	Langmuir-Schaefer
LSPR	ressonância plasmônica de superfície localizada
Lysyl-PG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(3-lisil(1-glicerol))]
MB	azul de toluidina
ME	membrana plasmática externa
MI	membrana plasmática interna
MP	membrana plasmática
PE	fosfatidiletanolaminas
PG	fosfatidilgliceróis
PM-IRRAS	espectroscopia vibracional de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada
PS	fosfatidilserinas
ROS	espécies reativas de oxigênio
TBO	azul de toluidina-O

TEM	microscopia eletrônica de transmissão
TFD	terapia fotodinâmica
TFT	terapia fototérmica
UFC	unidades formadoras de colônia

1. Capítulo I: conceitos teóricos

1.1. Introdução

O surgimento de resistência a fármacos representa um desafio significativo à saúde pública durante o tratamento de diversas doenças, especialmente daquelas que apresentam maior letalidade, como infecções bacterianas e neoplasias^{4,5}. Em ambos os casos, a ocorrência de mutações genéticas desempenha papel crucial ao impedir a eficácia do princípio ativo, seja pela redução da expressão de enzimas e receptores celulares, ou pela redução na expressão canais de entrada intracelular^{6,7}. Durante o tratamento quimioterápico, é comum que tumores se tornem resistentes ao tratamento devido à sua capacidade mutagênica, que altera a sua morfologia e os torna não responsivo às abordagens convencionais⁸. Por outro lado, o surgimento da resistência bacteriana está intimamente relacionado ao uso indiscriminado e à exposição excessiva a antibióticos^{9,10}. Nesse contexto, as bactérias naturalmente resistentes são selecionadas em populações heterogêneas, proliferando e replicando os fatores de resistência, resultando em cepas bacterianas super-resistentes ou multirresistentes¹¹. Diante disso, novas modalidades terapêuticas têm sido almejadas, visando contornar tais resistências e potencialmente substituir métodos convencionais no tratamento de doenças⁵. Entre essas abordagens, as terapias fotoinduzidas têm se destacado como promissoras, uma vez que utilizam da incidência de uma luz não ionizante e possui ação localizada, oferecendo alternativas eficazes para superar a resistência aos fármacos¹²⁻¹⁵.

Dentre as terapias, a terapia fotodinâmica (TFD) tem se destacado como uma abordagem terapêutica eficaz na inativação de células malignas, diferenciando-se por não depender da internalização celular dos fotossensibilizadores (FSs)¹⁶⁻¹⁸. A TFD consiste na administração controlada de FS próximo ao alvo terapêutico, os quais são excitados por uma fonte de luz apropriada até alcançarem o estágio tripleto, reagindo com o oxigênio molecular presente no ambiente e gerando espécies reativas de oxigênio (ROS)¹⁹. Essas ROS são responsáveis por reagir com as estruturas moleculares próximas, desencadeando uma série de reações oxidativas degenerativas que podem comprometer as membranas e organelas, levando a morte celular^{18,20}. Entre as diferentes ROS, o oxigênio singleto (¹O₂) destaca-se como principal agente citotóxico, capaz de oxidar estruturas biológicas, como proteínas, fosfolípidios, organelas e ácidos nucleicos, sendo,

portanto, a principal via oxidativa almejada pela terapia²¹. Neste contexto, o azul de toluidina-O (TBO) emerge como um importante FS pertencente à família dos fenotiazínicos, devido às suas propriedades químicas fundamentais para a TFD²². O TBO apresenta baixa toxicidade a células saudáveis, propriedades hidrofílicas, baixa energia de excitação ($\lambda = 630 \text{ nm}$) no espectro visível e alto rendimento quântico de oxigênio singleto ($\Phi^1\text{O}_2\Delta = 0,86$)^{22,23}.

Por outro lado, a terapia fototérmica (TFT) também emerge como uma abordagem terapêutica promissora, com a vantagem de além de não depender da internalização celular, produz efeito inibitório mesmo na ausência de oxigênio molecular circulante²⁴. Isso a torna particularmente vantajosa para o tratamento de tumores hipóxicos, que frequentemente apresentam maior resistência aos tratamentos convencionais^{25,26}. A técnica consiste na dispersão e absorção da luz incidente por agentes fototérmicos, o que induz a oscilação coerente dos elétrons livres na banda de condução e consequente aquecimento localizado²⁷. O aumento da temperatura em dezenas de graus resulta em um processo hipertérmico, levando à desnaturação de proteínas, plasmólise da membrana plasmática e alterações no material genético²⁸. As nanopartículas de ouro (AuNPs) destacam-se como ótimos agentes fototérmicos devido a suas propriedades químicas e ópticas únicas, incluindo a resistência à corrosão, baixa toxicidade a células mamíferas, alta seletividade e ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) ajustável²⁹. Esta última está relacionada com a capacidade de conversão da luz irradiada em calor por meio da ressonância eletrônica a um comprimento de onda específico. A capacidade de ajustar o LSPR nos termos das dimensões das partículas permite alcançar uma alta eficiência de conversão de luz em uma região de baixa energia, como o infravermelho próximo²⁸. Dentro das diferentes classes de AuNPs, os nanobastões de ouro (AuNRs) se destacam, pois, seu LSPR abrange uma ampla faixa do espectro infravermelho e infravermelho próximo, permitindo ajustes simples em seu comprimento longitudinal e transversal^{30,31}. Essa característica é ideal para aplicações *in vivo*, pois o comprimento de onda da luz nessa região ultrapassa a penetração limitada da luz visível nos tecidos, evitando a excitação de moléculas e organelas naturalmente fotossensíveis, e alcançando o que é denominado como janela terapêutica³².

Em busca de potencializar o efeito inibitório sobre células malignas, neste trabalho será analisada a sinergia entre as TFD e TFT, combinando as AuNRs com moléculas de

TBO. Para isso, as AuNRs serão revestidas com uma camada de sílica (AuSHINRs), transparente à luz, visando garantir maior estabilidade e evitar a agregação das partículas em meio celular, além de oferecer resistência a diferentes variações de pH^{33,34}. Posteriormente, as AuSHINRs serão conjugadas com TBO e novamente revestidas com uma camada de sílica, formando um complexo (AuSHINRs@TBO) ajustado para que ambas as estruturas sejam responsivas pelo mesmo comprimento de onda de luz, promovendo assim sinergia entre a TFD e TFT. A membrana plasmática é conhecida por ser o principal alvo das terapias fotoinduzidas, sendo uma barreira natural para aplicações terapêuticas, com complexidade e composição variáveis de acordo à célula alvo^{6,7}. Essa diversidade representa um desafio a ser superado para a compreensão dos mecanismos de interação e fotoindução das AuSHINRs@TBO no processo de indução de morte celular. Por essa razão, sistemas miméticos de membrana serão empregados para estudar os mecanismos sinérgicos em nível molecular, utilizando filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS)³⁵. Esses sistemas permitem mimetizar as propriedades físico-químicas da membrana plasmática, facilitando a investigação dos processos de interação e fotoindução das partículas complexadas em ambiente controlado e reprodutível.

1.2.Terapia fotodinâmica (TFD)

A terapia fotodinâmica (TFD) emerge como uma técnica promissora na inativação e indução de morte celular, capaz de ser aplicada no tratamento de doenças severas como o câncer e infecções por bactérias multirresistentes³⁶⁻³⁸. Seu método pouco invasivo em relação aos tratamentos convencionais destaca-se como importante vantagem terapêutica, cuja ação independe da internalização molecular, mas do dano fotodinâmico induzido sobre estruturas biológicas¹⁷. Historicamente, foi empregada por sociedades ancestrais, como Egito, Grécia, Índia e China, nas quais a luz solar era utilizada no tratamento de doenças tópicas, como vitiligo, psoríase e tumores epidérmicos^{39,40}. Somente em 1907, proposto por von Tappeiner, o termo “fotodinâmica” ganhou relevância ao tentar diferenciar as reações fotossensibilizadoras na biologia daquelas outras reações químicas de emulsão em filmes fotográficos⁴¹, sendo mais adiante aprimorada sua definição para reações fotoquímicas consumidoras de moléculas de oxigênio⁴². Embora a TFD tenha raízes históricas, sua relevância ganhou destaque apenas nas últimas duas décadas,

impulsionada por estudos científicos que se dedicaram a otimizar os efeitos fotorreativos e amplificar o efeito inibitório sobre células alvo¹⁸.

A TFD pode ser sintetizada na interação mútua de três componentes para a promoção do efeito fototóxico, sendo estes os fotossensibilizadores (FSs), as moléculas de oxigênio presentes no ambiente celular e uma fonte de luz (Figura 1a)^{19,43,44}. Os FSs são moléculas chave para a reação fotodinâmica, uma vez que intermedem as interações dos demais componentes. Quando excitados por uma fonte de luz, a um comprimento de onda específico, parte da energia absorvida é transferida para as moléculas de oxigênio, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS)¹⁸. Os FSs são classificados quanto a sua origem, como endógenos ou sintéticos^{45,46}, e as suas características intrínsecas, como potencial fotoquímico, pureza, estabilidade, solubilidade, fotodegradação e estrutura molecular^{43,47-51}. A possibilidade de edição química destas estruturas permitiu a formação de diversas famílias de FSs baseados em grupos moleculares funcionais, tais como as porfirinas, clorinas, cianinas, xantenicos e fenotiazinicos⁵². Novos FSs são classificados conforme essas moléculas foram aprimoradas com o tempo, sendo nominadas como compostos de primeira, segunda e terceira geração⁵³. Algumas das vantagens alcançadas com as novas moléculas sintetizadas são a baixa toxicidade aos tecidos saudáveis, adequada solubilidade, alta seletividade à adesão em células alvo, fotodegradação prolongada e alto rendimento quântico na geração de ROS⁵².

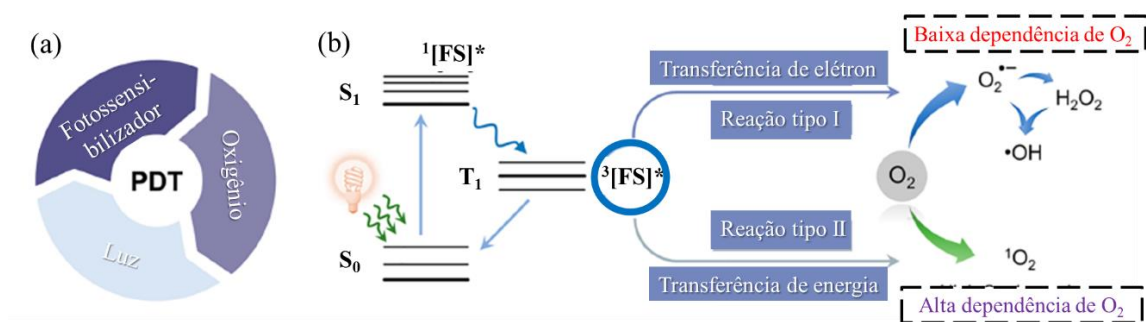


Figura 1. (a) representação dos três componentes fundamentais da TFD: fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio. (b) demonstração simplificada do diagrama de Jablonski e rotas (tipos I e II) para geração de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Li *et al.*⁵⁴

As reações com o oxigênio circulante podem ocorrer por duas vias distintas, sendo denominadas reações de tipo I e tipo II (Figura 1b)⁴². A primeira etapa de excitação do FS é a mesma para ambas as reações, onde este absorve a radiação da luz incidente,

elevando os elétrons da nuvem eletrônica à orbitais mais energéticos, de maneira que a molécula deixa o estágio singleto fundamental (S^0) para o estágio singleto excitado (S^1)⁵³. Por ser bastante instável nesse estágio, parte dessa energia retorna a seu nível fundamental pela emissão de fluorescência. Eventualmente, os elétrons do orbital mais energético das moléculas S^1 podem sofrer inversão do spin, permitindo um cruzamento intersistema para o estágio tripleto excitado (T^1), a forma terapêutica do composto^{55,56}. Por ser um estágio cujo tempo de vida é mais longo, permite-se que T^1 interaja com o oxigênio molecular (O_2) do ambiente e produza as ROS através dos dois mecanismos citados⁵⁴. As reações de tipo I ocorrem por meio da transferência de elétrons de T^1 para o O_2 , produzindo radicais livres como hidroxilas ($OH^\cdot$), superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A própria geração de $O_2^{\cdot-}$ induz a formação de outros radicais, como as $OH^\cdot$, por essa razão esse tipo de reação é classificado como de baixa dependência de O_2 ⁵⁴. Por outro lado, as reações tipo II ocorrem por meio da transferência da energia de excitação, gerando oxigênio singleto ($^1O_2$). Esse processo demanda uma interação contínua com O_2 molecular e, por essa razão, é denominado como reação altamente dependente de O_2 ⁵⁴. Sabe-se que as moléculas de $^1O_2$ são mais citotóxicas e reativas às estruturas celulares, sendo o mecanismo tipo II o mais visado na TFD⁵⁷. Além disso, o $^1O_2$ tem um tempo de vida curto em sistemas biológicos (<0,04 microssegundos) e, portanto, possui curto raio de atuação (<0,02 μm), permitindo que a técnica atue de maneira localizada⁴².

O azul de toluidina-O (TBO) é um FS amplamente investigado na TFD^{22,58} e aplicado em diversas funções, como corante metacromático⁵⁹ e sistemas de conversão e armazenamento de energia⁶⁰. Trata-se de uma molécula sintética, catiônica, da família dos fenotiazínicos, com distribuição planar dos átomos⁶¹(Figura 2). Além disso, apresentam propriedades relevantes para a indução fotodinâmica, como um baixo custo⁶², pouca toxicidade a células mamíferas⁶³, solubilidade em água, alta afinidade à ácidos nucleicos do DNA⁶⁴, às membranas de polissacarídeos²³ e células tumorais⁶⁵, além de um elevado rendimento quântico na geração de oxigênio singleto ($\Phi\Delta$, entre 0,2 - 0,9, conforme o pH do meio) e baixa energia de excitação ($\lambda = 626 \text{ nm}$)^{66,67}. Este último traz como vantagem a aplicação de uma fonte de luz não ionizante sobre o sistema terapêutico, englobando a região da luz visível que é pouco reativa com fluoróforos naturais das células e baixa interação com moléculas de água, compreendendo o intervalo da janela terapêutica⁶⁸. O TBO empregado como FS apresenta um satisfatório efeito inibitório, cuja

aplicação se estende aos mais diversos organismos, como fungos⁶⁹, bactérias Gram-positivas⁶⁶, Gram-negativas⁷⁰ e células tumorais^{65,68}.

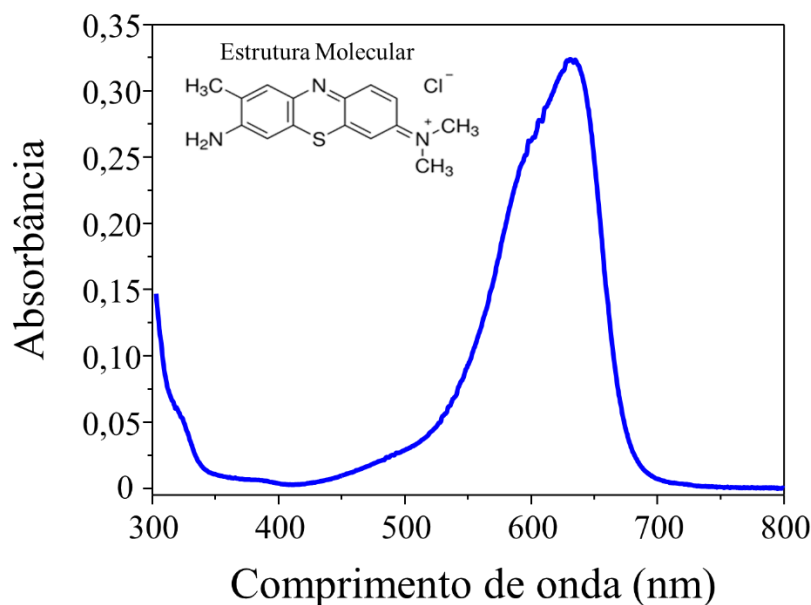


Figura 2. Estrutura molecular e espectro de absorvância de TBO a uma concentração de 10^{-5} mol/L.

A busca por melhor seletividade e adesão dos FSs às células alvo é relevante para o aprimoramento da TFD, visando um aumento do potencial inibitório sem gerar graves danos aos tecidos saudáveis^{52,71}. Para isso, é fundamental o conhecimento sobre a estrutura biológica alvo, assim como da molécula fotossensibilizadora. Nesse contexto, a nanotecnologia emerge como uma técnica promissora, pois a síntese e conjugação de nanopartículas com FS demonstra potencial para criar agentes foto-indutores de alta especificidade celular^{53,72–74}. Estudos recentes demonstram que as reações de hidroxidação e clivagem nas insaturações de cadeias de fosfolipídios são os prováveis produtos de reações fotoquímicas envolvendo FSs^{22,75–80}. Entretanto, as interações a nível molecular e os produtos fotoinduzidos de estruturas complexas ainda são pouco explorados.

1.3. Terapia Fototérmica (TFT)

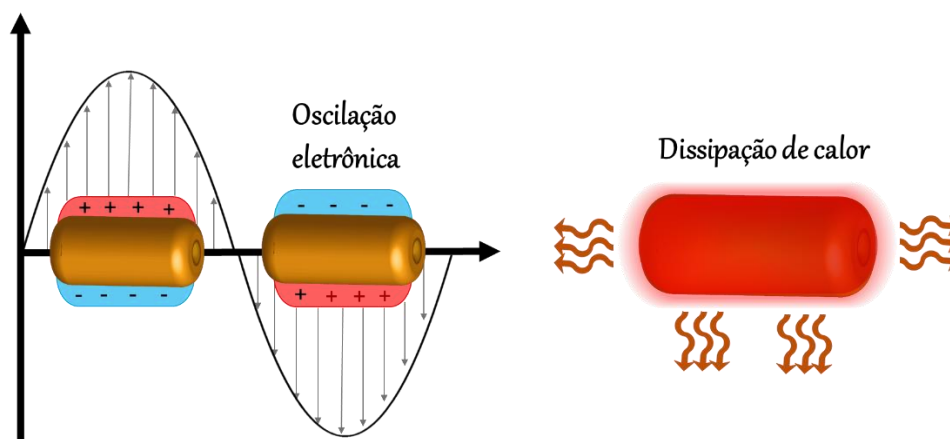
A terapia fototérmica (TFT) se destaca como uma técnica promissora para geração de calor *in situ*, fundamentada no uso de luz em conjunto com agentes fototérmicos (AFT) que atuam diretamente sobre um alvo celular específico. Indícios históricos apontam o uso de terapias térmicas para o tratamento de enfermidades, como doenças tóxicas e câncer de mama, ainda que realizadas por meios rudimentares às técnicas atuais, utilizando chamas e materiais incandescentes^{81,82}. Mais adiante, com os avanços no estudo da hipertermia, novas técnicas ganharam notoriedade na inativação celular, principalmente no combate a células tumorais, tais como as toxinas indutoras de febre⁸³, radiofrequência termal⁸⁴, ondas ultrassônicas, campos magnéticos^{81,85} e fototerapia⁸⁶. Com o surgimento das técnicas de quimioterapia e radioterapia, houve uma redução do interesse clínico nestas técnicas e demais métodos antitumorais, uma vez que estes novos se mostraram mais promissores no combate a diversos tipos de câncer. Entretanto, ao longo do tempo notou-se que tanto a radioterapia quanto a quimioterapia impactavam negativamente na qualidade de vida de pacientes⁸⁷. Sendo assim, a busca por métodos alternativos, de boa eficácia, menos invasivos e poucos efeitos adversos, tornou-se relevante na medicina, retornando o foco para a hipertermia^{88,89}.

As vantagens da TFT estão relacionadas à ação localizada, à baixa invasividade e à independência em relação às moléculas de oxigênio, o que permite a atuação sobre tumores hipóxicos, não responsivos à TFD^{24,26,90-92}. No caso de AFTs orgânicos, a absorção da luz irradiante resulta nas oscilações energéticas dos elétrons livres na banda de condução, transacionando do estado fundamental para o estado excitado e, eventualmente, retornando ao estágio fundamental^{93,94}. Este processo gera um aumento da energia cinética localizada, levando a um superaquecimento ao redor dos AFTs. A elevação de temperatura para a faixa de 40-47 °C provoca a morte celular em poucos minutos^{95,96}, resultando em danos irreversíveis, tais como a permeabilização da membrana plasmática, desnaturação de proteínas essenciais e modificações no DNA⁹⁷⁻⁹⁹. Além disso, a absorção da luz na região do infravermelho próximo é importante, pois otimiza a penetração da luz no organismo, aproveitando a chamada “janela terapêutica”. Nessa faixa de comprimento de onda, a absorção da luz pelos cromóforos dos tecidos e pelas moléculas de água é mínima, permitindo que a maior parte da luz incidente seja efetivamente absorvida pelos AFTs, maximizando assim o potencial terapêutico da TFT¹⁰⁰. Entretanto, a maioria das moléculas orgânicas carecem de estabilidade durante o

processo de irradiação, resultando no fotobranqueamento e fotodegradação destas estruturas.¹⁰¹

Nesse contexto, as nanopartículas de metais nobres, como nanopartículas de prata e ouro, surgem como AFTs mais promissoras, devido uma série de características únicas²⁷. Em primeiro lugar, suas seções de choque de absorção e espalhamento de luz são significativamente aumentadas, cerca de quatro a cinco vezes maiores do que as oferecidas por corantes convencionais⁸¹. Além disso, essas nanopartículas demonstram uma notável fotoestabilidade, não sofrendo os efeitos de foto-branqueamento observados em outros materiais³. Ademais, possuem a capacidade de absorver luz na região do visível e do infravermelho próximo⁸¹. Esse amplo espectro de absorção de luz é possibilitado por um fenômeno ótico conhecido como ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR)^{102,103}. O LSPR está relacionado à capacidade das nanopartículas de absorver e espalhar a luz e promover oscilações coerentes dos elétrons livres da banda de condução dos metais, cuja amplitude torna-se máxima a uma determinada frequência da luz incidente¹⁰⁴, conforme ilustra a Figura 3a. A energia obtida pelas oscilações transforma-se em calor e é retida pelas partículas por meio do relaxamento elétron-fônon, que por sua vez é dissipado das partículas através do relaxamento fônon-fônon, levando a elevação de temperatura ao redor da partícula.²⁹ Vale ressaltar que cada nanopartícula apresenta características óptica únicas, uma vez que a frequência do LSPR varia conforme o material, tamanho e forma da partícula, além da constante dielétrica do meio circulante^{28,105}. No tratamento do câncer com TFT, as nanopartículas de ouro são particularmente notáveis por serem biologicamente inertes, atóxicas, de fácil síntese e apresentarem uma elevada relação superfície/volume^{106,107}. Além disso, a capacidade de ajuste do LSPR possibilita o desenvolvimento de diversas nanopartículas com propriedades únicas. Nesta categoria, destacam-se as nanopartículas esféricas (AuNPs), nanoconchas, nanobastões (AuNRs) e nanoestrelas (AuNSh)^{30,108,109}.

(a) Ressonância plasmônica de superfície localizada



(b) Espectro de extinção em UV-Vis

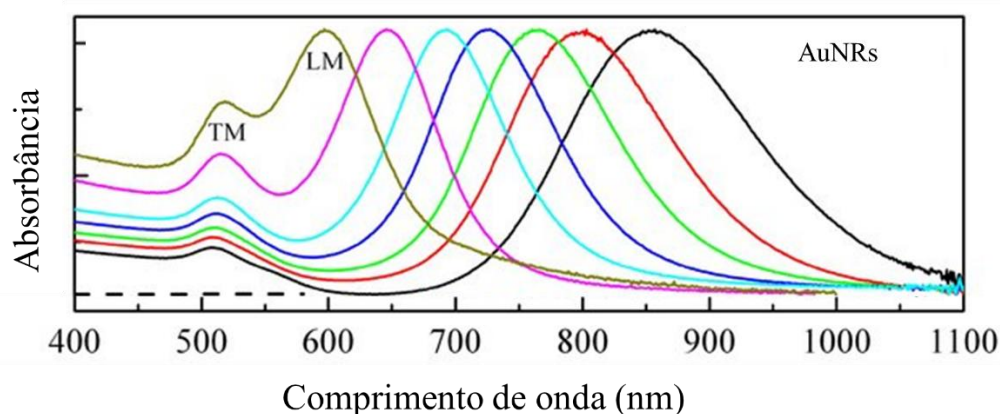


Figura 3. (a) representação da ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) e subsequente a liberação de energia térmica ao redor da nanopartícula. (b) espectros de extinção UV-Vis de AuNRs, cujas bandas de oscilações eletrônicas transversais (TM) e longitudinais (LM) estão em evidência. O deslocamento dos espectros para comprimentos de onda maiores implica no aumento do tamanho longitudinal das nanoestruturas durante o processo de síntese dos nanobastões. Adaptado de Melnikau *et al.*¹¹⁰

As nanopartículas de ouro no formato de bastão, conhecidas como AuNRs, são distinguidas por sua capacidade de abranger uma ampla faixa de comprimento de onda de LSPR, especialmente próximo à região do infravermelho^{31,111}. Essa característica é resultado direto da estrutura dos nanobastões, aos quais o LSPR divide-se em duas bandas distintas (Figura 3b). A primeira, de menor intensidade e comprimento de onda, situa-se na região do visível, em torno de 520 nm, e está associada às oscilações eletrônicas transversais. Por sua vez, a segunda banda é mais intensa e encontra-se na região do infravermelho próximo, relacionada com as oscilações longitudinais dos elétrons¹¹².

Estudos demonstram que o comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max}), logo o tamanho e forma dos bastões, podem ser alterados durante o processo de síntese destas nanopartículas, através do controle da concentração de alguns reagentes em solução, como por exemplo nitrato de prata e ácido cloroáurico^{108,113}. Porém, a aplicação *in vivo* das AuNRs enfrenta desafios significativos, principalmente devido à sua instabilidade em ambientes biológicos, como no soro e no sangue¹¹⁴. Essa instabilidade pode levar à dissociação, agregação e perda da eficiência fototérmica em meios contendo íons livres e variações de pH. Além disso, a toxicidade do surfactante utilizado na modelagem da forma bastão, sendo o CTAB o mais comum, representa uma preocupação adicional¹¹⁵⁻¹¹⁷. Para contornar esses obstáculos, estratégias de revestimentos das AuNRs têm sido exploradas. Agentes de revestimento, como derivados de polipeptídios e silicatos, mostram-se promissores para conferir estabilidade e segurança as AuNRs³⁴. Além disso, procedimentos como lavagens sucessivas e ressuspensão das partículas em meio livres de surfactantes contribuem para a minimização dos efeitos adversos. Neste contexto, o revestimento das AuNRs com sílica (AuSHINRs) se destaca como uma estratégia eficiente, uma vez que conferem a estabilidade desejada a essas partículas. Adicionalmente, este revestimento é biocompatível e hidrofílico, oferecendo excelente estabilidade química. A sílica também preserva a transparência à luz visível e interfere minimamente na absorção máxima das AuSHINRs, resultando em pouca alteração nas propriedades plasmônicas das AuNRs^{33,118}.

1.4.Membrana plasmática

No contexto das terapias TFD e TFT, a membrana plasmática (MP) destaca-se como principal barreira a ser enfrentada no processo de inativação celular, sendo responsável pela internalização e restrição de partículas ao meio intracelular. Além de atuar como barreira seletiva, a MP também confere proteção contra danos físicos e químicos, manutenção do metabolismo celular, regulação no transporte de substâncias e adesão celular^{119,120}. Esse amplo aspecto de funções biológicas está atrelado à complexidade de sua estrutura, cuja composição pode variar entre os diferentes tipos celulares, mas em geral, é composta por uma bicamada lipídica, onde estão incorporados proteínas e carboidratos. Os fosfolipídios são os principais constituintes das bicamadas nas MPs, desempenhando papéis importantes na sinalização e organização da membrana,

além de servir de ancoragem para as proteínas integrais e periféricas¹²¹. A Figura 4 mostra a estrutura molecular básica destes fosfolipídios, dividida em uma “cabeça” polar, voltadas para o meio aquoso interno e externo da célula, e duas “caudas” apolares, que se orientam no interior da membrana. A composição e organização dos fosfolipídios também dependem do tipo celular, que aqui são abordados de forma abrangente em duas vertentes: as células bacterianas e as células tumorais mamíferas¹²⁰.

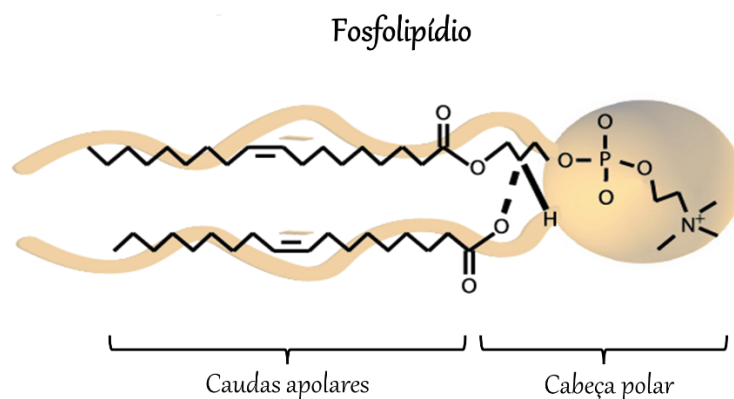


Figura 4. Estrutura molecular de um fosfolipídio insaturado, destacando os grupos químicos pertencentes a região polar (cabeça) e apolar (caudas).

1.4.1. Membrana plasmática de bactérias

O envelope celular das bactérias apresenta pouca complexidade ao se comparar com de células eucarióticas, devido ao seu sistema de vida simples e à sua natureza unicelular e procarionte¹²². Essa simplicidade abrange sua composição, organização e atribuição de propriedades únicas. As bactérias assumem tamanho e forma pré-definidas, podendo ser classificadas com base em sua morfologia, tais como cocos (ovais), bacilos (bastão), vibriões (bastões curvos) e espiraladas (espiral)¹²². Além disso, a complexidade de suas estruturas morfológicas também leva a uma classificação adicional, distinguindo entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas¹²³. Esta classificação foi proposta por Hans Christian Gram, que identificou as bactérias que retinham o corante violeta como Gram-positivas, enquanto as que não retinham eram consideradas Gram-negativas¹²⁴. Posteriormente, descobriu-se que essa capacidade de reter o corante está relacionada à composição do envelope celular desses organismos¹²⁵.

A parede celular é uma estrutura formada por peptidoglicano que envolve a membrana plasmática interna (MI), destacando-se por fornecer propriedades fundamentais para as bactérias. Entre essas propriedades, incluem-se fornecer proteção contra o ambiente extracelular hostil, promover a adesão e comunicação com células hospedeiras, a exposição de receptores para ação farmacológica e conferência de resistência à ação de antibióticos¹²⁶. A principal diferença estrutural entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas reside na espessura da camada de peptidoglicano, que varia de 20 a 100 nm nas Gram-positivas e poucos nanômetros nas Gram-negativas¹²² (Figura 5). Ademais, nas Gram-positivas, a presença de ácidos teicóicos sobre a parede celular, estas altamente carregadas negativamente, auxiliam no processo infeccioso e na aquisição de resistência à ação de medicamentos¹²². Por outro lado, nas Gram-negativas, essas bactérias estão envoltas por uma membrana externa (ME), uma bicamada heterogênea assimétrica, composta por uma camada externa de polissacarídeos e uma camada interna de fosfolipídios semelhantes à MI¹²⁷. A presença da ME proporciona uma maior proteção contra o ambiente e a ação farmacológica, e o transporte de moléculas do meio extracelular para o interior das bactérias é mediado pela presença de proteínas transportadoras transmembranas, denominadas porinas¹²⁸. A MI também consiste em uma bicamada, cuja composição de fosfolipídios é semelhante à das células eucarióticas, mas se diferencia pela ausência de colesterol e pela natureza da carga iônica, sendo a membrana plasmática predominantemente composta por lipídios aniônicos. Nas bactérias Gram-positivas, os fosfolipídios predominantes são os fosfatidilgliceróis (PGs) aniônicos, seguido por lisil-gliceróis (LPG) catiônicos e fosfatidiletanolaminas (PEs) zwitteriônicos¹²⁹. Por sua vez, as bactérias Gram-negativas são compostas principalmente por fosfolipídios PEs zwitteriônicos, seguido pelos aniônicos PGs e cardiolipina¹²⁹

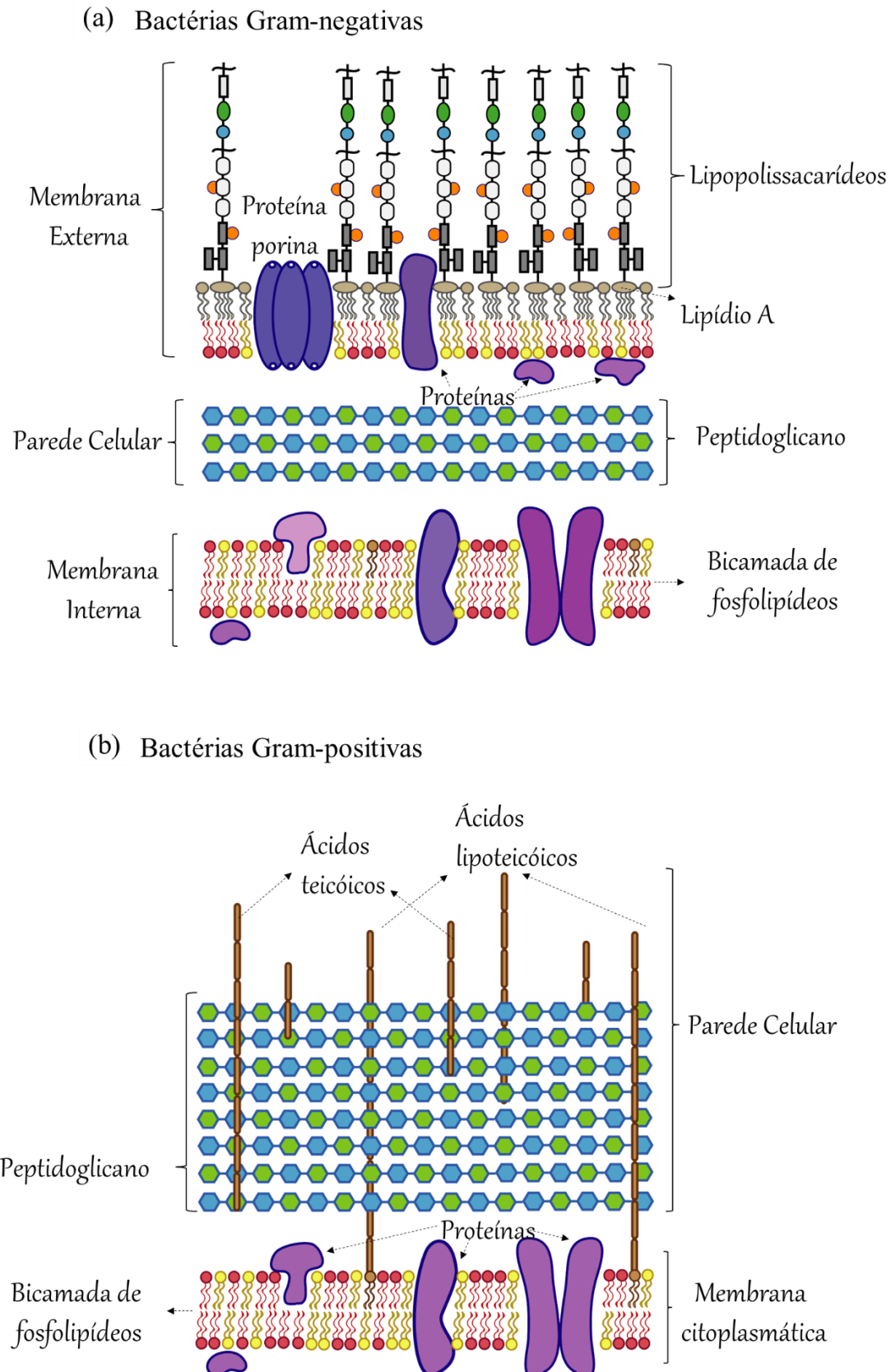


Figura 5. Representação das diferenças estruturais e moleculares presentes nos compartimentos celulares de bactérias (a) Gram-negativas e (b) Gram-positivas.

1.4.2. *Membrana plasmática de células tumorais*

Diferentemente das células procariontes, a MP das células eucarióticas possui composição e estrutura mais complexas, conforme ilustra a Figura 6¹³⁰. É constituída por uma bicamada lipídica heterogênea, formada principalmente por fosfolipídios, colesterol e esfingolipídios, formadora de uma barreira semipermeável ao redor da célula¹³¹. Essa bicamada é fluída, permitindo a movimentação lateral de lipídios dentro da camada, o que confere flexibilidade, fluidez e adaptabilidade¹³². Jangadas lipídicas são formadas a partir do agrupamento em domínios de componentes da membrana e difundem-se irrestritamente¹³³. Esses domínios são mais ordenados e empacotados do que a fase fluída da MP e são responsáveis pela ancoragem de proteínas específicas, que auxiliam em funções biológicas fundamentais para a célula, como processos de endocitose e sinalização de receptores de resposta imune¹³³. A composição lipídica é fundamental para diferenciar a organização molecular sobre a membrana plasmática, como no caso de as jangadas lipídicas serem formadas majoritariamente por fosfolipídios saturados, associados com moléculas de colesterol através de forças de Van der Waals¹³². Essa composição difere conforme o tipo celular, estado fisiológico e ambiente, podendo haver variações entre as camadas internas e externas em função de tais características.

As MP de células mamíferas possuem uma maior abundância por lipídios e proteínas, sendo estas responsáveis por ocupar cerca de 50% da matriz da membrana²⁵. Milhares de estruturas lipídicas foram identificadas nos mais variados tipos celulares, podendo estes serem classificados a partir dos grupos químicos presentes na porção polar, cadeias hidrocarbônicas, grau de insaturação, presença de quiralidade, ionização e concentração²⁵. Dentre eles, os glicerofosfolipídios, também chamados de fosfolipídios, são a classe predominante. Os mais abundantes na MP são as fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas e esfingomielinas na camada externa da bicamada, enquanto na camada interna as fosfatidilserinas estão em maior abundância¹³⁴. A migração de fosfatidilserinas para a camada externa pode indicar a ocorrência da morte celular programada ou progressão de câncer¹³⁵. Uma das mais importantes adaptações de tumores para resistir a resposta imune e a quimioterapia é seu metabolismo de alteração lipídica e, conseqüentemente, anormalidade na composição da MP. Sendo assim, a composição lipídica de uma célula tumoral será diferente de células saudáveis e, também, irá variar de acordo com o tipo de câncer¹³⁶. Ademais, a composição pode variar dependendo das

condições fisiológicas do câncer, como durante o processo de metástase, o conteúdo de colesterol na membrana é reduzido para aumentar a fluidez e plasticidade, permitindo a inserção de vasos sanguíneos¹³⁵. Além disso, uma estrutura desorganizada pode afetar significativamente na sinalização tumoral ao organismo e dificultar a ligação à fármacos de efeito terapêutico¹³⁵. Sendo assim, compreender de maneira geral a complexidade do perfil lipídico das células é fundamental para aprimorar as técnicas terapêuticas existentes, porém os estudos *in vivo* e *in vitro* à nível molecular mostram-se complexos e com restrições que ainda necessitam de solução¹³⁷.

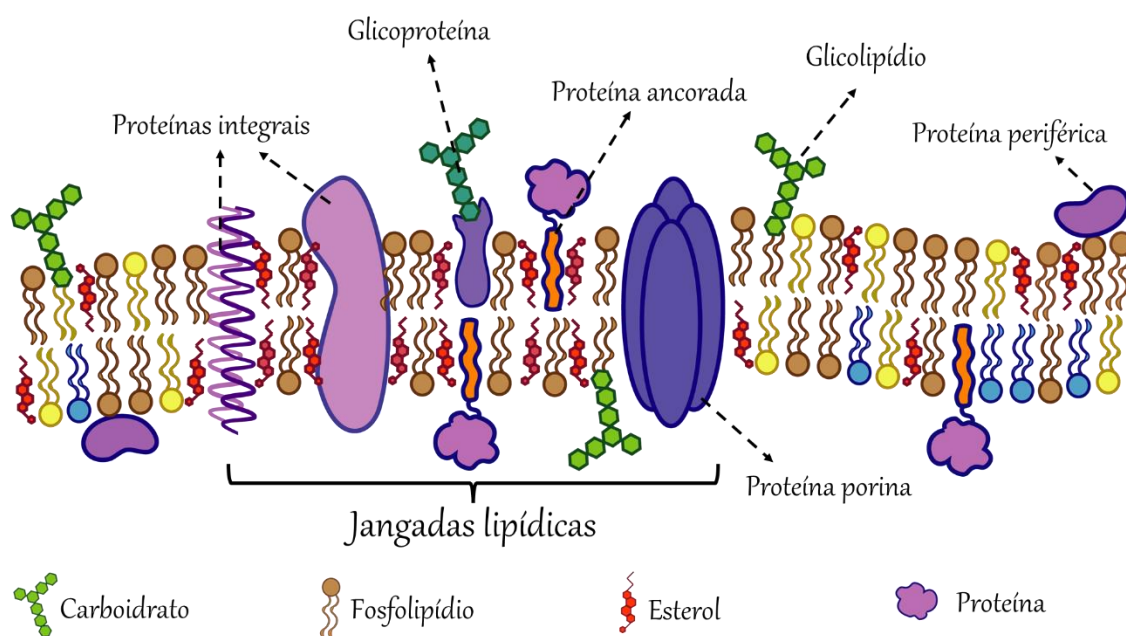


Figura 6. Representação da complexidade estrutural da membrana plasmática de uma célula eucariótica.

1.5. Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS) como modelos de membranas

Considerando a complexidade das membranas celulares e a dificuldade de estudar os efeitos de interação de moléculas e produtos oxidativos em nível molecular, torna-se necessário o emprego de métodos alternativos que mimetizem essa estrutura e proponham informações mais precisas. Nesse contexto, os filmes de Langmuir surgem como modelos promissores para mimetizar membranas complexas, através da formação de uma monocamada lipídica sobre uma interface ar/água¹³⁸. Inspirado pelos experimentos de Agnes Pockels, Irving Langmuir propôs estudos utilizando substâncias puras para a formação de filmes, comprovando a formação de monocamadas e estimando a orientação

delas na interface de uma cuba delimitada por barreiras móveis¹³⁹. Para isso, era necessário a utilização de moléculas que apresentassem equilíbrio entre os grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, de maneira que as estruturas sejam insolúveis e suficientemente capazes de ancorar-se sobre a superfície da água. Os fosfolipídios mostram-se como moléculas anfifílicas ideais para serem empregadas na confecção de filmes finos, devido à presença de uma cadeia carbônica e grupos polares na extremidade da cabeça. Naturalmente, essas substâncias estão na fase sólida em temperatura ambiente, sendo necessário uma diluição prévia em solvente orgânico volátil para a confecção de filmes de Langmuir¹³⁸. Para isso, o solvente precisa ter um coeficiente de espalhamento positivo S_c , calculado como:

$$S_c = \gamma_{w/air} - \gamma_{o/air} - \gamma_{w/o} \quad \text{Eq.1}^{138}$$

Onde $\gamma_{w/air}$, $\gamma_{o/air}$ e $\gamma_{w/o}$ são as tensões interfaciais ar/água, solvente orgânico/ar e água/solvente orgânico, respectivamente¹³⁸. Lembrando que a energia de superfície de Gibbs para uma interface de área A é γA , de maneira que cobrir a interface com o solvente orgânico produz baixa tensão superficial e promove o espalhamento espontâneo¹³⁸. Dentro dessas condições, o clorofórmio mostra-se um solvente ideal para diluição dos fosfolipídios, respeitando a condição do coeficiente de espalhamento.

A caracterização dos filmes ocorre através das isotermas de pressão de superfície (π) pela área ocupada (A), por meio das quais é possível definir a reorientação molecular, as transições de fase do filme e informações sobre a elasticidade. O cálculo de π é realizado a partir da subtração da tensão superficial da subfase (γ_o) pela tensão superficial da subfase contendo as moléculas anfifílicas (γ) que irão compor o filme, conforme demonstra:

$$\pi = \gamma_o - \gamma \quad \text{Eq.2}$$

A pressão superficial é medida pelo método de Wilhelmy, através do qual um sensor conectado a uma balança é imerso parcialmente na subfase, conforme ilustra a Figura 7. A tensão de superfície (T) e a força peso (P) atual sobre o sensor na vertical para baixo, deixando-o estável na subfase, essa que aplica uma força de empuxo (ε) contrária no sentido para cima. A força resultante (F_r) equivale a tração sobre o fio ligado a balança, conforme demonstra a equação 3. Em função dos parâmetros do sensor, pode-

se decompor tais forças em função da densidade (ρ_s), comprimento (l), largura (w) e espessura (t) do sensor. Também, leva-se em consideração as condições da subfase, como a altura do sensor imerso (h), a tensão superficial (γ_o) e a densidade (ρ) da fase líquida, e aceleração da gravidade (g). Sendo assim, deduz-se as equações^{140,141}:

$$F_r = P + T - \varepsilon \quad \text{Eq.3}$$

$$P = \rho_s \cdot g \cdot l \cdot w \cdot t \quad \text{Eq.4}$$

$$T = 2 \cdot (w + t) \cdot \cos\theta \cdot \gamma_o \quad \text{Eq.5}$$

$$\varepsilon = \rho \cdot g \cdot h \cdot w \cdot t \quad \text{Eq.6}$$

$$F_r = (\rho_s \cdot g \cdot l \cdot w \cdot t) + [2 \cdot (w + t) \cdot \cos\theta \cdot \gamma_o] - (\rho \cdot g \cdot h \cdot w \cdot t) \quad \text{Eq.7}$$

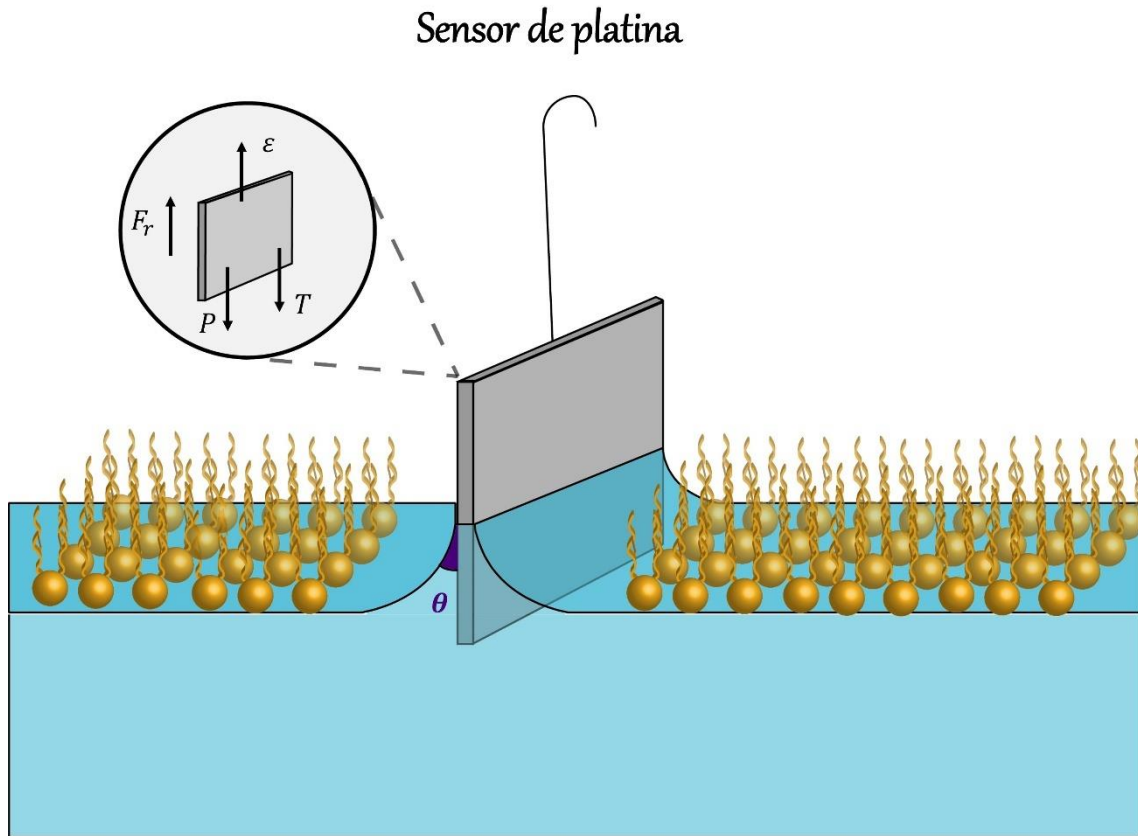


Figura 7. Representação do método de Wilhelmy para mensurar a pressão superficial da monocamada lipídica, por meio da imersão parcial de uma placa de platina sobre a subfase aquosa.

O ângulo de contato formado entre a placa e a curvatura da subfase é muito pequeno, por isso o valor de θ é substituído por 1. Essa condição só pode ser assumida devido à alta energia superficial livre, característica da placa de platina. Por isso, é fundamental que a placa esteja suficientemente limpa durante a execução dos experimentos na cuba. Além disso, molhar completamente o sensor no início das atividades também contribui para a redução do valor do ângulo formado. O cálculo da F_r pode ser ainda mais simplificado ao considerar-se que as forças empuxo (ε) e peso (P) são constantes, que dependem das dimensões da placa, volume de subfase deslocado pelo sensor, aceleração da gravidade e densidades da placa e subfase. Desta maneira, a F_r é resumida como as variações de tensões superficiais atuantes sobre o sensor, sendo estas a da subfase pura (T_o) e da subfase acrescida com a monocamada (T_m).

$$F_r = T_o - T_m \quad \text{Eq.8}$$

$$F_r = 2 \cdot (w + t) \cdot \gamma_o - 2 \cdot (w + t) \cdot \gamma \quad \text{Eq.9}$$

No caso da placa de platina, a espessura (t) é muito menor que a largura do sensor (l), sendo o valor da soma insignificante para o cálculo final. Sendo assim, a equação 1 pode ser aprimorada da seguinte forma:

$$\pi = -\Delta\gamma = -\frac{F_r}{2 \cdot (w+t)} = -\frac{F_r}{2 \cdot w}, \text{ se } w \gg t \quad \text{Eq.10}$$

As monocamadas de Langmuir são produzidas a partir do equipamento chamado cuba de Langmuir, que consiste numa superfície rasa, normalmente formada de politetrafluoroetileno, e duas barreiras móveis, conforme ilustra a Figura 8a e 8b. Através da cuba são geradas isotermas de pressão de superfície (π) em função das áreas ocupadas (A) por diferentes moléculas, por meio das quais é possível determinar as transições de fases e grau de empacotamento das monocamadas durante a compressão das barreiras (Figura 8c). Em maiores áreas, as moléculas encontram-se dispersas sobre a superfície da subfase e distantes entre si, de maneira que a pressão de superfície seja próxima a zero. Nesta etapa, denomina-se a fase gasosa (G) do filme¹⁴². Conforme as barreiras se comprimem, inicia-se a fase líquida expandida (LE), estágio este em que as moléculas começam a interagir entre si, ainda que exista grande desordem e alta fluidez. A estrutura dos fosfolipídios é importante pois podem apresentar diferentes organizações e conformações durante o processo de compressão do filme. Por exemplo, um platô pode

ser atingido no início da compressão da curva, indicando um momento de transição e coexistência entre as fases LE e líquida condensada (LC)¹⁴³. No entanto, a presença de insaturações na estrutura faz com que essa transição não seja evidente, sendo considerada apenas como fase líquida (L) todo o momento. As moléculas podem se tornar mais compactadas e com alto grau de ordenação, alcançando as fases LC e sólida (S). Finalmente, a capacidade de interação suportada pela monocamada é ultrapassada com a persistência da compressão, e, conforme a estrutura molecular sobre a subfase, pode resultar na transição da conformação 2D para a forma 3D. Nessa transição, as moléculas começam a se sobrepor umas às outras, podendo até mesmo ocasionar a completa desordem das moléculas na superfície da água. Esse ponto crítico é conhecido como pressão de colapso (π_c)¹⁴⁴.

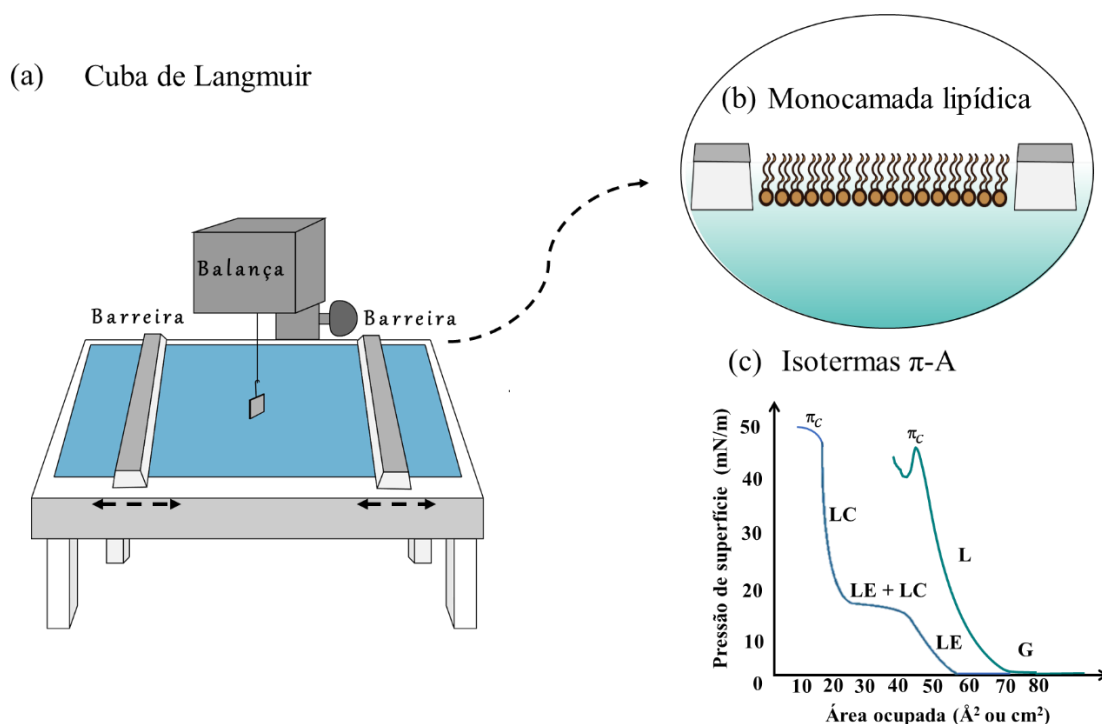


Figura 8. Representações da (a) cuba de Langmuir, por meio da qual são produzidos as (b) monocamadas lipídicas, e (c) isotermas π -A, das quais são possíveis determinar as transições de fases e grau de empacotamento dos filmes durante a compressão das barreiras.

Outro método importante para a caracterização dos filmes lipídicos está na deposição sucessiva dessas monocamadas em substrato sólido por meio das técnicas de Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS) (Figura 9)³⁵. Essas técnicas permitem

a produção de mono ou multicamadas de filmes, possibilitando o estudo das propriedades estruturais e dinâmicas de lipídios isolados ou de composições complexas, os quais estão interagindo com outras moléculas¹³⁸. A transferência de monocamadas para suportes sólidos foi pioneiramente realizada por Katherine Blodgett (1934-1935), que dá o nome a técnica de LB¹⁴⁵. Esta técnica envolve a imersão e retirada sucessiva do substrato na interface ar/água.¹⁴⁶ Posteriormente, Vicent Schaefer depositou monocamadas de urease em material metálico e em vidro, posicionando o substrato horizontalmente e paralelo a interface aquosa¹⁴⁵. Na técnica de LS, os filmes depositados são altamente organizados e orientados, cuja adesão dos fosfolipídios no substrato ocorre a partir de suas cadeias alifáticas^{146,147}. O sucesso da transferência dos filmes para ambas as técnicas dependem da anfifilicidade da molécula e suas propriedades químicas, composição da subfase (presença de íons livres e pH), taxa de imersão do substrato na interface e pressão superficial do filme¹³⁸. Portanto, é essencial calibrar exatamente os parâmetros da cuba de Langmuir, garantindo que a pressão superficial permaneça constante, para manter o empacotamento e a flexibilidade das estruturas consistentes¹⁴⁶. Ademais, a complexidade da deposição pode variar dependendo da composição lipídica do filme, o que influencia na escolha entre as técnicas ideais para cada caso específico.

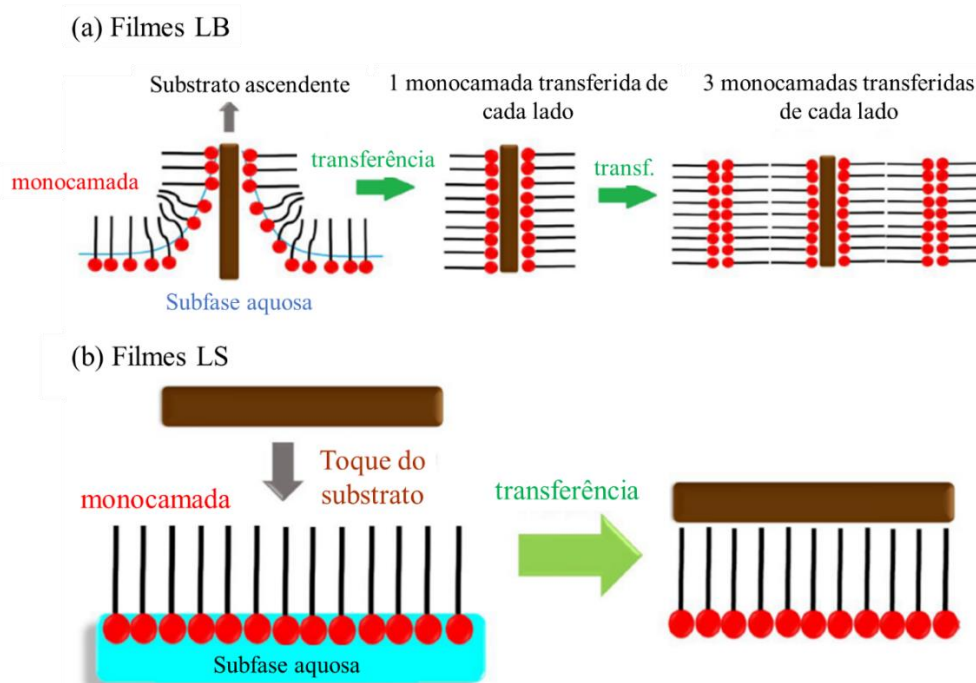


Figura 9. Representação para filmes (a) LB e (b) LS, demonstrando as transferências verticais e horizontais de uma monocamada na interface ar-água e os suportes sólidos (substratos), respectivamente. Adaptado de Oliveira Jr. *et al.*¹³⁸

1.6. Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia vibracional no infravermelho é uma técnica amplamente empregada para a caracterização de materiais tanto orgânicos quanto inorgânicos¹⁴⁸. Esta técnica opera medindo os modos vibracionais das ligações químicas, que são alterados devido às mudanças no momento dipolo entre átomos ligados ao absorver energia no espectro infravermelho¹⁴⁹. A faixa de comprimento de onda explorada varia de 1 a 100 μm , permitindo a absorção em diferentes frequências vibracionais, que são específicas aos tipos de ligações¹⁴⁸. O número de modos vibracionais observados pode variar com a complexidade molecular, desde moléculas simples até compostos poliatômicos que exibem vibrações tanto em planos lineares quanto não-lineares¹⁴⁸. Os modos de vibração incluem estiramentos (assimétricos e simétricos) e deformações angulares (no plano e fora do plano)¹⁵⁰. Dentre os métodos espectroscópicos no infravermelho utilizados, destacam-se a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a espectroscopia vibracional de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS).

Historicamente, a espectroscopia de infravermelho exigia a análise de cada frequência de luz que poderia ser absorvida pela amostra de forma individual¹⁵¹. Essa abordagem foi revolucionada pelo advento do FTIR, que permite a análise automática de todos os comprimentos de onda da luz infravermelha, utilizando um interferômetro¹⁴⁹. Os interferômetros operam medindo a diferença espectral da radiação emitida utilizando dois espelhos, um móvel e outro fixo, que criam padrões de interferência construtivas e destrutivas¹⁴⁹. Esta técnica não apenas acelera o processo, mas também melhora a precisão do espectro em termos de relação sinal/ruído¹⁴⁸. Um gráfico é produzido mostrando a intensidade do sinal no detector em relação à diferença de caminho óptico entre os dois espelhos.¹⁴⁹ Dado que este gráfico é não convencional, uma transformação matemática, especificamente a transformada de Fourier, é necessária para converter esses dados em uma forma interpretável. Isso envolve calcular a partir de um único comprimento de onda gerado, por exemplo:

$$S(\delta) = I(\nu_0) \cdot \cos 2\pi \cdot \nu_0 \cdot \delta \quad \text{Eq. 11}$$

Onde S é o sinal captado pelo detector, I a intensidade da fonte na frequência ν_0 e δ a retardação, que corresponde à distância entre os dois espelhos. Para fontes

policromáticas, o sinal total detectado ao longo do tempo é a soma de todas as ondas cosseno geradas por cada componente do comprimento de onda. Para isso, calcula-se a transformada de Fourier $S(\delta)$ ¹⁴⁸, conforme expresso pela integral:

$$S(\delta) = \int I(\nu_0) \cdot \cos 2\pi \cdot \nu_0 \cdot \delta \, d\nu \quad \text{Eq. 12}$$

O espectro gerado será definido pelo número de ondas que incidem sobre determinado ponto em determinado momento, utilizando como unidade o inverso do comprimento (cm^{-1}). Esse valor pode ser correlacionado com a transmitância ou absorbância do sinal. A transmitância será a razão da potência radiante transmitida pela amostra (I) e incidida sobre a amostra (I_0), geralmente relatada como % da radiação incidente que efetivamente é transmitida¹⁴⁹. A absorbância é uma medida logarítmica (base 10) do recíproco da transmitância:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = -\log T = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad \text{Eq. 13}$$

Para uma leitura *in situ* sobre os filmes de Langmuir, a espectroscopia vibracional de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS) mostra-se adequada, uma vez que é capaz de extrair o sinal da monocamada da subfase líquida e moléculas de vapor d'água circulante^{152,153}. Para isso, o equipamento é configurado sobre a cuba de Langmuir e posicionado para que a luz IV incida sobre um ponto da amostra em ângulos rasantes (cerca de 75° para subfases aquosas), utilizando luz polarizada. Como vantagem, é possível determinar a orientação molecular dos lipídios no filme por meio desta técnica¹⁵⁴. A polarização da luz incidente é projetada para as direções perpendicular (p) e paralela (s) à superfície, por meio da qual é reduzida a interferência de moléculas adjacentes às amostras, como gases e a própria subfase. O espectro resultante será a medida da refletividade (R) de ambas as polarizações (R_p e R_s), por meio da qual é possível calcular a refletividade diferencial (D):

$$D = \frac{(R_p - R_s)}{(R_p + R_s)} \quad \text{Eq. 14}$$

Uma representação gráfica do funcionamento do equipamento está representada na Figura 10.

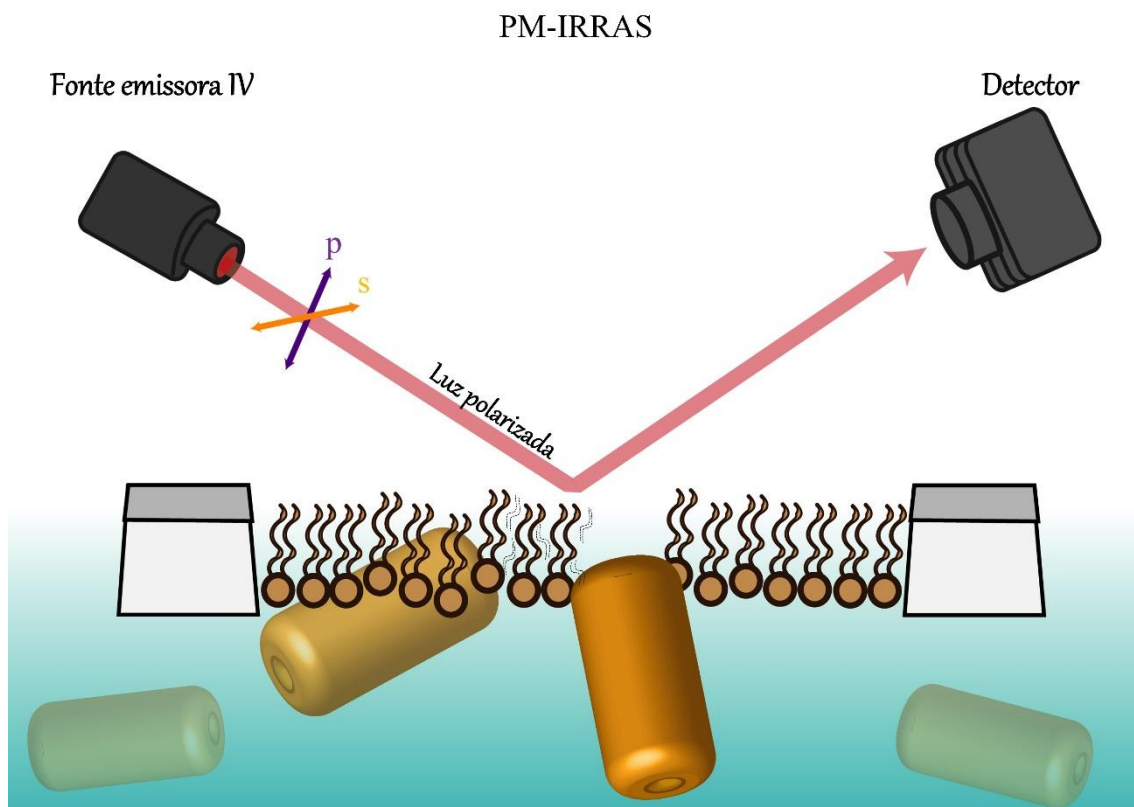


Figura 10. Ilustração dos parâmetros experimentais da espectroscopia PM-IRRAS, posicionada sobre a cuba de Langmuir.

1.7. Microscopia de ângulo de Brewster (BAM)

A microscopia de ângulo de Brewster é uma técnica que emprega luz polarizada perpendicular (p) no espectro visível para capturar imagens de estruturas anfifílicas localizadas sobre uma superfície¹³⁸. Este método é especialmente eficaz quando acoplado a uma cuba de Langmuir, permitindo a observação em tempo real das monocamadas lipídicas na interface ar/água¹⁵⁵. Através dessas imagens, é possível avaliar a homogeneidade e detectar defeitos nos filmes, além de identificar transições de fases durante a compressão das barreiras¹⁵⁵. A técnica se baseia na refletividade da luz polarizada-p entre dois meios não absorventes e isotrópicos, com índices de refração distintos (n)¹³⁸. Fundamentalmente, a refletividade é influenciada pela diferença entre os índices de refração ($n_2 > n_1$), pela polarização da luz e pelo ângulo de incidência.

O ângulo de Brewster, é um conceito na óptica que descreve o fenômeno pelo qual a luz refletida por uma superfície não tem componente polarizada paralelamente se a luz incide sob um ângulo específico. Esse ângulo específico é conhecido como ângulo de Brewster. A condição para que o ângulo de Brewster ocorra é que o ângulo de incidência da luz (a partir de um meio para outro com diferentes índices de refração) deve ser tal que as luzes refletida e refratada estejam em um ângulo de 90° graus entre si, conforme ilustra a Figura 11a. A partir destas condições, é possível estabelecer uma relação entre os ângulos de incidência e reflexão (Eq. 15) e a equação da refração da luz proposta por Snell (Eq. 16), resultando na equação 17. Uma forma simplificada de calcular o ângulo de Brewster é dada pela equação 18.

$$\theta_r = 90 - \theta_i \quad \text{Eq.15}$$

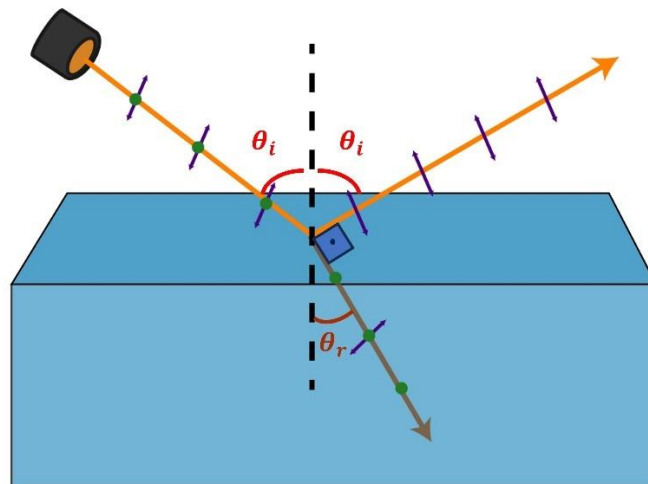
$$n_1 \cdot \text{sen}\theta_i = n_2 \cdot \text{sen}\theta_r \quad \text{Eq.16}$$

$$n_1 \cdot \text{sen}\theta_i = n_2 \cdot \text{sen}(90 - \theta_i) = n_2 \cdot \text{cos}\theta_i \quad \text{Eq.17}$$

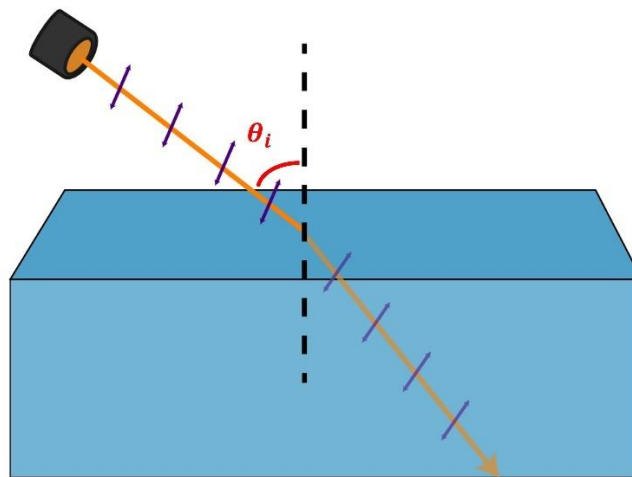
$$\text{tg}\theta_i = \frac{n_2}{n_1} \quad \text{Eq.18}$$

Nas condições em que n_1 refere-se ao índice de refração do ar igual a 1, n_2 seja o índice de refração da água no valor de 1,333 o valor do ângulo de Brewster será de 53,1°¹⁵⁶. Teoricamente, nestas condições nenhuma luz é refletida quando a luz polarizada é incidida sobre o meio n_2 , considerando um sistema ideal sem interferência da atmosfera não controlada e de interface plana (Figura 11b)¹⁵⁷. Na prática, a intensidade da luz captada será mínima, mas não zero, uma vez que há uma atmosfera saturada de vapor d'água sobre a interface dos meios e a própria água organiza-se rugosamente na superfície devido as forças de tensão e capilaridade das moléculas¹³⁸. A presença de filme lipídico ultrafino sobre a interface ar/água terá um novo índice de refração (n_3) diferente da água, por essa razão ele é refletido e captado pelo microscópio (Figura 11c)¹⁵⁷. A refletividade da camada lipídica dependerá do comprimento da cadeia lipídica, da densidade molecular e das interações moleculares na monocamada e com a interface aquosa.

(a) Reflexão e refração de uma luz não polarizada no ângulo de Brewster



(b) Refração de uma luz polarizada no ângulo de Brewster



(c) Reflexão de uma luz polarizada no ângulo de Brewster sobre as monocamadas

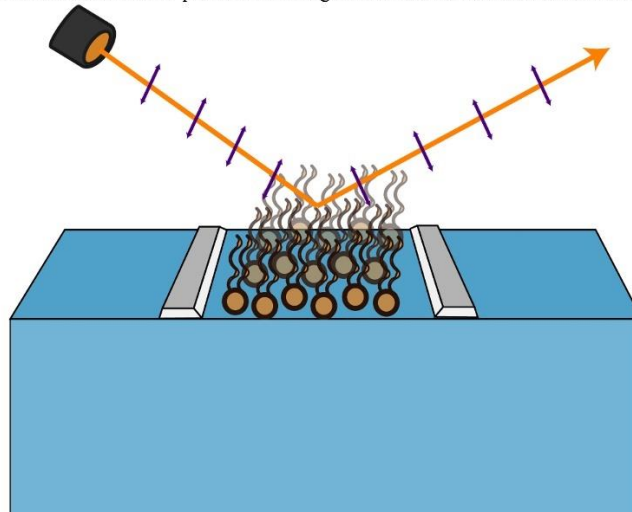


Figura 11. Esquema ilustrando o princípio da reflexão e refração da luz, comparando (a) a refração de luz não polarizada; (b) a refração de luz polarizada ao incidir no ângulo de Brewster; e (c) a reflexão da luz polarizada em um microscópio especializado para análise no ângulo de Brewster.

2. Capítulo II: resultados fotoquímicos desencadeados por nanobastões de ouro recobertos com sílica em nanoarquitetura bioinspirada para membranas bacterianas

2.1. Introdução

As nanopartículas de metais nobres possuem propriedades ópticas, elétricas e catalíticas únicas¹⁵⁸, complementarmente à resistência a ataques corrosivos e alta eficiência de conversão óptico-térmica^{159,160}. As nanopartículas de ouro demonstraram baixa toxicidade aos animais¹⁶¹ e células de mamíferos, além de uma ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) ajustável^{107,162–164}, que depende de seu tamanho, forma, distribuição de carga e do ambiente que as circundam^{28,165}. Uma ampla variedade das nanoestruturas de ouro foi projetada para aplicações na área da saúde para o diagnóstico de doenças¹⁶⁶, entrega de medicamentos¹⁶⁷, biossensores^{168,169} e, também, como agentes terapêuticos baseados em luz^{170,171}. Por exemplo, o uso de nanopartículas de ouro como agentes fototérmicos despertou enorme interesse na terapia fototérmica (TFT) de tecidos carcinogênicos devido à sua seletividade, baixa capacidade invasiva e baixa toxicidade sistêmica^{92,172–174}. Entre as classes exploradas de agentes fototérmicos, as nanopartículas de ouro em forma de bastão (AuNRs) se destacam devido à sua alta eficiência na conversão de luz no infravermelho próximo (NIR) em calor^{175,176}. De fato, o LSPR das AuNRs pode ser facilmente ajustada dentro da faixa NIR¹⁷⁷ ajustando os parâmetros de tamanho longitudinal e transversal, superando a penetração limitada da luz visível nos tecidos, o que é altamente desejado para tratamentos *in vivo*^{178,179}.

A TFT também tem sido explorada como uma alternativa para tratamentos convencionais no combate a doenças infecciosas graves, como aquelas causadas por bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR)^{180–182}. O desenvolvimento de patógenos resistentes tornou-se uma questão de saúde pública global^{183,184}, especialmente porque a geração de novos antibióticos não acompanha o crescente número de MDR^{185–187}. Uma vez que a eficácia da TFT não depende necessariamente da internalização celular, mas sim do dano fototérmico induzido na célula, o fenômeno MDR pode ser contornado. O aquecimento fotoinduzido pela TFT pode gerar hipertermia localizada¹⁸⁸, causando desnaturação de estruturas biológicas como proteínas e o comprometimento da membrana lipídica^{189–191} o que eventualmente resulta na inativação dos microrganismos. Por exemplo, as AuNRs têm sido aplicadas com sucesso como agentes fototérmicos contra

bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como *Pseudomonas aeruginosa*¹⁹² e *Staphylococcus aureus*^{193,194}, respectivamente. No entanto, as AuNRs têm mostrado sensibilidade a meios iônicos e mudanças de pH, o que pode levar à dissociação, agregação e perda da eficiência fototérmica^{116,195}. Estratégias adequadas para mitigar os efeitos do ambiente na estabilidade das AuNRs são, portanto, necessárias, como o revestimento da superfície com sílica, formando nanobastões de ouro revestidos com sílica (AuSHINRs)¹⁹⁶. A camada de sílica não apenas é transparente para luz visível e no NIR, mas também tem pouco efeito nas propriedades plasmônicas das AuNRs, além de alta biocompatibilidade, hidrofiliabilidade e estabilidade química^{197,198}.

Apesar do potencial eminente das AuSHINRs na TFT, as aplicações voltadas para a inativação microbiana têm sido pouco exploradas. Projetar as AuSHINRs em tais aplicações, no entanto, exige a compreensão dos efeitos à nível molecular, estes desencadeados pela hipertermia fotoinduzida. O envelope celular das bactérias é conhecido por ser o alvo inicial da TFT, mas sua complexidade é um desafio a ser superado para entender o mecanismo subjacente das interações com agentes fototérmicos e os efeitos subsequentes da hipertermia. Nesse contexto, as técnicas de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS)^{199,200} têm sido amplamente utilizadas para depositar monocamadas de lipídios com controle em nível molecular, como sistema bioinspirado de membranas celulares^{76,77,201,202}. Por exemplo, interações à nível molecular entre fotossensibilizadores, como azul de toluidina-O (TBO)²² e eosina decil éster (EosDEC)^{75,80}, e membranas bacterianas bioinspiradas foram desvendadas usando as plataformas Langmuir e LS. Aqui, iremos determinar o mecanismo molecular da inserção das AuSHINRs em modelos de membranas celulares e os efeitos subsequentes fotoinduzidos, estas compostas por fosfolipídios encontrados em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Por exemplo, as membranas celulares da *Escherichia coli* (*E. coli*) constitui-se principalmente de fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) e cardiolipina (CL), enquanto as de *Staphylococcus aureus* contém lisil-fosfatidil-glicerol, além de PG e CL^{203,204}. Portanto, as técnicas de Langmuir e LS foram usadas para produzir monocamadas de fosfolipídios de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(3-lisil(1-glicerol))] (Lysyl-PG), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG) e 1'-3'-bis[1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo]-glicerol (cardiolipina, CL) sobre a subfase de AuSHINRs, que foram sintetizados com um comprimento médio de 41 nm e largura média de 22 nm. Os mecanismos de

adsorção das AuSHINRs nas monocamadas e os efeitos fotoinduzidos foram avaliados por isotermas de pressão superficial (π) *versus* área molecular média ($\text{\AA}^2$), enquanto os mecanismos de ligação foram observados em espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os efeitos na estabilidade das monocamadas foram analisados a 30 mN/m, pois essa é a pressão lateral que se acredita estar presente na envoltura celular²⁰⁵. Finalmente, o potencial das AuSHINRs na inibição fotodinâmica do crescimento microbiano foi analisado em cultura de *E. coli*.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Reagentes

Os seguintes compostos foram adquiridos da Avanti Polar Lipids: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(3-lisil(1-glicerol))] (Lysyl-PG), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG) e 1'-3'-bis [1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo]-glicerol (cardiolipina, CL). O brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB, $\geq 98\%$), o borohidreto de sódio (NaBH_4 , $\geq 98\%$), o ácido tetracloroáurico (HAuCl_4 , 99 %), o nitrato de prata (AgNO_3 , 99 %), o ácido L-ascórbico ($\geq 99\%$), o ortossilicato de tetraetila (TEOS, $\geq 99\%$) e o clorofórmio foram adquiridos da Sigma Aldrich. Todos os materiais foram usados sem purificação adicional. A água ultrapura (com pH 5,8 e condutividade de 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$), utilizada como subfase para produzir filmes de Langmuir e sintetizar os nanobastões, foi fornecida por um sistema Milli-Q (modelo Direct-Q 3UV).

2.2.2. Síntese e caracterização das nanobastões de ouro revestidos com sílica (AuSHINRs)

Os nanobastões de ouro (AuNRs) foram sintetizadas, adaptando os procedimentos propostos por Aroca et al.²⁰⁶ Primeiramente, uma solução de “sementes” foi preparada pela adição de 10 mL de CTAB (0,1 mol/L) e 50 μL de HAuCl_4 (0,05 mol/L) em um balão volumétrico, sob agitação constante a 28°C, até que a solução ficasse completamente amarela. Em seguida, a agitação foi aumentada e 600 μL de NaBH_4 (10 mmol/L) foram adicionados, alterando a cor da suspensão para amarelo-amarronzado. As

sementes foram deixadas em repouso por um minuto antes de serem utilizadas. Uma solução de crescimento foi preparada pela adição sequencial de 250 mL de CTAB (0,1 mol/L), 750 µL de AgNO₃ (4 mmol/L), 2,5 mL de HAuCl₄ (0,05 mol/L) e 2,5 mL de ácido ascórbico (0,1 mol/L), até que a solução ficasse incolor. Finalmente, 600 µL das sementes foram adicionados à solução de crescimento e a reação foi finalizada após aproximadamente 30 minutos, com a suspensão final tornando-se completamente azul. A suspensão de AuNRs foi então deixada em repouso por 24 horas no escuro, à temperatura ambiente.

As AuSHINRs foram preparadas pela alcalinização da suspensão de AuNRs, adicionando NaOH (1 mol/L) até que o pH atingisse 10,5. A suspensão foi transferida para um balão volumétrico e mantida sob agitação vigorosa a 28°C. Foram feitas três adições de 1,25 mL de TEOS (20% v/v em metanol) em intervalos de 30 minutos, por fim sendo mantida a suspensão em agitação por 24 horas. Todos esses procedimentos estão representados na Figura 12a. As AuSHINRs produzidas foram centrifugadas três vezes a 12.000 rpm por 10 minutos para remover o excesso de CTAB. Em cada ciclo, o sobrenadante foi removido e as AuSHINRs sedimentadas foram ressuspensas em água ultrapura. A caracterização das AuNRs e AuSHINRs foi realizada por espectroscopia de absorção UV-Vis (Agilent Cary 60), potencial zeta (Malvern Panalytical, Zetasizer Nano S90) e microscopia eletrônica de transmissão (FEI Tecnai, 120 kV). A eficiência de conversão fototérmica (η) das AuSHINRs foi investigada irradiando a suspensão coloidal com uma fonte de LED (BioLambda) a 630 nm (20 mW/cm²). Durante a irradiação, o LED foi ligado/desligado várias vezes para confirmar a conversão de luz em calor. η foi calculada a partir das Equações 19 e 20, seguindo protocolos bem estabelecidos na literatura^{76,185,207,208}. Nas equações, Q representa energia (J), m é a massa da suspensão coloidal (g), c é o calor específico da água (J/g°C), ΔT é o aumento de temperatura, I é a potência do laser incidente (J), A_λ é a absorvância do coloide e η é a eficiência de conversão fototérmica.

$$Q_I = mc\Delta T \quad \text{Eq.19}$$

$$Q_I = I(1 - 10^{-A_\lambda})\eta \quad \text{Eq. 20}$$

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

As monocamadas de Langmuir de DOPE, Lysyl-PG, DOPG e CL foram preparadas no equipamento KSV-NIMA (KN1002, Biolin Scientific), utilizando água ultrapura e suspensão coloidal de AuSHINRs como subfases, conforme representado na Figura 12b. Para todos os experimentos, as AuSHINRs foram usadas com uma diluição prévia de 1:2 v/v (colóide: água ultrapura), atingindo uma concentração final de $1,2 \times 10^{10}$ AuSHINRs/mL. Isotermas de pressão de superfície *versus* área (π -A) foram adquiridas adicionando soluções de clorofórmio (10^{-3} mol/L) dos fosfolipídios sobre as subfases. O solvente foi permitido evaporar por 10 minutos, seguido pela compressão das barreiras a uma velocidade de 5 mm/min. A pressão superficial (π) foi medida pelo método de Wilhelmy a partir de uma placa de platina. Pelo menos três experimentos foram realizados para cada fosfolipídio, garantindo a reprodutibilidade dentro de ± 2 mN/m. A temperatura da subfase foi mantida a 21 °C usando um sistema de banho ultra-termoestático (SolidStell SSDu - 10 L) acoplado à cuba de Langmuir. Os experimentos de irradiação foram realizados a uma pressão superficial constante de 30 mN/m usando uma fonte de LED (BioLambda) de 630 nm (20 mW/cm²) posicionada a 20 cm acima das monocamadas. A espectroscopia de absorção por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada com resolução espectral de 4 cm⁻¹ e 256 varreduras, utilizando um espectrômetro da Bruker (Alpha II) no modo de transmissão. Os espectros foram obtidos em filmes LS depositados em substratos de germânio (Ge)⁷⁶. O crescimento dos filmes LS foi monitorado por espectroscopia de absorção UV-Vis (Agilent Cary 60), no intervalo de 190 a 1100 nm, cujo depósito foi realizado em substratos de quartzo.

2.2.4. Avaliação da geração de oxigênio singleto (¹O₂)

1,3-Difenilisobenzofurano (DBPF) da Sigma-Aldrich foi utilizado para avaliar a geração de ¹O₂ pelas AuSHINRs em acetonitrila (Merck, P.A.), seguindo o protocolo proposto por Tada e Baptista²⁰⁹. O DPBF reage irreversivelmente com o ¹O₂, resultando na diminuição da intensidade da banda de absorção do DPBF em 410 nm. Imediatamente antes do uso, no escuro, 40 µL da solução estoque de DBPF em acetonitrila (8 mmol/L) foram adicionados a 2 mL de uma suspensão de AuSHINRs, também em acetonitrila, dentro de uma cubeta de quartzo. Para fins de comparação, todas as amostras foram

preparadas para ter o mesmo fator de absorção próximo a 630 nm (comprimento de onda do laser), considerando a luz dispersa pelas AuSHINRs. Os experimentos foram realizados irradiando as amostras com uma fonte de LED de 630 nm (20 mW/cm²) (BioLambda), enquanto os espectros de absorção foram obtidos em intervalos de tempo variados (Espectrômetro FS5, Edinburgh SA). A banda de absorção do DBPF foi medida a cada 10 segundos de irradiação luminosa.

2.2.5. Atividade microbiana

A atividade antimicrobiana das AuSHINRs (Figura 12c) foi avaliada contra a bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922). O meio de cultura Mueller Hinton (MH, Sigma Aldrich) foi utilizado e a bactéria padronizada na escala de McFarland de 0,5 a um comprimento de onda de 490 nm. O microrganismo foi diluído para 10³ células/mL e 190 µL da suspensão bacteriana foram semeados em uma placa de 24 poços. Em seguida, foram adicionados 10 µL de suspensões de AuSHINRs, água ultrapura e tetraciclina a cada poço separadamente. Para esses experimentos, os colóides foram diluídos na proporção de 1:7 v/v de AuSHINRs em água ultrapura. Essa concentração foi escolhida como a menor concentração na qual não foi observada perda de eficiência fototérmica devido à agregação de partículas. Duas placas foram irradiadas duas vezes a 660 nm (170 mW/cm²) por 5 minutos usando o IrradLED (Biopdi) e duas placas foram mantidas no escuro. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. O crescimento bacteriano foi quantificado medindo a absorbância de cada poço a 600 nm (A_{600}) em um leitor de placas (Biotek). O crescimento bacteriano foi calculado considerando o grupo de controle negativo como 100% do crescimento bacteriano. Uma vez que a banda de extinção das AuSHINRs está na mesma região utilizada para avaliar a concentração de *E. coli*, três poços da placa de células foram semeados com a mesma concentração de AuSHINRs, mas na ausência de inóculo. Os valores de absorbância dos poços contendo AuSHINRs incubados com *E. coli* foram subtraídos da média dos valores de absorbância desses poços. A porcentagem de crescimento bacteriano foi calculada de acordo com a Eq. 21.

$$\text{crescimento bacteriano (\%)} = \frac{A_{600 \text{ amostra}}}{A_{\text{controle negativo}}} \times 100 \quad \text{Eq. 21}$$

Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi submetido à técnica de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por gota²¹⁰, onde 10 µL de cada diluição foram gotejados em uma placa de Petri contendo meio de cultura de ágar. As placas de Petri foram então incubadas a 37 °C por 24 horas para a contagem das UFC.

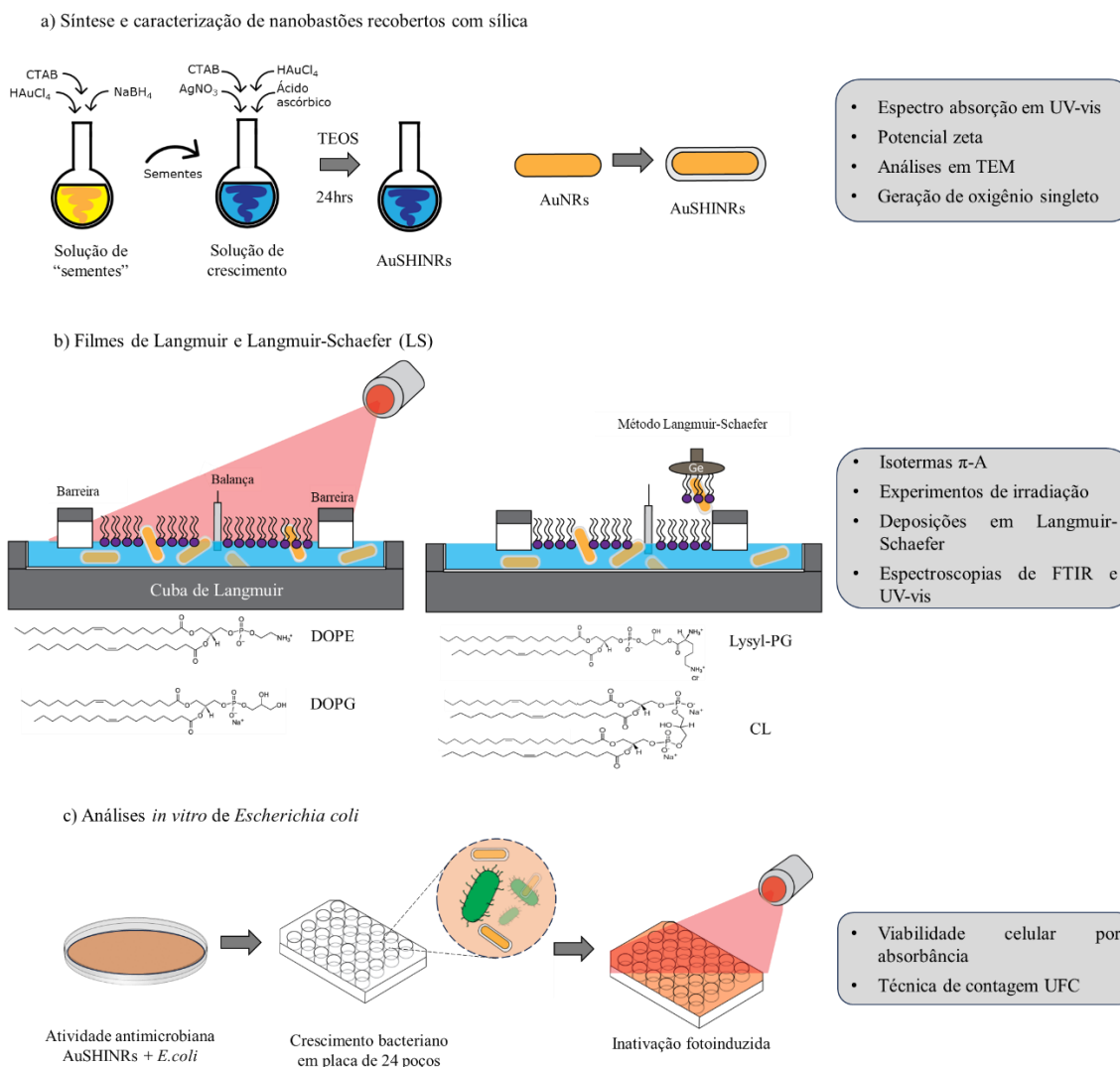


Figura 12. Representação esquemática simplificada da configuração experimental. (a) Síntese e caracterização das AuSHINRs. (b) Interações e fotorreações à nível molecular entre AuSHINRs e filmes de Langmuir, e estruturas moleculares dos fosfolípidios estudados. (c) Atividade antimicrobiana das AuSHINRs aplicadas em culturas *in vitro* de *Escherichia coli*.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Nanobastões de ouro recobertos com sílica (AuSHINRs)

As Figuras 13a e 13b mostram os espectros de extinção em UV-Vis e as microscopias eletrônicas de transmissão (TEM) das AuNRs e AuSHINRs, respectivamente. A primeira banda de extinção em 540 nm corresponde à ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) transversal, enquanto a segunda em 640 nm é equivalente à LSPR longitudinal^{108,206,211}. O comprimento médio (L) e a distribuição da largura (W) dos nanobastões estão resumidos na Tabela 1, juntamente com a espessura da camada de sílica (SS), determinada por histogramas (Figura 14) construídos a partir das imagens de TEM da Figura 13b. A baixa relação de aspecto ($AR = L/W$) de 1,9 é consistente com a absorção de luz vermelha da banda longitudinal (~640–660 nm)^{108,206,211}, dentro da faixa terapêutica necessária^{108,212}. O LSPR longitudinal é deslocado de 640 nm para 655 nm após o revestimento de sílica, referindo-se a mudanças no índice de refração das AuSHINRs^{31,78,206,213}. A camada de sílica também afeta o potencial zeta das nanoestruturas (Tabela 1), que é reduzido de +32,5 mV (AuNRs) para +19,9 mV (AuSHINRs), semelhante a dados relatados anteriormente^{214–216}.

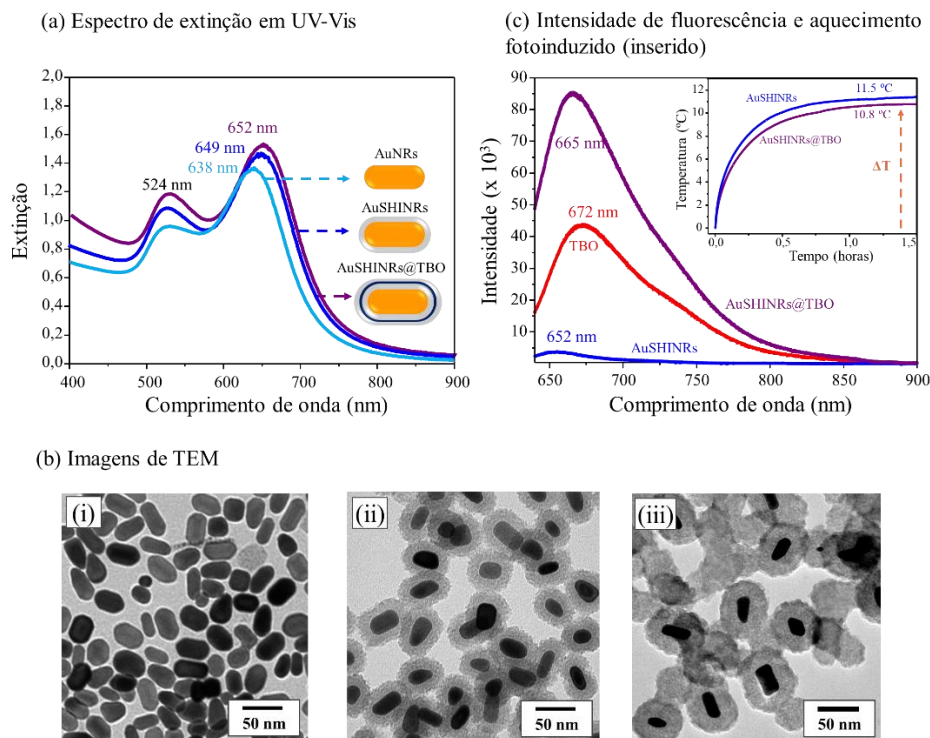
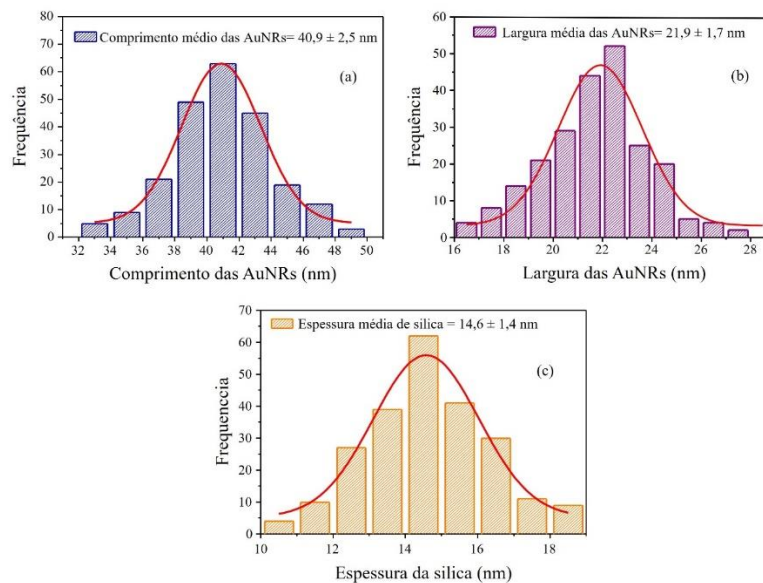


Figura 13. (a) Espectros de extinção UV-Vis de AuNRs e AuSHINRs, ambos diluídos em água ultrapura (1:1 v/v). (b) Imagens de TEM registradas para AuNRs (i e ii) e AuSHINRs (iii e iv). (c) Aquecimento fotoinduzido desencadeado pelas AuSHINRs usando uma fonte de LED de 630 nm (20 mW/cm²). As quedas destacadas na temperatura são devidas à interrupção momentânea da irradiação, subsidiando o efeito de conversão de luz em calor.

A Figura 13c mostra que a irradiação luminosa das AuSHINRs produz um aumento acentuado na temperatura até um patamar, sugerindo que um equilíbrio entre a absorção de energia e sua dissipação foi alcançado. A temperatura aumentou cerca de 15 °C com uma dose de luz de 144 J/cm², que é menor do que a dose de luz relatada para nanomateriais híbridos baseados em nanobastões²¹⁷. Por exemplo, foram necessários 1800 J/cm² e 600 J/cm² para atingir temperaturas similares em nanobastões de ouro funcionalizados com polipirrol (Ppy)²¹⁸ e óxido de grafeno reduzido com L-cisteína²¹⁷, respectivamente. Uma eficiência de conversão fototérmica (η) de 85,4% foi calculada para as AuSHINRs, usando as Equações 19 e 20. Embora uma comparação direta com outros sistemas possa não ser direta, a η das AuSHINRs mostrou ser significativamente mais alta do que aos nanobastões de ouro (AuNRs – 60%)²¹⁹ e nanobastões funcionalizados com polidopamina biocompatível (AuPt@PDA – 81,78%)²²⁰.

Tabela 1. Potencial zeta e dimensões média das AuNRs e AuSHINRs.

Nanoestruturas	Potencial zeta (mV)	Tamanho através da TEM (nm)
AuNRs	+ 32 ± 1	L = 41 ± 2; W = 21 ± 2
AuSHINRs	+ 20 ± 2	SS = 15 ± 2

**Figura 14.** Histogramas da distribuição de tamanho calculados para AuNRs e AuSHINRs a partir de imagens de TEM. Tamanhos médios do (a) comprimento (L), (b) largura (W) e (c) espessura da camada de sílica (SS).

A concentração das AuSHINRs foi estimada a partir dos valores médios do comprimento (L), largura (W) e espessura da camada de sílica (SS) da Tabela 1 e pela aproximação do formato das AuSHINRs a um cilindro. O raio ($r_{AuSHINRs}$) e o volume ($V_{AuSHINRs}$) são:

$$W = 2r = 51,1 \text{ nm}$$

$$W = 2 \times r \rightarrow r_{AuSHINRs} = 25,55 \text{ nm} = 25,55 \times 10^{-7} \text{ cm}$$

$$V_{AuSHINRs} = \pi \times r^2 \times h = \pi \times (25,55 \times 10^{-7} \text{ cm})^2 \times 70,1 \times 10^{-7} \text{ cm}$$

$$V = 1,44 \times 10^{-16} \text{ cm}^3$$

Uma vez que a densidade do ouro (ρ_{gold}) é 19,32 g/cm³, a massa de uma AuSHINRs (m_{AuSHINRs}) é dado por:

$$m_{\text{AuSHINRs}} = \rho_{\text{gold}} \times V_{\text{AuSHINRs}} = 19,32 \text{ g/cm}^3 \times 1,44 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 =$$

$$m_{\text{AuSHINRs}} = 2,78 \times 10^{-15} \text{ g}$$

Um volume conhecido da suspensão coloidal ($V = 4 \text{ mL}$) foi deixado para secar em incubadora (100 °C) e a massa resultante foi medida ($m = 4,0 \times 10^{-4} \text{ g}$). Por fim, a concentração das AuSHINRs em suspensão coloidal (C_{AuSHINRs}) foi estimada através da fórmula matemática a seguir:

$$\frac{1 \text{ AuSHINRs}}{x} \rightarrow \frac{2,78 \times 10^{-15} \text{ g}}{4,0 \times 10^{-4} \text{ g}}$$

$$x = 1,44 \times 10^{11} \text{ AuSHINRs (in 4 mL)}$$

$$\therefore C_{\text{AuSHINRs}} = 3,6 \times 10^{10} \text{ AuSHINRs/mL}$$

2.3.2. Inserção das AuSHINRs nas membranas inspiradas em bactérias

As isothermas π -A de DOPE, Lysyl-PG, DOPG e CL em água ultrapura e AuSHINRs são mostradas na Figura 15a-d, respectivamente. Experimentos subsidiários revelaram que as AuSHINRs não são ativas na superfície e não podem produzir filmes de Langmuir por si próprias. A suspensão coloidal desloca as isothermas π -A para maiores áreas moleculares, indicando a incorporação das AuSHINRs nas monocamadas lipídicas. De acordo com a Tabela 2, os deslocamentos na área molecular relativa foram mais significativos para DOPG e CL, enquanto deslocamentos menores foram observados para as monocamadas de DOPE e Lysyl-PG. Considerando que as principais diferenças estruturais entre os fosfolípidios estão na região polar, pode-se assumir que a adsorção das AuSHINRs tenha sido conduzida por forças eletrostáticas. São esperadas interações atrativas mais fortes para as moléculas aniônicas de DOPG e CL devido à carga superficial positiva das AuSHINRs ($\zeta = +20 \text{ mV}$), o que é consistente com os maiores deslocamentos nas isothermas π -A. Um comportamento semelhante foi encontrado para o azul de toluidina-O (TBO) e azul de metileno (MB) catiônicos, cujas interações foram

predominantemente estabelecidas com os fosfatos aniônicos das monocamadas^{221–223}. Por outro lado, a atração eletrostática pode ter sido enfraquecida pela repulsão com os grupos etanolamina catiônica e lisina, diminuindo a adsorção das AuSHINRs nas monocamadas de DOPE e Lysyl-PG, respectivamente.

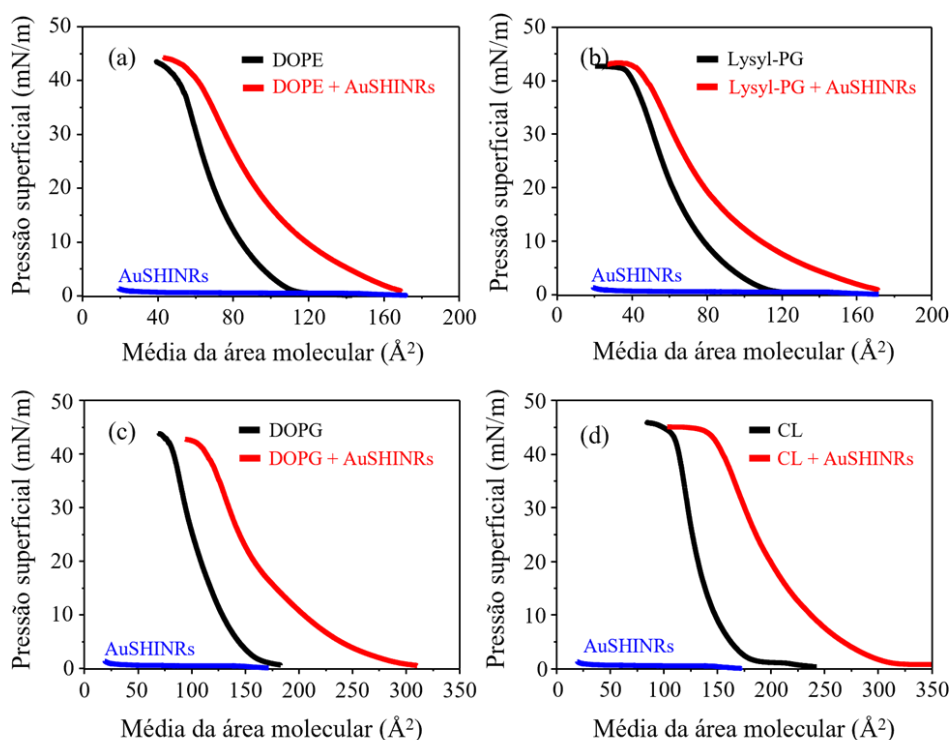


Figura 15. Isotermas π -A das monocamadas de (a) DOPE, (b) Lysyl-PG, (c) DOPG e (d) CL em água ultrapura e AuSHINRs ($1,2 \times 10^{10}$ AuSHINRs/mL). A compressão coloidal é fornecida como referência não tensoativa.

Tabela 2. Mudanças relativas reportadas nas áreas ocupadas por lipídios $(A-A_0)/A_0$ induzidas pela inserção de AuSHINRs. A_0 e A são as áreas extrapoladas à 30 mN/m em água ultrapura e solução de AuSHINRs, respectivamente.

Monocamadas (fosfolipídios)	Mudança relativa de área $(A - A_0)/A_0$
DOPE	0,4
Lysyl-PG	0,3
DOPG	0,8
CL	1,1

As interações à nível molecular das AuSHINRs incorporadas nas monocamadas de DOPE, Lysyl-PG, DOPG e CL foram investigadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Monocamadas de Langmuir de cada fosfolípido em água ultrapura e subfases de AuSHINRs ($1,2 \times 10^{10}$ AuSHINRs/mL) foram transferidas para substratos sólidos, formando filmes de Langmuir-Schaefer (LS). O controle da deposição foi verificado por espectroscopia de absorção no UV-Vis mostrada na Figura 16, registrada a cada 5 camadas depositadas a uma pressão superficial constante de 30 mN/m, utilizando lâminas de quartzo como substratos. Um crescimento linear foi observado para as deposições em LS (inserções da Fig. 15a, 15b e 15c;), com exceção do filme LS de CL (inserção da Fig. 15d), cuja distribuição foi menos uniforme de material por camada depositada. Os filmes LS de fosfolípidos contendo AuSHINRs apresentam novas bandas de LSPR transversal e longitudinal dos nanobastões, o que confirma a deposição dessas nanopartículas nos filmes LS. Para os filmes LS de DOPE + AuSHINRs e Lysyl-PG + AuSHINRs (Fig. 15e e 15f), as bandas LSPR são evidentes em 540 - 560 nm (banda transversal) e 689 nm (banda longitudinal). Além disso, ambos os filmes LS revelaram um crescimento linear dos filmes depositados, sugerindo que quantidades semelhantes de material foram transferidas por camada (inserções da Fig. 15e e 15f). Um comportamento diferente foi observado para os fosfolípidos aniônicos. O filme LS de DOPG + AuSHINRs mostrou um decaimento no crescimento linear da banda lipídica em 193 nm, enquanto a banda AuSHINRs, em 726 nm, apresentou uma deposição bem controlada (inserção Fig. 15g). Em contraste, o filme LS de CL + AuSHINRs apresentou crescimento linear para ambas as bandas de absorção UV-Vis, a 200 nm e a 812 nm (inserção Fig. 15h). Além disso, os LSPR transversais e longitudinais das AuSHINRs foram combinados em uma banda única e larga nos espectros UV-Vis dos filmes LS de DOPG + AuSHINRs e CL + AuSHINRs, o que pode ser devido aos mecanismos de interação dessas nanoestruturas com as cargas aniônicas de DOPG e CL, favorecendo a formação de grandes agregados.

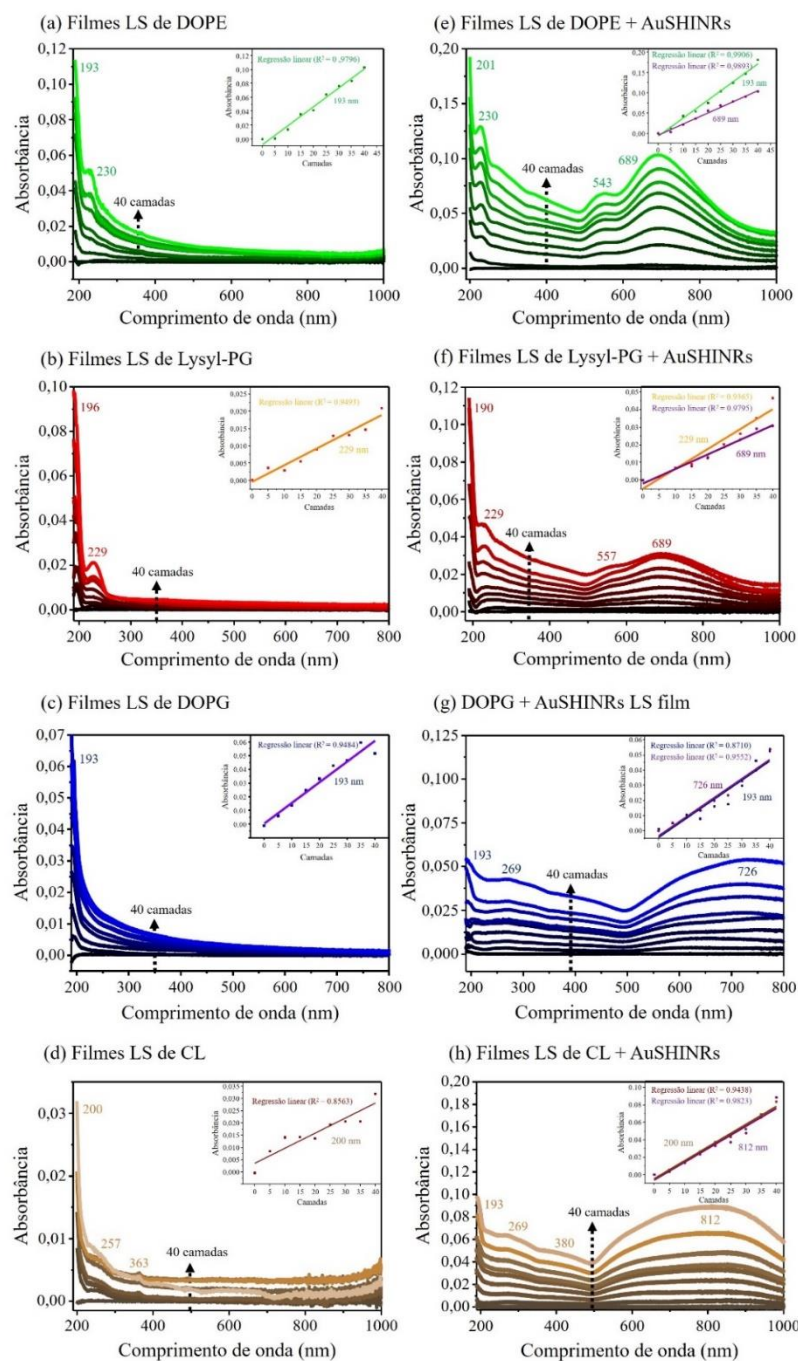


Figura 16. Os filmes LS depositados em subfase de (esquerda) água ultrapura e (direita) solução de AuSHINRs foram monitorados até 40 camadas. Os espectros UV-Vis foram lidos a cada 5 camadas para as monocamadas puras de (a) DOPE, (b) Lysyl-PG, (c) DOPG e (d) CL, e monocamadas em suspensão coloidal de (e) DOPE + AuSHINRs, (f) Lysyl-PG + AuSHINRs, (g) DOPG + AuSHINRs e (h) CL + AuSHINRs LS films.

Os espectros FTIR obtidos dos filmes LS são exibidos nas Figuras 17 e 18, e as atribuições dos principais modos vibracionais são fornecidas na Tabela 3. Nenhuma manipulação adicional foi realizada para reduzir o ruído de fundo entre 1500 - 1700 cm^{-1} , relacionado aos modos vibracionais da água. Os grupos hidrofílicos são mais afetados

pela inserção das AuSHINRs do que as cadeias alifáticas tanto dos filmes LS de Lysyl-PG quanto de DOPE (Figura 17a). Por exemplo, o $\nu_{as}(\text{PO}^{2-})$ em 1212 e 1228 cm^{-1} transformou-se em uma única banda em 1220 cm^{-1} , e o $\nu_{as}(\text{C-O-C})$ em 1169 cm^{-1} tornou-se um ombro junto à banda do fosfato no filme LS de Lysyl-PG + AuSHINRs. Em relação ao filme LS de DOPE + AuSHINRs, os fosfatos $\nu_{as}(\text{PO}^{2-})$ em 1233 cm^{-1} e $\nu(\text{C-O-PO}^{2-})$ em 1075 cm^{-1} deslocaram-se para 1237 e 1070 cm^{-1} , respectivamente. O deslocamento do $\nu_{as}(\text{PO}^{2-})$ para números de onda mais altos sugere desidratação dos grupos fosfato^{76,224}. Mudanças comparáveis nos grupos fosfato foram relatadas para monocamadas de DOPE em subfase de TBO e atribuídas à natureza eletrostática da adsorção da fenotiazina²²³. A incorporação das AuSHINRs causou apenas modificações menores nas cadeias alifáticas (Figura 17b), como o deslocamento do $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ de 2962 cm^{-1} para 2957 cm^{-1} e de 2960 para 2956 cm^{-1} para os filmes LS de DOPE e Lysyl-PG, respectivamente. Portanto, pode-se assumir que interações eletrostáticas atrativas com os fosfatos aniônicos são as principais forças motrizes que permitem a adsorção das AuSHINRs carregadas positivamente em ambas as monocamadas de DOPE e Lysyl-PG. As interações repulsivas com a etanolamina catiônica (DOPE) e a lisina (Lysyl-PG) podem ter dificultado a inserção das AuSHINRs, que provavelmente estão formando uma subcamada sob os grupos polares das monocamadas.

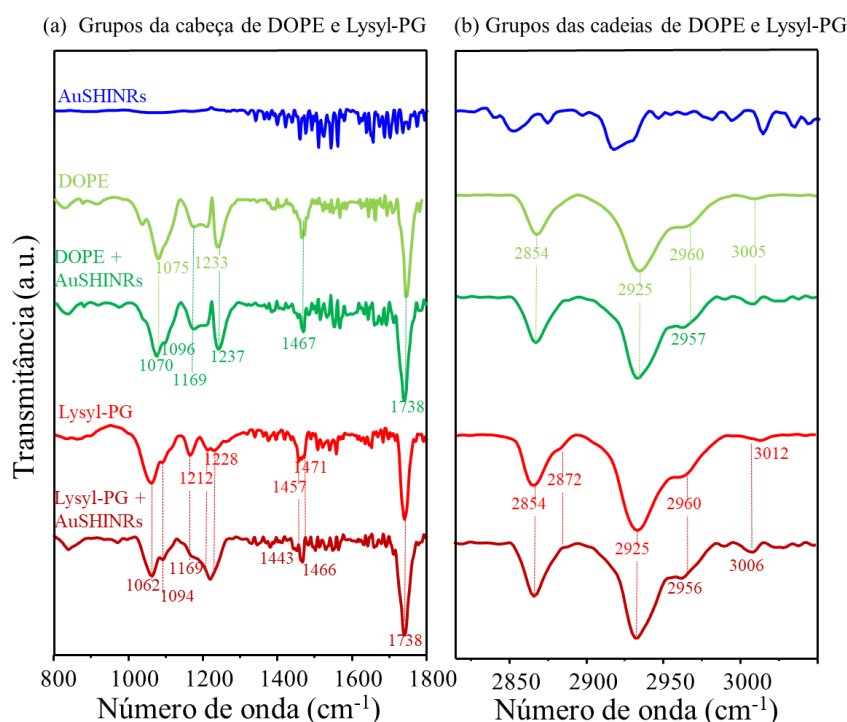


Figura 17. Espectros FTIR dos grupos polares da cabeça e alifáticos das cadeias carbônicas dos filmes LS de DOPE e Lysyl-PG, em água ultrapura e suspensão coloidal de AuSHINRs. Os espectros FTIR foram coletados a partir de 40 camadas depositadas em substrato de Ge. O espectro dos filmes *drop-casting* das AuSHINRs (azul) é fornecido como referência.

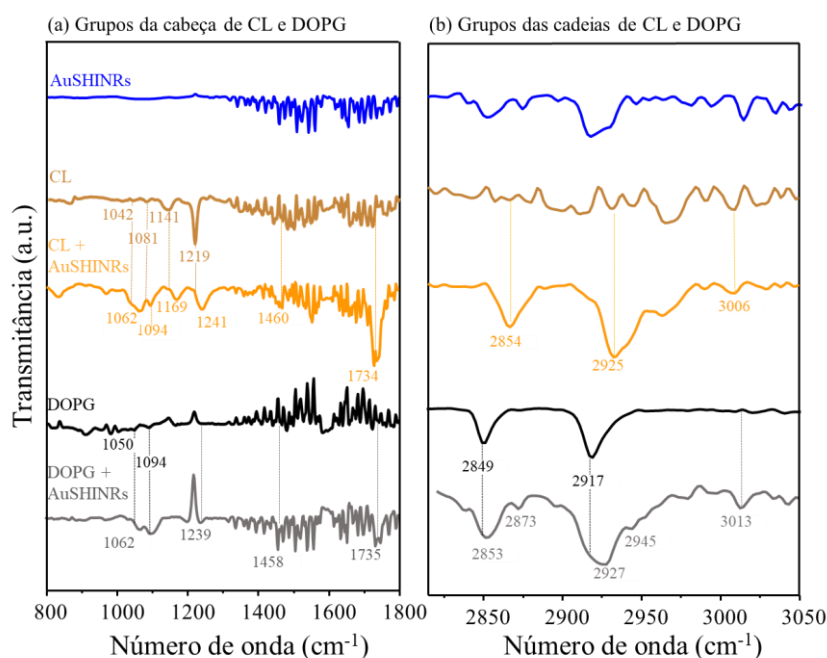


Figura 18. Espectros FTIR dos grupos polares da cabeça e alifáticos das cadeias carbônicas dos filmes LS de DOPG e CL, em água ultrapura e suspensão coloidal de AuSHINRs. Os espectros FTIR foram coletados a partir de 40 camadas depositadas em substrato de Ge. O espectro dos filmes *drop-casting* das AuSHINRs (azul) é fornecido como referência.

Tabela 3. Atribuições dos principais modos vibracionais dos filmes LS de DOPE, Lysyl-PG, DOPG e CL depositados em subfases de água ultrapura e AuSHINRs.

Atribuições	Filmes LS							
	DOPE	DOPE + AuSHINRs	Lysyl-PG	Lysyl-PG + AuSHINRs	DOPG	DOPG + AuSHINRs	CL	CL + AuSHINRs
$\nu(\text{HC}=\text{CH})$	3005	3005	3012	3006	--	3013	--	3006
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	2962	2957	2960	2956	--	2945	--	2957
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	2925	2925	--	--	2917	2927	--	2925
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$	--	--	--	--	--	2873	--	--
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	2854	2854	2854	2854	2849	2853	--	2854
$\nu(\text{C-O})$	1738	1738	1738	1738	--	1735	--	1734
$\delta(\text{CH}_2)$	--	--	1457 1463	1443 1466 1471	--	--	--	1460
$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$	1233	1237	1212 1228	1220	1243	1239	1219	1241
$\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$	1169	1169	1169	1169	--	--	1141	1169
$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$	--	1096	1094	1094	--	--	1081	1094
$\nu(\text{C-O-PO}_2^-)$	1075	1070	1062	1062	1050	1062	1042	1062
AuSHINR	2850 2918							

A incorporação das AuSHINRs nas monocamadas aniônicas causou modificações significativamente maiores nos espectros FTIR, como para os modos vibracionais dos grupos polares de DOPG e CL (Figura 18a). Por exemplo, o $\nu(\text{C-O-PO}_2^-)$ em 1050 cm^{-1} deslocou-se drasticamente para 1062 cm^{-1} , enquanto a intensidade relativa do $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ aumentou no filme LS de DOPG + AuSHINRs. Além disso, o aumento do $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ e do $\nu(\text{C=O})$ em 1239 cm^{-1} e 1735 cm^{-1} , respectivamente, sugeriu reorientação desses grupos devido à inserção das AuSHINRs ⁷⁶. Fosfatos têm demonstrado suscetibilidade à formação de ligações de hidrogênio com moléculas de H_2O e a forte ligação das AuSHINRs pode ter interferido nisso, semelhante ao relatado para monocamadas de DOPG em subfase de FS catiônicos²². No que diz respeito a CL, o $\nu(\text{C-O-PO}_2^-)$ em 1042 cm^{-1} e o $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ em 1141 cm^{-1} deslocaram-se para 1062 e 1169 cm^{-1} , enquanto o $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ e o $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ deslocaram-se de 1081 e 1219 cm^{-1} para 1094 e 1241 cm^{-1} , respectivamente. O $\nu(\text{C=O})$ a 1734 cm^{-1} também aumentou em intensidade após a incorporação das AuSHINRs. Interações eletrostáticas atrativas significativamente mais fortes com os fosfatos aniônicos podem ter permitido a inserção das AuSHINRs, gerando monocamadas de DOPG e CL mais expandidas, como discutido na Tabela 2.

Ao contrário das monocamadas de DOPE e Lysyl-PG, a extensão das modificações alcançou o $\nu(\text{C}=\text{O})$, o que pode ser indicativo de uma inserção mais profunda das AuSHINRs nas monocamadas de DOPG e CL. De fato, os deslocamentos do $\nu_s(\text{CH}_2)$ em 2849 cm^{-1} e do $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ em 2917 cm^{-1} para 2853 e 2927 cm^{-1} são evidências da inserção das AuSHINRs nas cadeias das monocamadas de DOPG (Figura 18b). Além disso, a razão de intensidade (I_s/I_{as}) entre $\nu_s(\text{CH}_2)$ e $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ aumentou de 0,99 para 1,01, sugerindo que as caudas alifáticas sofrem desorganização após a incorporação das AuSHINRs^{225,226}. Os modos $\nu(\text{CH}_2)$ da CL não são detectados de forma direta, possivelmente devido à alta desorganização das cadeias nos filmes LS (Figura 18b), o que impede a determinação do impacto das AuSHINRs nas caudas alifáticas. É provável que as interações estabelecidas após a adsorção das AuSHINRs tenham diminuído a repulsão eletrostática entre as cabeças dianiônicas da CL, como observado em trabalhos anteriores com cátions divalentes^{227,228}, permitindo não apenas uma maior deposição LS (Figura 16) mas também uma orientação dos modos $\nu(\text{CH}_2)$. O mecanismo de inserção das AuSHINRs nos arredores dos grupos de cabeça de DOPE é contrastado no esquema da Figura 19 com a inserção nas cadeias alifáticas das monocamadas de DOPG. Enquanto um mecanismo semelhante ao de DOPE é esperado para as monocamadas de Lysyl-PG, a inserção de AuSHINRs nas cadeias alifáticas da CL não pôde ser determinada.

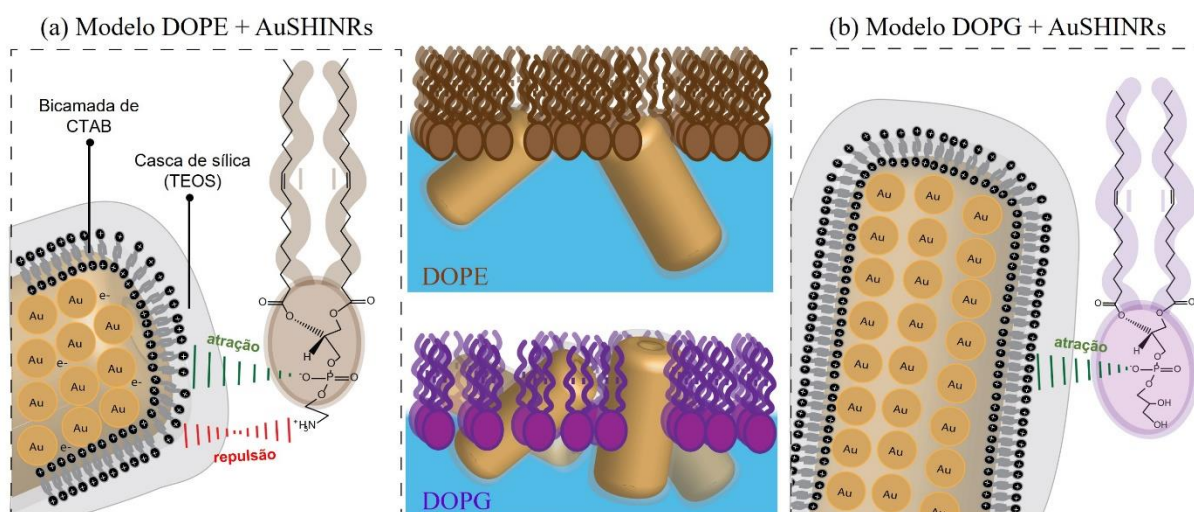


Figura 19. Representação esquemática dos mecanismos de inserção entre AuSHINRs e monocamadas de (a) DOPE e (b) DOPG.

2.3.3. Efeitos fotoinduzidos em monocamadas lipídicas desencadeados por AuSHINRs.

A evolução da área superficial relativa (A/A_0) das monocamadas de DOPE, Lysyl-PG, DOPG e CL irradiadas e não irradiadas na subfase de $1,2 \times 10^{10}$ AuSHINRs/mL foi registrada a uma pressão superficial constante de 30 mN/m, como mostrado nas Figuras 20a–d. Não foram detectados efeitos significativos na irradiação das monocamadas de fosfolipídios na subfase de água ultrapura. Além disso, as modificações causadas pela irradiação das monocamadas de DOPE e Lysyl-PG na subfase de AuSHINRs (Figura 20a e b) não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Por outro lado, a monocamada de DOPG irradiada na subfase de AuSHINRs (Figura 20c) aumentou a taxa de perda de material para a subfase, causando uma diminuição da área superficial de cerca de $4\% \pm 1\%$, enquanto um aumento na área superficial de cerca de $3,7\% \pm 0,9\%$ foi medido para as monocamadas de CL irradiadas (Figura 20d).

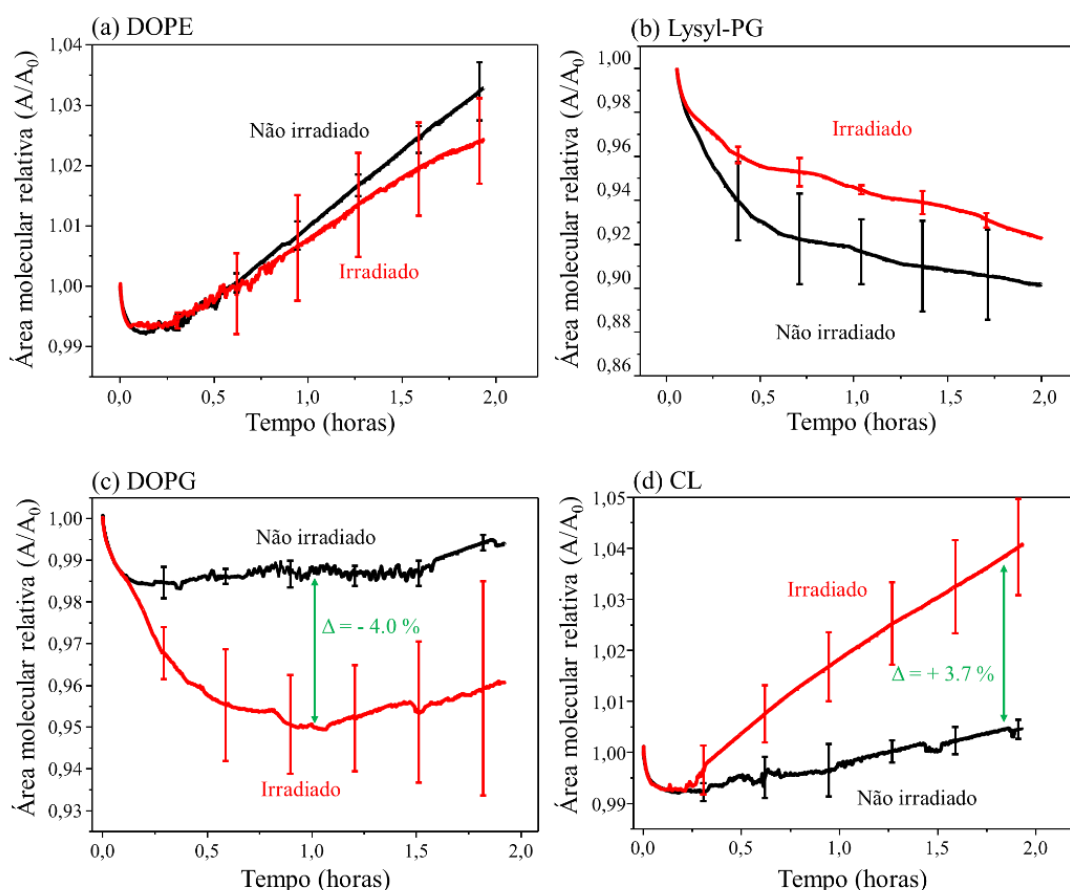


Figura 20. Evolução das áreas moleculares relativas (A/A_0) das monocamadas de Langmuir de (a) DOPE, (b) Lysyl-PG, (c) DOPG e (d) CL, irradiadas e não irradiadas, em subfase de AuSHINRs ($1,2 \times 10^{10}$ AuSHINRs/mL). A_0 é a área molecular extrapolada das isotermas em 30 mN/m.

As AuSHINRs sustentam o LSPR na excitação por luz visível, o que pode aumentar a temperatura local devido às oscilações coletivas de elétrons⁷⁸. Elétrons excitados das AuSHINRs irradiados podem decair em elétrons quentes e sensibilizar o oxigênio molecular (O_2), produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) via transferência de energia e/ou elétrons^{229,230}. A geração de $^1O_2$, um dos principais tipos de ROS, foi avaliada aqui irradiando as AuSHINRs na presença da sonda 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) (Figura 21). Notavelmente, os espectros de extinção estão em um comprimento de onda menor do que mostrado anteriormente porque as nanopartículas estão aqui dispersas em acetonitrila. Embora uma leve diminuição nas bandas de extinção das AuSHINRs pudesse ser observada junto com o tempo de irradiação, a queda na banda de absorção do DPBF a 410 nm foi muito mais evidente, indicando o aumento na concentração de $^1O_2$. É bem conhecido que as ROS podem desencadear várias reações oxidativas e causar danos ao DNA, proteínas e membranas lipídicas^{220,229,231}. Por exemplo, a hidroperoxidação de cadeias insaturadas é um resultado provável que afeta o equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico das membranas lipídicas, resultando em um aumento da área de superfície²³². Por outro lado, a propagação de reações de hidroperoxidação pode levar à clivagem das caudas de carbono, gerando aldeídos ou álcoois solúveis em água, o que resulta em uma diminuição na área de superfície da membrana lipídica²³².

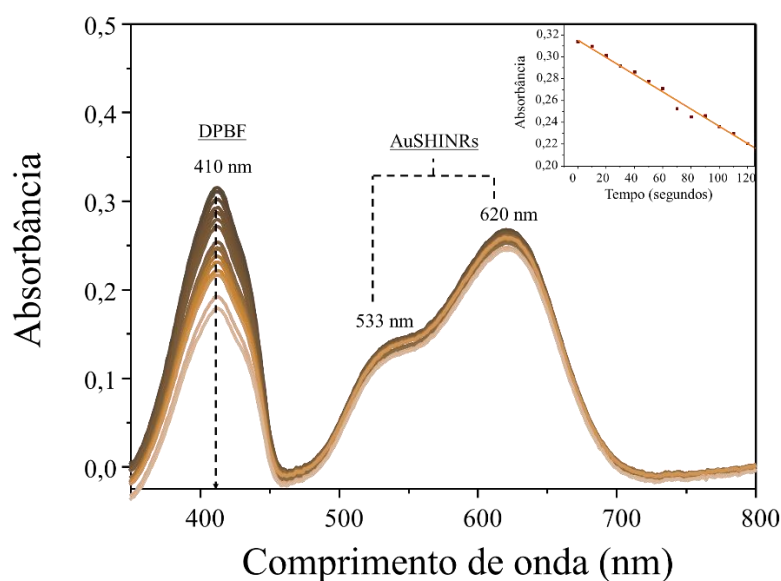


Figura 21. Espectros de absorção das AuSHINRs ($1,2 \times 10^{10}$ AuSHINRs/mL) na presença de DPBF medidos a cada 10 segundos durante a irradiação com uma fonte de LED de 630 nm (20 mW/cm^2).

Demonstramos anteriormente^{22,75} que a hidroperoxidação pode modular reações de clivagem desencadeadas por FS que penetram mais profundamente nas membranas lipídicas. Portanto, a taxa aumentada de perda de material observada em monocamadas de DOPG irradiadas (Figura 20c) é consistente com reações de clivagem das cadeias e geração de subprodutos solúveis em água, favorecidos pela inserção mais profunda das AuSHINRs na membrana. Em contraste, a hidroperoxidação pode explicar o aumento na área superficial (Figura 20d) das monocamadas de CL irradiadas, sustentado pela inserção das AuSHINRs nas proximidades dos grupos polares de CL. As modificações mais sutis observadas nas monocamadas de DOPE e Lysyl-PG irradiadas são compatíveis com a inserção limitada das AuSHINRs nessas membranas. Um padrão semelhante de modificações na área superficial foi relatado para monocamadas de extrato lipídico irradiadas de células tumorais em nanopartículas esféricas de ouro recobertas com sílica (AuSHINs). Nesse caso, a perda de material lipídico foi observada apenas em monocamadas em que as AuSHINs tinham maior inserção⁷⁷. Apesar das diferenças de forma e tamanho entre as AuSHINs e as AuSHINRs, os mecanismos de inserção nas monocamadas lipídicas parecem desempenhar um papel crucial na determinação dos resultados fotoquímicos.

Experimentos subsidiários foram realizados utilizando cultura *in vitro* de *E. coli*, cuja membrana lipídica é composta aproximadamente por 75 % PE, 20 % PG e 5 % CL²³³. O objetivo foi avaliar a atividade antimicrobiana das AuSHINRs quando incorporadas em culturas de *E. coli* e submetidas a efeitos fototérmicos induzidos pela irradiação. A Figura 22a–d mostra placas de Petri contendo as bactérias incubadas em diferentes condições: ausência de amostra (controle negativo), AuSHINRs e com o antibiótico tetraciclina (controle positivo). As amostras contendo AuSHINRs foram irradiadas, e os resultados foram comparados com aqueles obtidos sem irradiação. No controle negativo, foram observadas colônias bacterianas densamente agrupadas, enquanto as placas de Petri preparadas com a semeadura de bactérias com AuSHINRs não irradiadas mostraram colônias dispersas. Notavelmente, nenhuma colônia bacteriana foi observada nas placas contendo a semeadura de bactérias com AuSHINRs irradiadas, sugerindo efeitos fototóxicos e inativação bacteriana. Como esperado, o controle positivo também não mostrou crescimento bacteriano. Esse resultado sugere um potencial antimicrobiano das AuSHINRs fotoativadas na inibição do crescimento de *E. coli*, o que foi confirmado pelos ensaios quantitativos mostrados na Figura 22e. A presença de AuSHINRs resultou em

crescimento de *E. coli* de 98 %, o qual diminuiu significativamente para 7 % após a irradiação. Embora o ensaio antimicrobiano utilizado aqui sirva como uma investigação preliminar, os resultados indicam que interações eletrostáticas isoladas, que regem a adsorção das AuSHINRs nas membranas lipídicas, não podem induzir alterações significativas para inibir o crescimento bacteriano. No entanto, os efeitos fotoinduzidos são extremamente tóxicos, promovendo uma série de alterações celulares que levam ao efeito bactericida. Esses resultados são consistentes com as modificações fotoinduzidas desencadeadas pelas AuSHINRs nas monocamadas lipídicas, sugerindo que o dano fotodinâmico causado à membrana celular é fundamental para desencadear o efeito fototóxico nas bactérias.

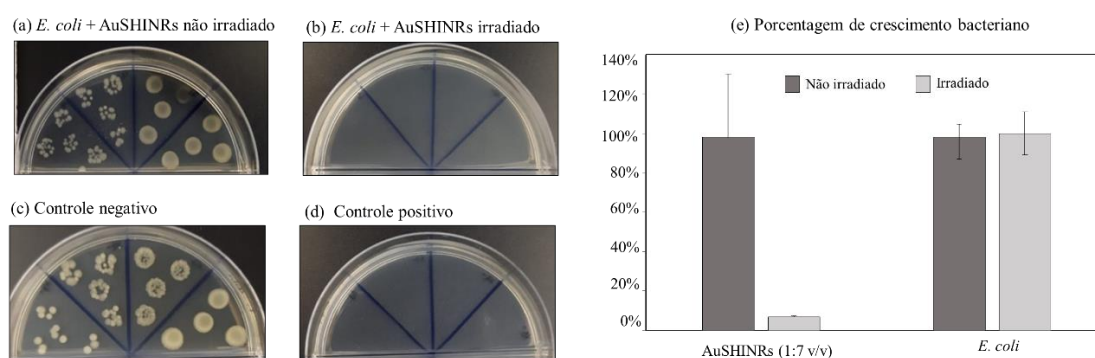


Figura 22. Fotografias retiradas das placas de cultura 24 horas posteriormente à técnica de contagem de placa por gota (diluições de 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} e não diluído), cujo meio bacteriano foi incubado com AuSHINRs na (a) ausência e (b) presença de luz irradiante ($170\text{mW}/\text{cm}^2$), com (c) apenas meia de cultura (controle negativo) e (d) tetraciclina (controle positivo). (e) Porcentagem de crescimento bacteriano dos poços celulares, irradiado e não irradiado, na ausência e presença de AuSHINRs.

2.4. Conclusões

Filmes de Langmuir e Langmuir-Shaefer (LS) de DOPE, Lysyl-PG, DOPG e CL foram fabricados aqui como um sistema bioinspirado de membranas bacterianas para desvendar os mecanismos de ligação e resultados fotoquímicos desencadeados por nanobastões de ouro recobertos com sílica (AuSHINRs). As isotermas π -A de DOPG e CL foram significativamente mais expandidas com a inserção dos AuSHINRs carregados positivamente devido a atrações eletrostáticas mais fortes com os fosfatos aniônicos, como revelado pelo FTIR coletado dos filmes LS. Embora interações eletrostáticas semelhantes possam ter conduzido as AuSHINRs para as monocamadas DOPE e Lysil-PG, forças repulsivas com a etanolamina catiônica (DOPE) e lisil (Lysil-PG) podem ter diminuído a inserção de AuSHINRs, estas que provavelmente estão formando uma subcamada abaixo os grupos polares das monocamadas. Essa penetração limitada nas monocamadas pode ser a origem da falta de efeitos significativos causados pela irradiação dos filmes DOPE e Lysil-PG na subfase de AuSHINRs. Por outro lado, monocamadas DOPG e CL irradiadas contendo AuSHINRs apresentaram uma diminuição na área superficial de 4,0% e uma área de superfície aumentada de 3,7%, respetivamente. Apesar da natureza aniônica de ambas as monocamadas, tal comportamento sugere diferentes resultados de oxidação desencadeados por espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pela hipertermia fotoinduzida. As reações de clivagem da cadeia são consistentes com o aumento da perda de material da monocamada DOPG e podem estar associadas a uma inserção mais profunda de AuSHINRs no filme. A hidroperoxidação explica o aumento da área superficial do CL, sugerindo a acomodação das AuSHINRs dentro dos grupos polares da monocamada. Experimentos *in vitro* revelaram uma diminuição substancial na viabilidade das células de *E. coli* quando expostas a AuSHINRs irradiadas, confirmando os efeitos fototóxicos significativos capazes de causar inativação bacteriana. Portanto, os mecanismos de ligação das AuSHINRs dependem da composição da membrana, modulando a inserção das AuSHINRs e consequentemente o resultado fotoquímico, cujo entendimento é fundamental para o desenvolvimento de nanomateriais fototerapêuticos altamente eficientes.

3. Capítulo III: potencializando a fototoxicidade em células tumorais colorretal humana através da nanoarquitetura para sinergia entre as terapias fototérmicas e fotodinâmicas.

3.1. Introdução

Os nanobastões de ouro recobertos com sílica (AuSHINRs) mostram-se eficientes agentes fototérmicos, devido às suas propriedades intrínsecas, como a ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) ajustável e alta eficiência na conversão de calor^{31,234–236}. Tais características desempenham um papel crucial na terapia fototérmica (TFT), principalmente no tratamento de tumores hipóxicos, que muitas vezes são resistentes aos tratamentos convencionais^{24,26,90–92}. Por outro lado, na terapia fotodinâmica (TFD), o azul de toluidina-O (TBO) se destaca como um potencial fotossensibilizador, uma vez que apresenta elevado rendimento quântico ($\Phi\Delta$) na geração de $^1\text{O}_2$ ($\Phi\Delta^1\text{O}_2 = 0,86$), juntamente com sua baixa energia de excitação ($\lambda = 630 \text{ nm}$), toxicidade mínima para células de mamíferos e propriedades hidrofílicas^{237,238}. Ajustando o LSPR para regiões espectrais no infravermelho próximo, é possível fotoativar ambas as estruturas com um único comprimento de onda de luz, potencializando o efeito sinérgico entre as terapias TFT e TFD. Essa abordagem busca maximizar os benefícios terapêuticos e minimizar os efeitos adversos, representando uma estratégia com potencial para o tratamento eficaz do câncer.

Para combinar TFT e TFD, foi produzido um compósito de AuSHINRs conjugado com TBO (AuSHINRs@TBO), com o objetivo de aumentar a eficácia no tratamento do câncer². Neste contexto, foram empregadas células tumorais colorretais humanas (Caco-2) como alvo terapêutico, considerando a alta taxa de mortalidade e a natureza agressiva do câncer colorretal. Além disso, há uma escassez de pesquisas sobre os efeitos sinérgicos das terapias fotodinâmica e fototérmica em tais alvos. Alcançar uma compreensão detalhada dos efeitos moleculares induzidos pela hipertermia e foto-oxidação é crucial nesse contexto. Portanto, neste capítulo determinaremos as interações em nível molecular e os efeitos fotoinduzidos da AuSHINRs@TBO na membrana plasmática, que é um alvo crítico e uma barreira em aplicações terapêuticas. Extratos lipídicos isolados de culturas de células Caco-2 foram fabricados em filmes de Langmuir como um sistema modelo para mimetizar membranas tumorais. A composição lipídica de Caco-2 reflete características típicas de tumores colorretais, principalmente compostas por

fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas e esfingomielinas²³⁹. Variações podem existir dependendo da origem do tumor, do microambiente e do status metabólico²⁴⁰. Evidências da adsorção de AuSHINRs@TBO foram fornecidas por isothermas de pressão superficial, enquanto as interações em nível molecular foram investigadas com espectroscopia vibracional de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS). Experimentos com culturas de células Caco-2 in vitro demonstraram que as AuSHINRs@TBO são altamente eficientes na redução da viabilidade celular sob irradiação luminosa. Como demonstraremos, os nanobastões conjugados com TBO aumentaram a geração de ROS em direção à convergência de efeitos fototérmicos e reações oxidativas, o que é promissor para um impacto terapêutico potente e direcionado contra células cancerosas.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. *Preparação e caracterização de nanobastões de ouro recobertos com sílica e conjugados com azul de toluidina (AuSHINRs@TBO)*

Os nanobastões de ouro recobertos com sílica (AuSHINRs) foram sintetizados conforme descrito anteriormente na seção 2.2.2. Em paralelo a esta síntese, um precursor de sílica-TBO foi preparado, seguindo a metodologia descrita por Grandi et al²⁴¹. Em resumo, $1,69 \times 10^{-5}$ mol de TBO (16,92 mL de 1×10^{-5} mol/L) foram misturados com $1,69 \times 10^{-5}$ mol de 3-(triethoxysilyl)propil isocianato (42 μ L de 4 mol/L) em um balão de fundo redondo sob agitação vigorosa por 24 horas. Os nanobastões de ouro recobertos com sílica e conjugados com TBO (AuSHINRs@TBO) foram obtidos misturando 1,7 mL do precursor de sílica-TBO com 10 mL de suspensão coloidal de AuSHINRs ($3,6 \times 10^{11}$ nanopartículas/mL), permitindo que a mistura fosse agitada por 30 minutos. Um recobrimento final de sílica foi colocado com três adições de 50 μ L de TEOS (20% v/v em metanol) em intervalos de 30 minutos, durante agitação vigorosa por 24 horas.

As AuSHINRs@TBO foram submetidos a três ciclos de centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos cada, para eliminar o excesso de CTAB. Em cada ciclo, as partículas sedimentadas foram ressuspensas em água ultrapura, enquanto o sobrenadante foi descartado. A Tabela 4 lista os diâmetros hidrodinâmicos (nm) obtidos do espalhamento dinâmico de luz (DLS) para cada etapa de lavagem. A caracterização tanto das AuNRs, AuSHINRs quanto das AuSHINRs@TBO envolveu espectroscopia de absorção UV-Vis

(Agilent Cary 60), potencial zeta (Malvern Panalytical, Zetasizer Nano S90), fluorescência (630 nm, Renishaw in-ViA) e microscopia eletrônica de transmissão (FEI Tecnai, 120 kV). A eficiência fototérmica das AuSHINRs e da AuSHINRs@TBO foi avaliada por fotoativação da suspensão coloidal em 630 nm com uma fonte de LED de 20 mW/cm² (BioLambda).

Tabela 4. Diâmetro hidrodinâmico (nm) medido por espalhamento dinâmico de luz (DLS) para cada etapa realizada para limpar e concentrar as AuSHINRs@TBO.

Etapas	DLS (nm)
0	32,6 ± 0,6
1	21,4 ± 0,3
2	21,6 ± 0,2
3	22,8 ± 0,4

3.2.2. Cultura celular de Caco-2

As células de carcinoma colorretal humano (Caco-2, ref. 0059) foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (RJ, Brasil), cultivadas em meio RPMI (ref. 23400021, Gibco) contendo antibiótico-antimicótico (ref. 15240-062, Thermo), suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (FBS; ref. 0521-500, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), e cultivadas em frascos T-75 cm² (ref. 3290, Corning Glass Works, Corning, NY, EUA). As células foram manipuladas em um ambiente estéril e as condições de incubação foram mantidas a 37° C e 5% de CO₂. O cultivo celular envolveu a troca de meio com RPMI a cada 48 horas e passagem semanal quando a confluência celular atingiu no mínimo 80%. As células foram enxaguadas com 5 mL de solução tampão fosfato salino (PBS), destacadas do frasco usando 1 mL de tripsina, e então semeadas em uma placa de 96 poços por 24 horas para atingir uma confluência de $\geq 80\%$. As células restantes colhidas foram transferidas para um novo frasco contendo meio fresco para continuação do cultivo. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de atividade metabólica mitocondrial (MTT) [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo] (ref.: M2003; Sigma Aldrich). As células Caco-2 semeadas em placa de 96 poços foram submetidas à incubação com diferentes proporções de AuSHINRs e AuSHINRs@TBO (variando de 1:7, 1:8, 1:9 a 1:10 v/v em meio de cultivo) por 1 hora. Células cultivadas

na ausência de nanopartículas foram designadas como o controle celular viável 100% (CC), e a introdução de peróxido de hidrogênio foi empregada como controle de morte (DC). A cultura Caco-2 foi irradiada por 1 hora usando o sistema LED (BioLambda) conectado a um controlador digital, ajustado para 630 nm e 20 mW/cm². As células irradiadas em RPMI (sem AuSHINRs) foram designadas como o controle de luz (LC). O meio de cultura foi então substituído por PBS e lavado suavemente, seguido por incubação (40–60 minutos) com 0,5 g/L de MTT. Dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,05 mL foi adicionado aos poços para solubilizar os cristais de formazan, e a absorbância foi medida em 560 nm utilizando o leitor de microplaca Multiskan™ FC.

3.2.3. *Extração lipídica de Caco-2*

As células foram desprendidas e coletadas usando tripsina (4 minutos a 37 °C) e, em seguida, separadas em tubos Falcon para centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. Após a remoção do sobrenadante, 1 mL de água ultrapura foi adicionada e submetida a vórtice por 10 minutos. Posteriormente, 4 mL de clorofórmio foram adicionados, e a mistura foi submetida a mais 10 minutos de agitação em vórtex e 30 minutos de sonicação. A solução resultante formou duas fases distintas, uma composta por componentes celulares solúveis em água e outra contendo fragmentos solúveis em clorofórmio. A fase anterior foi descartada, deixando apenas a fase de clorofórmio enriquecida com estruturas lipídicas de Caco-2. A solução final foi transferida para um frasco de vidro e armazenada em um freezer a -20 °C.

3.2.4. *Monocamadas de Langmuir e caracterização do extrato lipídico de Caco-2*

As monocamadas de Langmuir do extrato lipídico de Caco-2 foram produzidas utilizando uma cuba KSV-NIMA (KN1002, Biolin Scientific), espalhando uma solução do extrato lipídico sobre uma subfase de solução tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,4). A concentração inicial do coloide AuSHINRs@TBO foi dobrada, seguida de co-espalhamento com o extrato lipídico de Caco-2 em frações variadas de 10:1, 5:1 e 1:1 v/v (Caco-2: AuSHINRs@TBO). Antes do início de cada experimento, o solvente foi deixado evaporar por 10 minutos e a temperatura da subfase foi mantida a 21 °C usando o banho

ultratermostático (SolidShell SSDu-10 L). Isotermas de pressão superficial (π) versus área (A) foram obtidas através do método de Wilhelmy, empregando uma haste de platina, durante o fechamento simétrico das barreiras a 5 mm/min²⁴². Para garantir a reprodutibilidade dentro de ± 2 mN/m, pelo menos 3 experimentos foram conduzidos para cada isoterma π -A. Os experimentos de irradiação foram realizados a uma pressão superficial de 30 mN/m com um LED de 630 nm (20 mW/cm²) (BioLambda) instalado a 20 cm acima dos filmes de Langmuir. As medidas de PM-IRRAS foram realizadas em uma cuba KSV PMI550 (KSV, Finlândia), com espectros registrados para o extrato lipídico de Caco-2 puro e monocamadas de Caco-2: AuSHINRs@TBO (1:1 v/v) a 30 mN/m, tanto antes quanto após a irradiação. A reprodutibilidade dos espectros foi garantida para atribuir deslocamentos de bandas à adsorção de AuSHINRs@TBO e subsequente foto-oxidação, em vez de variabilidade nos resultados. As imagens de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) foram capturadas utilizando um microscópio Accurion (Nanofilm EP4) acoplado à cuba de Langmuir. Este *setup* permitiu a avaliação em tempo real de domínios de extrato sobre PBS, na presença e ausência de AuSHINRs@TBO (1:1 v/v do extrato lipídico de Caco-2).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Nanobastões de ouro recobertos com sílica e conjugados com azul de toluidina-O (AuSHINRs@TBO)

As Figuras 23a e 23b exibem os espectros de extinção UV-Vis e as microscopias eletrônicas de transmissão (TEM) das AuNRs, AuSHINRs e AuSHINRs@TBO, respectivamente. A banda de extinção inicial em 524 nm refere-se à ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) transversal, enquanto a banda em 638 nm é atribuída à LSPR longitudinal^{108,243,244}. O comprimento (L) e a largura (W) dos nanobastões foram medidos a partir das imagens de TEM na Figura 24, resultando em uma razão de aspecto ($AR = L/W$) próxima a 1,9. Este valor é coerente com a absorção da banda longitudinal na luz vermelha (~ 630 – 660 nm)^{243–245}, dentro da janela terapêutica almejada^{245,246}. Com o revestimento de sílica, o LSPR longitudinal desloca-se de 638 nm para 649 nm devido a uma mudança no índice de refração das AuSHINRs^{78,107,243,247}. A conjugação com azul de toluidina-O (TBO) não induziu um deslocamento nos espectros de extinção. No entanto, o revestimento final de sílica causou um leve deslocamento na LSPR longitudinal para 652 nm. O potencial zeta na Tabela 5 aumentou de $+25$ mV ± 1

para AuSHINRs para $+29 \text{ mV} \pm 5$ para AuSHINRs@TBO devido à conjugação com o TBO catiônico. Como evidenciado em outros estudos, a segunda camada de sílica diminui o impacto da carga, resultando em pequenas diferenças entre as duas amostras^{243,247–249}.

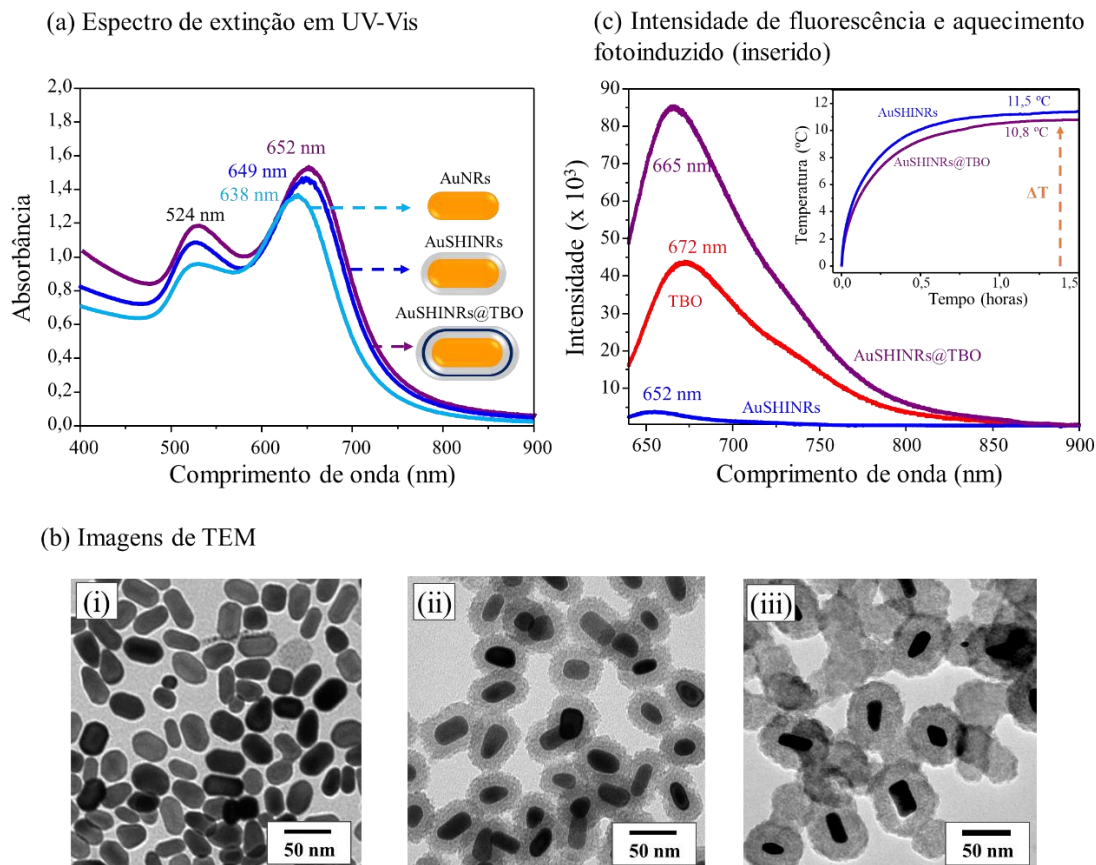


Figura 23. (a) Espectros de UV-Vis das AuNRs, AuSHINRs e AuSHINRs@TBO, todas diluídas em água ultrapura (1:1 v/v). (b) Imagens de TEM capturadas para (i) AuNRs, (ii) AuSHINRs e (iii) AuSHINRs@TBO. (c) Espectro de fluorescência das AuSHINRs, solução de TBO (10^{-3} mol/L) e coloide de AuSHINRs@TBO, respectivamente. O gráfico inserido mostra o aquecimento fotoinduzido das AuSHINRs e AuSHINRs@TBO com uma fonte de LED de 630 nm (20 mW/cm^2).

A Figura 23c mostra os espectros de fluorescência de TBO (10^{-5} mol/L), AuSHINRs e AuSHINRs@TBO. Embora a concentração exata de TBO conjugado nas AuSHINRs seja desconhecida, é razoável presumir que deve ser abaixo de 10^{-6} mol/L , já que essa foi a concentração inicial empregada no processo de conjugação. Devido à conjugação, a emissão de TBO desloca-se de 672 nm para 665 nm e a intensidade de fluorescência das AuSHINRs@TBO aumenta consideravelmente. Esse aumento de sinal de fluorescência^{250,251} pode ser atribuído ao ambiente eletromagnético amplificado próximo à superfície metálica, resultando em sinais de fluorescência intensificados. A

inclusão de uma camada de sílica mitiga a supressão da fluorescência (fenômeno conhecido como *quenching*) estabelecendo uma distância adequada entre o corante e o metal^{250,252–254}. Portanto, a fluorescência amplificada de superfície (SEF) corrobora com a conjugação bem-sucedida do TBO com AuSHINRs. A inserção na Figura 23c mostra a conversão de calor das AuSHINRs@TBO sob irradiação, atingindo um patamar de temperatura em aproximadamente 11°C. Uma comparação com a capacidade de conversão de calor de AuSHINRs sem TBO revela um aumento similar na temperatura, confirmando que a conjugação com TBO e a adição de uma camada extra de sílica não comprometeram a eficiência fototérmica das AuSHINRs²⁵⁵.

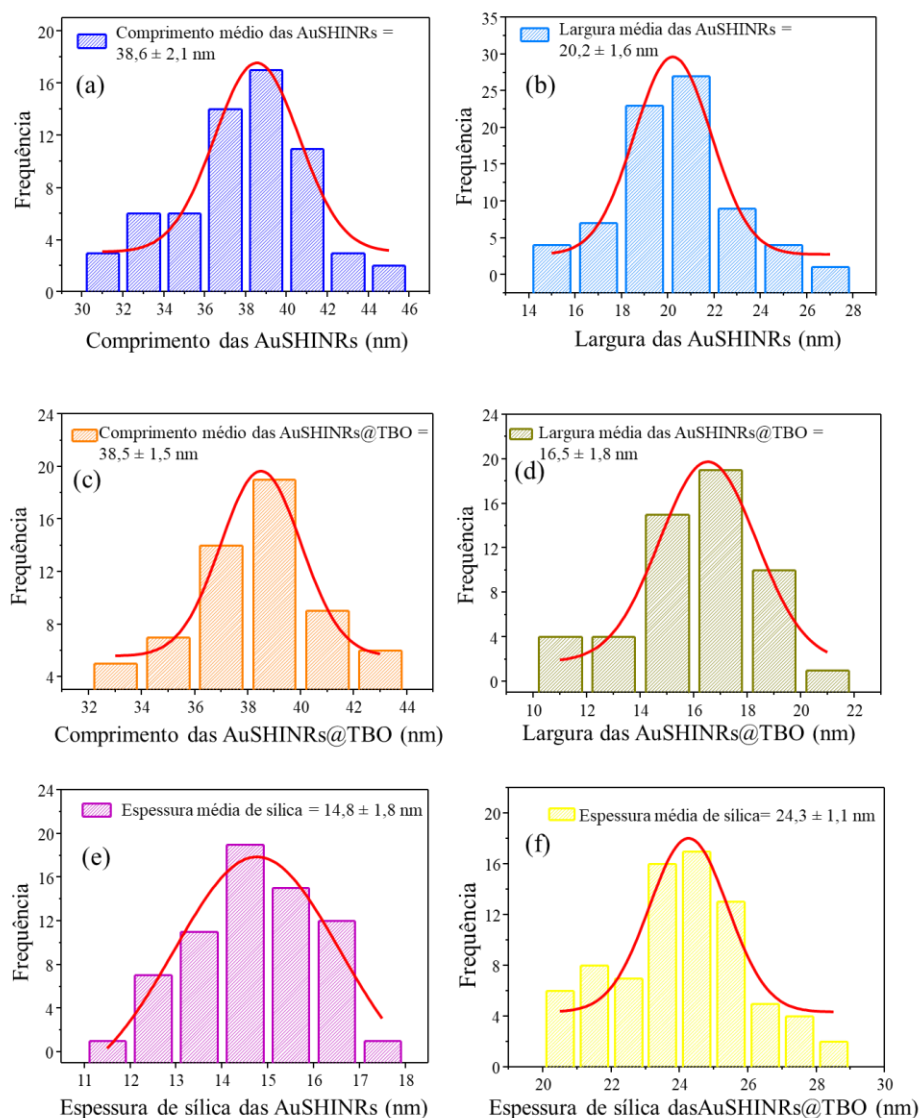


Figura 24. Histogramas ilustrando a distribuição de tamanho das AuSHINRs e AuSHINRs@TBO foram gerados com base nas imagens de TEM. As dimensões médias de ambos (a,c) comprimento (L), (b,d) largura (W) e (e,f) espessura da camada de sílica foram determinadas.

Tabela 5. Potencial zeta e espessura média da camada de sílica das AuSHINRs e AuSHINRs@TBO.

Nanoestruturas	Potencial zeta (mV)	Espessura média de sílica via TEM (nm)
AuSHINRs	$+ 25 \pm 1$	15 ± 2
AuSHINRs@TBO	$+ 29 \pm 5$	24 ± 1

3.3.2. A incorporação de AuSHINRs@TBO em monocamadas de Langmuir de Caco-2

As isotermas π -A do extrato lipídico de Caco-2, das AuSHINRs@TBO e das misturas de Caco-2: AuSHINRs@TBO (10:1, 5:1 e 1:1 v/v) em PBS são exibidas na Figura 25a. As AuSHINRs@TBO em PBS foram ativos na superfície devido ao efeito *salting-out*²⁵⁶. De acordo com a Tabela 6, aumentar o volume do coloide dentro dos filmes mistos de Caco-2 causa um deslocamento nas isotermas π -A para áreas moleculares maiores, indicando a incorporação de AuSHINRs@TBO. Investigações anteriores sugeriram que a incorporação de AuSHINRs²⁵⁵ e TBO²² em membranas bioinspiradas é impulsionada por interações eletrostáticas atrativas com grupos negativamente carregados nas cabeças polares dos fosfolipídios. As membranas celulares não tumorais são assimétricas, com fosfatidilcolinas (PC) predominantemente na monocamada externa e fosfatidilserinas (PS) principalmente localizadas na monocamada interna²⁵⁷. Em células tumorais, essa assimetria inerente é comprometida, pois PS também são encontradas na monocamada externa da membrana celular^{258–260}. As PS têm cargas negativas em sua região polar, originadas de grupos fosfatos e carboxílicos, potencialmente favorecendo forças atrativas com as AuSHINRs@TBO ($\zeta = +29$ mV). No entanto, a presença de grupos positivamente carregados no extrato lipídico também pode desempenhar um papel e dificultar a adsorção dos nanobastões em membranas devido a forças repulsivas²⁵⁵.

A Figura 25b mostra imagens de BAM para monocamadas de extrato lipídico de Caco-2 puro e aquelas contendo AuSHINRs@TBO (1:1 v/v do extrato lipídico de Caco-2). Aqui, nosso foco foi utilizar a proporção mais alta de nanoestruturas conjugadas, escolhida por seus notáveis deslocamentos nas isotermas. Em monocamadas de Caco-2, não foi observada distinção entre 0 e 30 mN/m, sugerindo que a heterogeneidade do extrato não afeta adversamente a acomodação molecular, mesmo sob condições de alta compactação. A 0 mN/m, filmes contendo AuSHINRs@TBO não mostraram diferença

morfológica discernível, sugerindo que as nanoestruturas não induzem autoagregação ou mudanças organizacionais nas estruturas lipídicas. No entanto, à medida que a pressão aumenta até 30 mN/m e os filmes se tornam mais compactados, domínios significativos emergem, indicando que as AuSHINRs@TBO alteram a organização inicial das moléculas lipídicas. Essas interações em nível molecular foram investigadas via PM-IRRAS, como discutido a seguir.

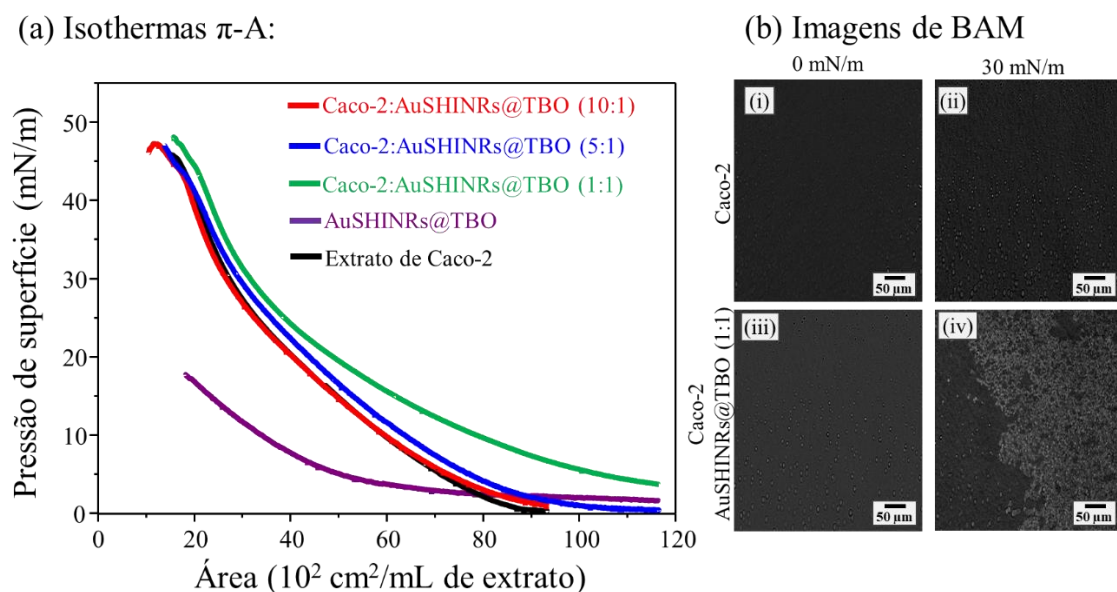


Figura 25. (a) Isothermas π -A do extrato lipídico de Caco-2, da dispersão da solução de coloide de AuSHINRs@TBO e misturas de Caco-2: AuSHINRs@TBO (10:1, 5:1 e 1:1 v/v) em PBS. (b) Imagens de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) registradas em 0 e 30 mN/m para (i, ii) extrato lipídico de Caco-2 e (iii, iv) misturas de Caco-2: AuSHINRs@TBO (1:1 v/v).

Tabela 6. Os deslocamentos relativos na área por lipídio $[(A-A_0)/A_0] \times 100$, induzidos pela incorporação de AuSHINRs@TBO. A_0 é a área extrapolada em 30 mN/m em PBS, e A é a área correspondente na presença de AuSHINRs@TBO.

Proporção extrato:nanopartículas	Mudança relativa de área $[(A - A_0)/A_0] \times 100$
Caco-2: AuSHINRs@TBO (10:1)	$0.3\% \pm 1.6$
Caco-2: AuSHINRs@TBO (5:1)	$11.2\% \pm 1.6$
Caco-2: AuSHINRs@TBO (1:1)	$57.1\% \pm 2.3$

A Figura 26 exibe os espectros de PM-IRRAS registrados para o extrato lipídico de Caco-2 puro e as monocamadas de AuSHINRs@TBO: Caco-2 (1:1 v/v). As

atribuições dos principais modos de vibração e os deslocamentos causados pela inserção de AuSHINRs@TBO são fornecidos na Tabela 7. Os grupos hidrofílicos mostram alterações mais pronunciadas na Figura 26a devido a uma maior inserção de nanobastões em comparação com as cadeias alifáticas. Por exemplo, houve efeitos significativos nos grupos fosfato, com $\nu_{as}(C-O-PO^{2-})$ em 1043 cm^{-1} , $\nu_s(PO^{2-})$ em 1096 cm^{-1} e $\nu_{as}(PO^{2-})$ em 1236 cm^{-1} deslocando-se para 1023 , 1104 e 1226 cm^{-1} , respectivamente. Deslocamentos comparáveis foram relatados para monocamadas sintéticas em coloide de AuSHINRs²⁵⁵ e subfase de TBO²⁶¹, atribuídos à natureza eletrostática da adsorção. O deslocamento de $\nu_{as}(PO^{2-})$ para números de onda mais baixos implica na hidratação dos grupos fosfato²⁶². Além disso, modificações no grupo $\nu_{as}(C-O-PO^{2-})$ foram acompanhadas por um grande aumento de intensidade na presença de AuSHINRs@TBO, indicando mudanças na organização molecular. Um efeito semelhante foi observado para a banda $\nu_{as}(CN^+(CH_3)_3)$ em 978 cm^{-1} , que não era mais discernível no filme de Caco-2 contendo AuSHINRs@TBO. A região entre $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ caracteriza a refletividade da água interfacial^{263,264}. Inicialmente, a banda do éster carbonílico se apresenta dividida em dois picos, em 1723 cm^{-1} e 1748 cm^{-1} , correspondendo, respectivamente, aos estiramentos de ésteres hidratados e não hidratados. Após a incorporação de AuSHINRs@TBO, há um aumento na intensidade relativa em 1748 cm^{-1} , indicando desidratação da monocamada.

A incorporação de AuSHINRs@TBO induziu mudanças mínimas nas cadeias alifáticas, como mostrado na Figura 26b. Uma pequena modificação foi observada na banda $\nu_s(CH_2)$, deslocando-se de 2846 para 2851 cm^{-1} . A razão de intensidade entre $\nu_s(CH_2)$ e $\nu_{as}(CH_2)$ (I_s/I_{as}) aumentou de $0,66$ para $0,84$, indicando uma diminuição na ordem das cadeias de hidrocarbonetos, enquanto a banda $\nu_{as}(CH_3)$ em 2954 cm^{-1} não foi mais observada. Portanto, a inserção de AuSHINRs@TBO é principalmente governada por interações eletrostáticas com a região polar da monocamada de Caco-2, já que as forças repulsivas de grupos catiônicos como a colina impedem uma inserção mais profunda. As forças atrativas com os grupos fosfato favorecem à adsorção na monocamada, induzindo desidratação dos grupos carbonila e alterações na ordenação das cadeias alifáticas, como indicado na Figura 28.

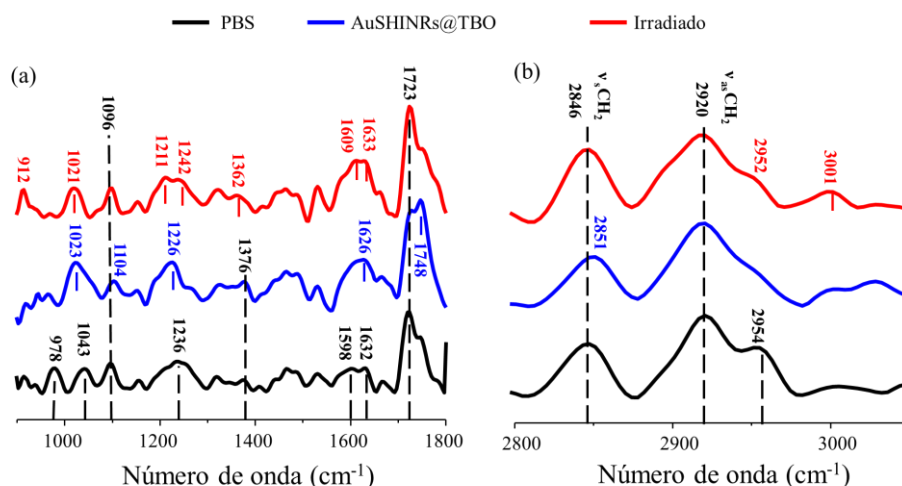


Figura 26. Espectros de PM-IRRAS registrados para o extrato lipídico de Caco-2 puro e monocamadas de AuSHINRs@TBO: Caco-2 (1:1 v/v), antes e depois da irradiação. As medições foram realizadas em subfase de PBS a 30 mN/m. Os espectros foram divididos para destacar os modos vibracionais das (a) cabeças polares e (b) cadeias alifáticas.

Tabela 7. Atribuições dos principais modos vibracionais das monocamadas de extrato lipídico de Caco-2 puro e deslocamentos induzidos pela incorporação de AuSHINRs@TBO (1:1 v/v) e irradiação.

Monocamadas de extrato lipídico de Caco-2			
Atribuições	puras	+ AuSHINRs@TBO	
		non-irradiated	irradiated
δ (NH_3^+) _{rocking}	--	--	912
+ $\nu(\text{CN})$			
$\nu_{\text{as}} \text{CN}^+(\text{CH}_3)_3$	978	--	--
$\nu_{\text{as}} (\text{C-O-PO}_2^-)$	1043	1023	1021
$\nu_{\text{s}} (\text{PO}_2^-)$	1096	1104	1098
$\nu_{\text{as}} (\text{PO}_2^-)$	1236	1226	1242
$\delta_{\text{s}} (\text{CH}_3)$	1376	1376	1362
$\delta(\text{H}_2\text{O})$	1598	1626	1609
	1632		1633
$\nu (\text{C-O})$	1723	1728	1726
	1748	1748	1752
$\nu_{\text{s}} (\text{CH}_2)$	2846	2851	2846
$\nu_{\text{as}} (\text{CH}_2)$	2920	2920	2920
$\nu_{\text{as}} (\text{CH}_3)$	2954	--	2952

3.3.3. Efeitos fotoinduzidos por AuSHINRs@TBO em monocamadas de extrato lipídico de Caco-2

O impacto das AuSHINRs@TBO (1:1 v/v) em monocamadas de extrato lipídico de Caco-2 sob irradiação luminosa foi avaliado medindo a progressão relativa da área superficial (A/A_0) a uma pressão constante de 30 mN/m, conforme mostrado na Figura 27. Enquanto a irradiação por si só não causou um efeito significativo em monocamadas de Caco-2 puras, uma diminuição da área foi observada para monocamadas não irradiadas devido à perda de material atribuída à oxidação não controlada²⁶⁵. A taxa de perda de material diminuiu após a irradiação, indicando uma maior estabilidade das monocamadas. A diferença entre as curvas irradiadas e não irradiadas (Δ) sugeriu um aumento geral na área ocupada pelo extrato de cerca de 1,0%. As AuSHINRs mantêm a ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) após a excitação por luz no infravermelho próximo, levando a um aumento localizado da temperatura resultante das oscilações coletivas de elétrons²⁶⁶. No capítulo anterior, mostramos que as AuSHINRs irradiadas geram elétrons excitados que subsequentemente decaem em elétrons quentes, sensibilizando o oxigênio molecular (O_2) e iniciando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por transferência de energia ou elétrons²⁵⁵. Além disso, o TBO inicia reações do tipo II, produzindo oxigênio singlete ($^1O_2$) capaz de criar grupos hidroperóxidos nas proximidades de insaturações de fosfolipídios^{22,267,268}. Portanto, o efeito sinérgico das AuSHINRs e TBO após a irradiação é esperado para aumentar a geração de ROS, incluindo $^1O_2$. Isso pode levar a reações de hidroperoxidação, alinhando-se com o aumento observado na área superficial das monocamadas irradiadas contendo AuSHINRs@TBO. Tal aumento de área, embora não seja altamente significativo, é provavelmente atribuído à complexidade inerente do extrato celular. Desafios semelhantes foram documentados em estudos recentes envolvendo monocamadas de extrato lipídico tumoral, onde obter efeitos mais pronunciados mostrou-se intrincado^{76,77}. Um modelo ilustrativo do mecanismo de ligação e impacto da fotoreação é apresentado na Figura 28.

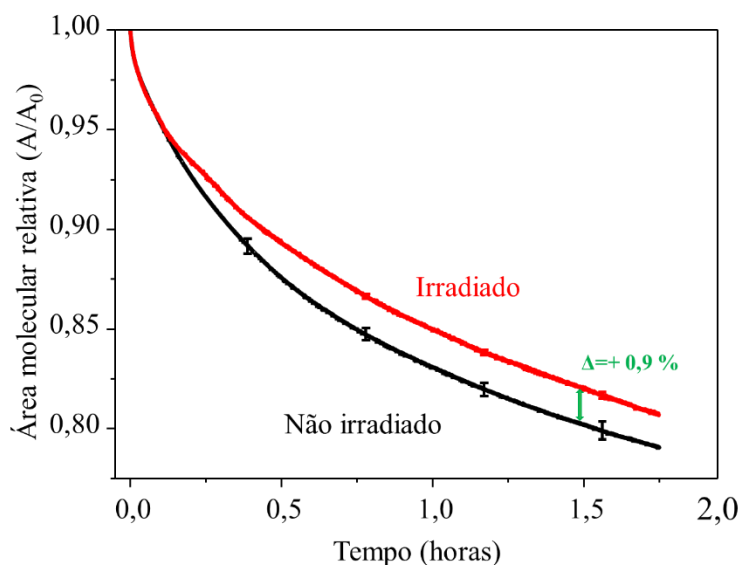


Figura 27. Progressão da área relativa (A/A_0) de monocamadas de Caco-2: AuSHINRs@TBO (1:1 v/v) irradiadas e não irradiadas registradas em 30 mN/m.

A irradiação de monocamadas de extrato lipídico de Caco-2 contendo AuSHINRs@TBO (1:1 v/v) causa mudanças significativas no espectro de PM-IRRAS, especialmente nos grupos cabeça, como mostrado na Figura 26. Por exemplo, a banda $\nu_{as}(C-O-PO^{2-})$ persistiu em 1021 cm^{-1} , enquanto o $\nu_s(PO^{2-})$ retornou à sua vibração original em 1098 cm^{-1} . Um grupo vibracional distinto surgiu em 912 cm^{-1} , correspondente ao modo de vibração do NH^{3+} e modo de estiramento de C-N, característico das fosfatidilserinas⁷⁸. A banda do CH_3 mudou de 1376 cm^{-1} para 1362 cm^{-1} . O grupo fosfato previamente em 1226 cm^{-1} dividiu-se em duas bandas em 1211 e 1242 cm^{-1} , relacionadas à hidratação e desidratação desses grupos, respectivamente. Além disso, o modo de vibração associado a carbonila hidratada torna-se mais pronunciado em 1726 cm^{-1} . Nos grupos alifáticos, as mudanças nos modos vibracionais são limitadas ao reaparecimento da banda CH_3 em 2952 cm^{-1} . A razão de intensidade entre $\nu_s(CH_2)$ e $\nu_{as}(CH_2)$ (I_s/I_{as}) diminuiu de 0,84 para 0,57, indicando uma maior ordem das cadeias carbônicas. As mudanças nos espectros de PM-IRRAS induzidas pela irradiação sugerem modificações no empacotamento da monocamada, embora os detalhes precisos dessas modificações não possam ser determinados com os presentes resultados. No entanto, são consistentes com a formação de grupos hidroperóxido, que ocorrem quando cadeias insaturadas são atacadas por $^1O_2$. Um esquema representando o impacto das reações oxidativas na organização da monocamada é mostrado na Figura 28.

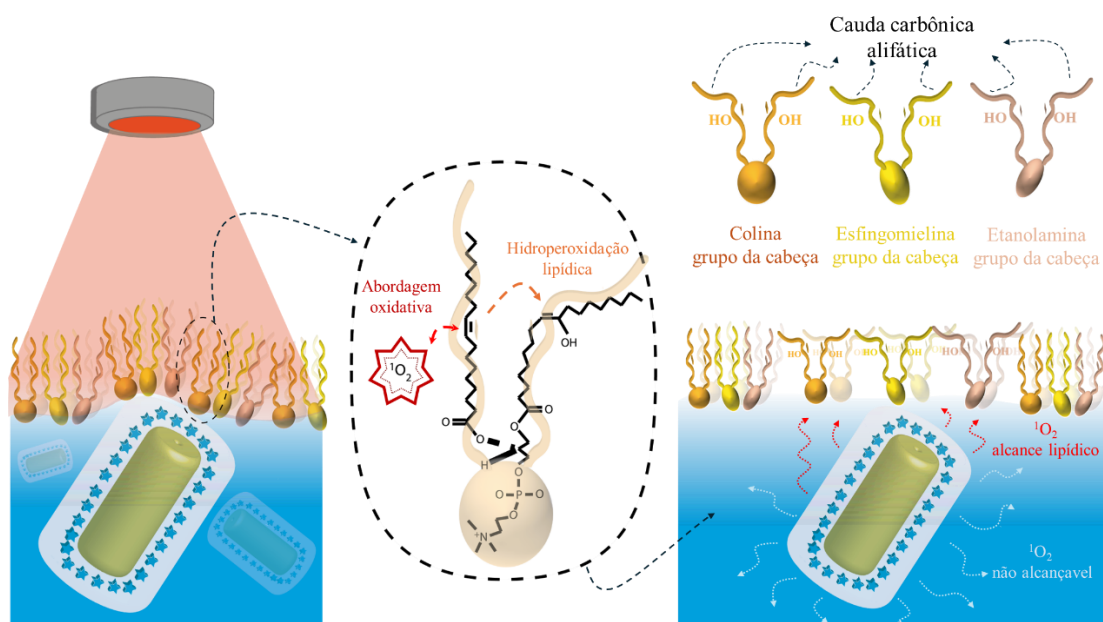


Figura 28. Representação esquemática do mecanismo de foto-oxidação de AuSHINRs@TBO em monocamadas de extrato lipídico de Caco-2.

3.3.4. Impacto fotoinduzido em culturas de células Caco-2 por AuSHINRs@TBO

Nesta seção, testes de atividade metabólica mitocondrial (MTT) foram realizados em culturas de células Caco-2 após exposição a AuSHINRs e AuSHINRs@TBO irradiados e não irradiados. Os colóides foram diluídos em meio de cultura em diferentes proporções volumétricas (1:10, 1:9, 1:8 e 1:7 v/v) para mitigar a toxicidade inerente atribuída ao surfactante CTAB utilizado na síntese de AuNRs. A Figura 29a mostra uma leve redução na viabilidade celular na ausência de luz para as AuSHINRs, contrastando com a diminuição significativa observada para as AuSHINRs@TBO na Figura 29b nas proporções de diluição de 1:8 e 1:7. As culturas de Caco-2 contendo AuSHINRs mostraram susceptibilidade mínima a efeitos fototóxicos, com a redução mais significativa na viabilidade observada na proporção de diluição de 1:7, de 90,2% para 77,7%. Para superar a toxicidade inerente dos nanobastões de ouro e melhorar a eficiência fototérmica, Huang et al. aumentaram a especificidade das nanoestruturas introduzindo anticorpos específicos em sua superfície²⁶⁹. De fato, alcançar um impacto substancial em culturas de células tumorais por meio de efeitos fototérmicos requer indução de calor acima de 43 °C, devido às altas taxas de sobrevivência abaixo dessa temperatura²⁷⁰. Nessa proporção de diluição de AuSHINRs (1:7 v/v), é possível que não apenas a eficiência

fototérmica, mas também a geração de ROS possam ter sido significativamente diminuídas. Por outro lado, a incorporação de AuSHINRs@TBO aumentou o efeito fototóxico, perceptível mesmo na proporção mais diluída (1:10 v/v), levando a uma redução na viabilidade de 87,5% para 39,0%. Essas observações revelaram um efeito sinérgico, em que as AuSHINRs@TBO aumentaram a geração de ROS com uma combinação de efeitos fototérmicos e reações oxidativas. Jang et al.²⁷¹ exploraram uma abordagem similar de conjugação de nanobastões de ouro e fotossensibilizador (AlPcS4). Eles descobriram que essas nanopartículas entregavam eficientemente AlPcS4 às células-alvo, aumentando seu efeito inibitório sobre o carcinoma de células escamosas (SCC7). No entanto, seu estudo não avaliou efeitos fototérmicos, e as nanopartículas conjugadas careciam de fluorescência, sugerindo extinção.

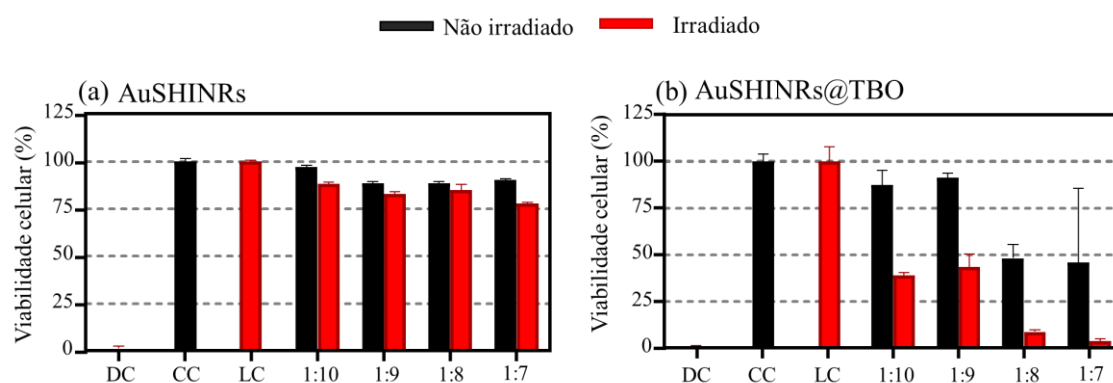


Figura 29. Viabilidade celular de Caco-2 após exposição a (a) AuSHINRs e (b) AuSHINRs@TBO irradiados e não irradiados em proporções de diluição volumétrica (v/v) de 1:10, 1:9, 1:8 e 1:7 no meio de cultura.

As alterações morfológicas induzidas pela interação e irradiação de células Caco-2 cultivadas com AuSHINRs e AuSHINRs@TBO foram avaliadas por microscopia confocal de fluorescência. A investigação concentrou-se em proporções de diluição de 1:9 e 1:8 v/v no meio de cultura, com as mudanças identificadas destacadas através da coloração do núcleo (azul) e da membrana plasmática (verde). Em relação ao grupo controle, as AuSHINRs causaram modificações morfológicas mínimas em ambas as diluições (1:9 e 1:8 v/v), como evidenciado por núcleos uniformes e membranas plasmáticas bem definidas nas microscopias. Alterações mínimas na marcação da membrana foram evidentes após a incubação com AuSHINRs@TBO em uma proporção de diluição de 1:8, possivelmente indicativas da citotoxicidade observada nos ensaios de MTT. A influência da fotoativação de nanoestruturas nas células Caco-2 foi avaliada após

uma irradiação de 1 hora. Como mostrado na Figura 30, a irradiação isolada teve efeitos mínimos na integridade do núcleo celular e da membrana, semelhantes aos observados nos grupos irradiados contendo AuSHINRs. Essa consistência em um impacto mínimo é indicativa dos baixos efeitos fototóxicos das AuSHINRs e pode ser atribuída ao efeito de diluição, pois há uma correlação entre a concentração de nanoestruturas e a geração de calor²⁷². Em contraste, as AuSHINRs@TBO irradiados induziram modificações significativas associadas à fototoxicidade das nanoestruturas devido ao efeito sinérgico. Em uma proporção de 1:9 v/v, as membranas exibiram características fibrosas elevadas, enquanto em uma proporção de 1:8 v/v, tanto a membrana celular quanto os núcleos apresentaram fragmentação. As características fibrosas observadas estão alinhadas com a adsorção de AuSHINRs@TBO observada na monocamada de Langmuir, sugerindo que a membrana plasmática é um alvo primário para intervenção terapêutica. A fragmentação tanto da membrana plasmática quanto dos núcleos sugere que as células contendo AuSHINRs@TBO irradiados passam por necrose²⁷³. De fato, a via necrótica, que envolve o inchaço celular, perda de integridade da membrana plasmática com edema de organelas e alterações nucleares (picnose) ou ausência, é um mecanismo bem documentado induzido pela hipertermia²⁷⁴.

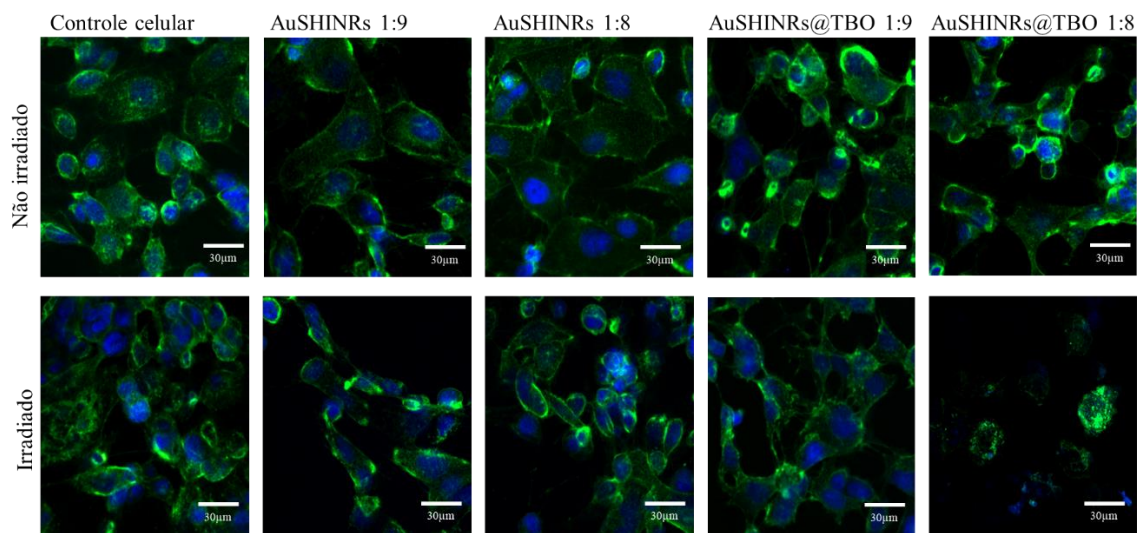


Figura 30. Microscopias confocais do controle celular de Caco-2 e da incubação de 24 horas com AuSHINRs e AuSHINRs@TBO irradiados e não irradiados em proporções de diluição de 1:9 e 1:8 v/v. Irradiação em 640 nm com uma irradiância de 20 mW/cm². O núcleo foi marcado usando DAPI (em azul), e a membrana foi corada com WGA (em verde).

3.4. Conclusões

Neste estudo, utilizamos filmes de Langmuir para construir biomembranas a partir de extrato lipídico celular de Caco-2, visando investigar os mecanismos que influenciam a eficiência fototérmica de nanobastões de ouro revestidos com sílica e conjugados com azul de toluidina-O (AuSHINRs@TBO). A expansão observada nas isothermas π -A, após a interação com as AuSHINRs@TBO, juntamente com os dados de PM-IRRAS, sugeriram uma atração eletrostática entre as nanoestruturas carregadas positivamente e os domínios negativos dos grupos lipídicos, influenciando não apenas as cabeças lipídicas polares, mas também a ordenação das cadeias alifáticas. A microscopia de ângulo de Brewster revelou que os filmes de Caco-2: AuSHINRs@TBO em proporção de 1:1 v/v induziram mudanças morfológicas notáveis, sugerindo uma reorganização induzida pelas nanoestruturas a uma pressão superficial de 30 mN/m. A irradiação luminosa reduziu a taxa de perda de material das monocamadas de Caco-2 contendo AuSHINRs@TBO (1:1 v/v), sugerindo uma estabilidade aprimorada e uma maior área ocupada pelos filmes. A ação combinada de AuSHINRs e TBO sob irradiação é esperada para aumentar a produção de ROS, especialmente oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Portanto, a expansão da monocamada está correlacionada com um aumento na distribuição espacial das moléculas, resultado da formação de hidroperóxidos devido ao ataque dos $^1\text{O}_2$ às insaturações das cadeias lipídicas. Experimentos *in vitro* identificaram a citotoxicidade inerente do surfactante CTAB presente nas nanoestruturas, exigindo diluições seriadas para aliviar esses efeitos em culturas de Caco-2. Nanopartículas conjugadas com TBO demonstraram um aumento marcante nos efeitos fototóxicos, evidente mesmo na proporção mais diluída de 1:10 v/v, o que resultou em uma redução significativa na viabilidade celular de 87,5% para 39,0%. Esse resultado destaca um efeito sinérgico onde os nanobastões conjugados com TBO amplificaram a produção de ROS, efetivamente combinando efeitos fototérmicos com reações oxidativas. A microscopia confocal revelou que as membranas celulares são o principal local de ação para induzir a morte celular, caracterizada por alterações morfológicas significativas e um aumento de características fibrosas. Em resumo, este trabalho lança luz sobre as interações complexas e os efeitos em um sistema de membrana bioinspirado, destacando o potencial dos nanobastões conjugados com TBO em avançar na terapia do câncer por meio da sinergia entre PTT e PDT.

4. Considerações Finais

Esta tese reúne os resultados obtidos a partir das atividades realizadas no período de março/20 até maio/24 referentes ao projeto de doutorado proposto à pós-graduação de Farmacologia e Biotecnologia. O projeto inicialmente previa os estudos dos mecanismos de interação e foto-oxidação de nanopartículas de ouro conjugados com TBO e funcionalizadas com peptídeos de membrana, focando em uma maior especificidade à terapia antibacteriana. No entanto, ao longo destes anos o planejamento passou por algumas alterações em virtude dos resultados obtidos e fatores externos imprevisíveis. Vale ressaltar que logo no início das atividades, enfrentamos uma pandemia que restringiu as atividades sociais, o acesso a locais públicos e impactou negativamente a saúde mental de inúmeras pessoas. Não diferente, também afetou a exequibilidade destes experimentos, resultando em um tempo mais restrito para a coleta de dados. Ainda assim, foi possível contribuir para a continuidade da atividade científica, onde pude colaborar para a escrita de quatro artigos científicos, os quais cito mais adiante.

Apesar disso, acredito que as mudanças no andamento do projeto trouxeram novas perspectivas as quais tornaram o trabalho mais relevante. Expandir sua aplicabilidade para outros focos terapêuticos, como tratamento de doenças tumorais, demonstram que os resultados aqui discutidos possuem uma ampla aplicabilidade. Ainda, durante o desenvolvimento da tese, pude publicar dois trabalhos referentes a esta pesquisa. O primeiro deles foi publicado na revista *BBA – Biomembranes* com o título de “*Photochemical outcomes triggered by gold shell-isolated nanorods on bioinspired nanoarchitectonics for bacterial membranes*”, no ano de 2023. Esse trabalho foi subsequentemente incorporado como o segundo capítulo da presente tese. Enquanto o último foi publicado na revista *Applied Materials and Interfaces* com o título de “*Enhancing Phototoxicity in Human Colorectal Tumor Cells Through Nanoarchitectonics for Synergistic Photothermal and Photodynamic Therapies*”, no ano de 2024. Este, por sua vez, foi integrado como o terceiro capítulo. Além disso, tais resultados me permitiram a possibilidade de participar e divulgar minha pesquisa em eventos científicos nacionais e internacionais. Abaixo está descrita a produção científica durante o desenvolvimento deste projeto de pesquisa:

Artigos:

Moreira, L. G.; **Almeida Jr., A. M.**; Camacho, S. A.; Estevão, B. M.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. Chain Cleavage of Bioinspired Bacterial Membranes Photoinduced by Eosin Decyl Ester. *Langmuir* **2020**, 36 (32), 9578–9585. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01600>.

Camacho, S. A.; Kobal, M. B.; **Almeida Jr., A. M.**; Toledo, K. A.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. Molecular-Level Effects on Cell Membrane Models to Explain the Phototoxicity of Gold Shell-Isolated Nanoparticles to Cancer Cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2020**, 194. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111189>.

Moreira, L. G.; **Almeida Jr., A. M.**; Nield, T.; Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B. 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* **2021**, 218. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112173>.

Pereira, L. S. A.; Camacho, S. A.; **Almeida Jr., A. M.**; Gonçalves, R. S.; Caetano, W.; DeWolf, C.; Aoki, P. H. B. Mechanisms of Hypericin Incorporation to Explain the Photooxidation Outcomes in Phospholipid Biomembrane Models. *Chem Phys Lipids* **2022**, 244. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2022.105181>.

Almeida Jr., A. M.; Moreira, L. G.; Camacho, S. A.; Ferreira, F. G.; Conceição, K.; Tada, D. B.; Aoki, P. H. B. Photochemical Outcomes Triggered by Gold Shell-Isolated Nanorods on Bioinspired Nanoarchitectonics for Bacterial Membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2023**, 1865 (8). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2023.184216>.

Almeida Jr., A. M.; Ferreira, A. S.; Camacho, S. A.; Gontijo Moreira, L.; de Toledo, K. A.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. Enhancing Phototoxicity in Human Colorectal Tumor Cells Through Nanoarchitectonics for Synergistic Photothermal and Photodynamic Therapies. *ACS Appl Mater Interfaces* **2024**. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c02247>

Eventos científicos:

Camacho, S. A.; Kobal, M. B.; **Almeida Jr, A. M.**; Oliveira Jr, O. N.; Aoki, P. H. B. Photoinduced heating effects of gold shell-isolated nanoparticles on cancer cells: from biomembrane models toward in vitro assays. (Apresentação de Trabalho/Congresso internacional XIX Brazil MRS Meeting – Brazilian Materials Research Society – Virtual 2021).

Almeida Jr, A. M.; Camacho, S. A.; Moreira, L. G.; Aoki, P. H. B. The interaction mechanisms and photoinduction effects of silica-coated gold nanorods in lipid membrane model systems. (Apresentação de Trabalho/Congresso internacional XX Brazil MRS Meeting – Brazilian Materials Research Society – Foz do Iguaçu, PR, 2022).

Almeida Jr, A. M.; Moreira, L. G.; Ferreira, A. S.; Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B. Enhancing photodynamic efficiency of gold shell-isolated nanorods (AuSHINRs) upon toluidine blue-o (TBO) conjugation. (Apresentação de Trabalho/Congresso internacional XXI Brazil MRS Meeting – Brazilian Materials Research Society – Maceió, AL, 2022).

Ferreira, A. S.; Kobal, M. B.; Moreira, L. G.; **Almeida Jr, A. M.**; Toledo, K. A.; Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B. Assessing the Photodynamic Efficiency of Rose Bengal Against Colorectal Cancer Cells. (Apresentação de Trabalho/Congresso internacional XXI Brazil MRS Meeting – Brazilian Materials Research Society – Maceió, AL, 2022).

Moreira, L. G.; **Almeida Jr, A. M.**; Aoki, P. H. B. Photoinduced modulation in the mimetic membrane of Escherichia coli via photodynamic therapy. (Apresentação de Trabalho/Instituto Nacional de Eletrônica Orgânica – Virtual, 2022).

Almeida Jr, A. M.; Moreira, L. G.; Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B. Unraveling the binding mechanisms and photochemical effects triggered by gold shell-isolated nanorods in bacterial membrane models. (Apresentação de Trabalho/Instituto Nacional de Eletrônica Orgânica - Nazaré Paulista, SP, 2023).

Almeida Jr, A. M.; Ferreira, A. S.; Camacho, S. A.; Moreira, L. G.; Toledo, K. A.; Oliveira Jr, O. N.; Aoki, P. H. B. Synergistic Phototherapeutic Strategies for Enhanced Tumor Cell Killing Utilizing Gold Nanorods Conjugated with Toluidine Blue-O. (Apresentação de Trabalho/Instituto Nacional de Eletrônica Orgânica - Nazaré Paulista, SP, 2024).

Durante o desenvolvimento do projeto, tive a oportunidade de colaborar com diversos grupos de pesquisa, enriquecendo assim o conteúdo aqui abordado com novas técnicas analíticas e diferentes pontos de vista sobre os resultados obtidos. Dentre eles cito o professor Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr. (USP/São Carlos), responsável pelo grupo de polímeros, onde os experimentos de PM-IRRAS e BAM foram realizados. Também, as professoras Dra. Dayane Batista Tada e Dra. Katia Conceição (UNIFESP/São José dos Campos), que contribuíram nos experimentos de fototoxicidade das AuSHINRs em culturas de bactérias e na introdução dos testes de geração de oxigênio singlete. Além disso, pude colaborar com a prof. Dra. Karina Alves de Toledo (UNESP/Assis), responsável pelo laboratório de imunologia celular e molecular, onde foram realizados os experimentos de cultura celular de Caco-2. Por fim, cito especialmente o grupo de pesquisa do laboratório de nanobiotecnologia (Nanotec), do qual faço parte, e os colegas de laboratório Dra. Sabrina Aléssio Camacho, André Satoshi Ferreira, Mirella Boaro Kobal e Lucas Gontijo Moreira, com os quais pude contribuir nas pesquisas executadas e na produção de artigos científicos anteriormente citados.

Quanto às perspectivas futuras, estou pleiteando uma bolsa de pós-doutorado com o objetivo de dar continuidade à minha carreira acadêmica. Desta vez, pretendo mudar um pouco o foco da pesquisa, concentrando-me nos estudos sobre sistemas miméticos de membrana, especificamente nos modelos de vesículas lamelares. O novo projeto visa sua aplicação no cultivo *in vitro* de embriões bovinos, com o intuito de aumentar a taxa de produção de blastocistos e a criotolerância. A produção *in vitro* de embriões bovinos é uma área na qual realizei minha iniciação científica, e agora pretendo unir o conhecimento adquirido na área de filmes durante o mestrado e doutorado, retornando um pouco às minhas raízes acadêmicas.

5. Referências

- (1) Mishra, R. P. N.; Oviedo-Orta, E.; Prachi, P.; Rappuoli, R.; Bagnoli, F. Vaccines and Antibiotic Resistance. *Current Opinion in Microbiology*. October 2012, pp 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.08.002>.
- (2) Almeida Junior, A. M.; Ferreira, A. S.; Camacho, S. A.; Gontijo Moreira, L.; de Toledo, K. A.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. Enhancing Phototoxicity in Human Colorectal Tumor Cells Through Nanoarchitectonics for Synergistic Photothermal and Photodynamic Therapies. *ACS Appl Mater Interfaces* **2024**. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c02247>.
- (3) Lv, Z.; He, S.; Wang, Y.; Zhu, X. Noble Metal Nanomaterials for NIR-Triggered Photothermal Therapy in Cancer. *Advanced Healthcare Materials*. John Wiley and Sons Inc March 1, 2021. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001806>.
- (4) Sharma, M.; Bakshi, A. K.; Mittapelly, N.; Gautam, S.; Marwaha, D.; Rai, N.; Singh, N.; Tiwari, P.; Agarwal, N.; Kumar, A.; Mishra, P. R. Recent Updates on Innovative Approaches to Overcome Drug Resistance for Better Outcomes in Cancer. *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V. June 1, 2022, pp 43–70. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.04.007>.
- (5) Cano, A.; Ettcheto, M.; Espina, M.; López-Machado, A.; Cajal, Y.; Rabanal, F.; Sánchez-López, E.; Camins, A.; García, M. L.; Souto, E. B. State-of-the-Art Polymeric Nanoparticles as Promising Therapeutic Tools against Human Bacterial Infections. *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central Ltd December 1, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00714-2>.
- (6) Tenover, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Infect Control* **2006**, 34 (5 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>.
- (7) Fleury, H.; Malaquin, N.; Tu, V.; Gilbert, S.; Martinez, A.; Olivier, M. A.; Sauriol, A.; Communal, L.; Leclerc-Desaulniers, K.; Carmona, E.; Provencher, D.; Mes-Masson, A. M.; Rodier, F. Exploiting Interconnected Synthetic Lethal Interactions between PARP Inhibition and Cancer Cell Reversible Senescence. *Nat Commun* **2019**, 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10460-1>.
- (8) Mansoori, B.; Mohammadi, A.; Davudian, S.; Shirjang, S.; Baradaran, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. Tabriz University of Medical Sciences 2017, pp 339–348. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041>.
- (9) Collignon, P. J.; McEwen, S. A. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. MDPI AG 2019. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>.
- (10) Sharma, V. K.; Johnson, N.; Cizmas, L.; McDonald, T. J.; Kim, H. A Review of the Influence of Treatment Strategies on Antibiotic Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes. *Chemosphere* **2016**, 150, 702–714. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.084>.

- (11) Monteiro, K. L. C.; Silva, O. N.; dos Santos Nascimento, I. J.; Mendonça Júnior, F. J. B.; Aquino, P. G. V.; da Silva-Júnior, E. F.; de Aquino, T. M. Medicinal Chemistry of Inhibitors Targeting Resistant Bacteria. *Curr Top Med Chem* **2022**, *22* (24), 1983–2028. <https://doi.org/10.2174/1568026622666220321124452>.
- (12) Fernandes, N.; Rodrigues, C. F.; Moreira, A. F.; Correia, I. J. Overview of the Application of Inorganic Nanomaterials in Cancer Photothermal Therapy. *Biomaterials Science*. Royal Society of Chemistry June 7, 2020, pp 2990–3020. <https://doi.org/10.1039/d0bm00222d>.
- (13) Huis in 't Veld, R. V.; Heuts, J.; Ma, S.; Cruz, L. J.; Ossendorp, F. A.; Jager, M. J. Current Challenges and Opportunities of Photodynamic Therapy against Cancer. *Pharmaceutics*. MDPI February 1, 2023. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020330>.
- (14) Songca, S. P.; Adjei, Y. Applications of Antimicrobial Photodynamic Therapy against Bacterial Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI March 1, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23063209>.
- (15) Mahmoudi, H.; Bahador, A.; Pourhajibagher, M.; Alikhani, M. Y. Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Bacterial Infections. *Journal of Lasers in Medical Sciences*. Laser Application in Medical Sciences Research Center 2018, pp 154–160. <https://doi.org/10.15171/jlms.2018.29>.
- (16) Hsieh, T. S.; Wu, J. Y.; Chang, C. C. Synthesis of a Photostable Near-Infrared-Absorbing Photosensitizer for Selective Photodamage to Cancer Cells. *Chemistry - A European Journal* **2014**, *20* (31), 9709–9715. <https://doi.org/10.1002/chem.201402285>.
- (17) Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy Targeted to Pathogens. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **2004**, *17* (3), 245–254.
- (18) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J Clin* **2011**, *61* (4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- (19) Redrado, M.; Benedi, A.; Marzo, I.; Gimeno, M. C.; Fernández-Moreira, V. Dual Emissive Ir(III) Complexes for Photodynamic Therapy and Bioimaging. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (9). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091382>.
- (20) Sivasakthi, P.; Samanta, P. K. Exploring Thioxanthone Derivatives as Singlet Oxygen Photosensitizers for Photodynamic Therapy at the Near-IR Region. *Journal of Physical Chemistry A* **2023**, *127* (42), 8900–8910. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.3c05780>.
- (21) Fujii, J.; Soma, Y.; Matsuda, Y. Biological Action of Singlet Molecular Oxygen from the Standpoint of Cell Signaling, Injury and Death. *Molecules*. MDPI May 1, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28104085>.
- (22) Almeida, A. M.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. Role of Toluidine Blue-O Binding Mechanism for Photooxidation in Bioinspired Bacterial Membranes. *Langmuir* **2019**, *35* (51), 16745–16751. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03045>.

- (23) Usacheva, M. N.; Teichert, M. C.; Sievert, C. E.; Biel, M. A. Effect of Ca²⁺ on the Photobactericidal Efficacy of Methylene Blue and Toluidine Blue against Gram-Negative Bacteria and the Dye Affinity for Lipopolysaccharides. *Lasers Surg Med* **2006**, *38* (10), 946–954. <https://doi.org/10.1002/lsm.20400>.
- (24) Nejati, K.; Dadashpour, M.; Gharibi, T.; Mellatyar, H.; Akbarzadeh, A. Biomedical Applications of Functionalized Gold Nanoparticles: A Review. *Journal of Cluster Science*. Springer January 1, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01955-9>.
- (25) Ali, O.; Szabó, A. Review of Eukaryote Cellular Membrane Lipid Composition, with Special Attention to the Fatty Acids. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) November 1, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms242115693>.
- (26) Costantini, P. E.; Di Giosia, M.; Ulfo, L.; Petrosino, A.; Saporetti, R.; Fimognari, C.; Pompa, P. P.; Danielli, A.; Turrini, E.; Boselli, L.; Calvaresi, M. Spiky Gold Nanoparticles for the Photothermal Eradication of Colon Cancer Cells. *Nanomaterials* **2021**, *11* (6). <https://doi.org/10.3390/nano11061608>.
- (27) Zheng, J.; Cheng, X.; Zhang, H.; Bai, X.; Ai, R.; Shao, L.; Wang, J. Gold Nanorods: The Most Versatile Plasmonic Nanoparticles. *Chem Rev* **2021**, *121* (21), 13342–13453. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00422>.
- (28) Gupta, N.; Malviya, R. Understanding and Advancement in Gold Nanoparticle Targeted Photothermal Therapy of Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V. April 1, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188532>.
- (29) Beik, J.; Khateri, M.; Khosravi, Z.; Kamrava, S. K.; Kooranifar, S.; Ghaznavi, H.; Shakeri-Zadeh, A. Gold Nanoparticles in Combinatorial Cancer Therapy Strategies. *Coordination Chemistry Reviews*. Elsevier B.V. May 15, 2019, pp 299–324. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.02.025>.
- (30) Liu, Y.; Crawford, B. M.; Vo-Dinh, T. Gold Nanoparticles-Mediated Photothermal Therapy and Immunotherapy. *Immunotherapy*. Future Medicine Ltd. September 1, 2018, pp 1175–1188. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0029>.
- (31) Cai, Z.; Zhang, Y.; He, Z.; Jiang, L. P.; Zhu, J. J. NIR-Triggered Chemo-Photothermal Therapy by Thermosensitive Gold Nanostar@Mesoporous Silica@Liposome-Composited Drug Delivery Systems. *ACS Appl Bio Mater* **2020**, *3* (8), 5322–5330. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00651>.
- (32) Sun, Q.; Shi, X.; Feng, J.; Zhang, Q.; Ao, Z.; Ji, Y.; Wu, X.; Liu, D.; Han, D. Cytotoxicity and Cellular Responses of Gold Nanorods to Smooth Muscle Cells Dependent on Surface Chemistry Coupled Action. *Small* **2018**, *14* (52). <https://doi.org/10.1002/sml.201803715>.
- (33) Hanske, C.; Sanz-Ortiz, M. N.; Liz-Marzán, L. M. Silica-Coated Plasmonic Metal Nanoparticles in Action. *Advanced Materials*. Wiley-VCH Verlag July 5, 2018. <https://doi.org/10.1002/adma.201707003>.
- (34) Kim, G. W.; Yoon, S.; Lee, J.; Lee, J. H.; Ha, J. W. High-Throughput Characterization and in Situ Control of Three-Dimensional Orientations of Single Gold Nanorods

- Coated with Spherical Mesoporous Silica Shell. *Journal of Physical Chemistry C* **2020**, *124* (26), 14279–14286. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c03652>.
- (35) Ariga, K. Don't Forget Langmuir-Blodgett Films 2020: Interfacial Nanoarchitectonics with Molecules, Materials, and Living Objects. *Langmuir*. American Chemical Society July 7, 2020, pp 7158–7180. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01044>.
- (36) Kharkwal, G. B.; Sharma, S. K.; Huang, Y. Y.; Dai, T.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers in Surgery and Medicine*. September 2011, pp 755–767. <https://doi.org/10.1002/lsm.21080>.
- (37) Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. Photodynamic Therapy (PDT) of Cancer: From Local to Systemic Treatment. *Photochemical and Photobiological Sciences*. Royal Society of Chemistry July 6, 2015, pp 1765–1780. <https://doi.org/10.1039/c5pp00132c>.
- (38) Zou, Z.; Chang, H.; Li, H.; Wang, S. Induction of Reactive Oxygen Species: An Emerging Approach for Cancer Therapy. *Apoptosis*. Springer New York LLC November 1, 2017, pp 1321–1335. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1424-9>.
- (39) Chilakamarthi, U.; Giribabu, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chemical Record* **2017**, *17* (8), 775–802. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600121>.
- (40) Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol* **2001**, *74* (5), 656–669.
- (41) Tappeiner, M. V. H. Die Photodynamische Erscheinung (Sensibilisierung Dutch Fluoreszierende Stoffe). *Ergebnisse der Physiologie* **1909**, *8*, 698–741.
- (42) Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q. Review Photodynamic Therapy. *J Natl Cancer Inst* **1998**, *90* (12), 889–905.
- (43) Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbańska, K.; Stochel, G.; Brett, C. M. A. Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers. *Chemistry - A European Journal* **2014**, *20* (18), 5346–5357. <https://doi.org/10.1002/chem.201304202>.
- (44) Abels, C. Targeting of the Vascular System of Solid Tumours by Photodynamic Therapy (PDT). *Photochemical and Photobiological Sciences* **2004**, *3* (8), 765–771. <https://doi.org/10.1039/b314241h>.
- (45) Antognazza, M. R.; Aziz, I. A.; Lodola, F. Use of Exogenous and Endogenous Photomediators as Efficient ROS Modulation Tools: Results and Perspectives for Therapeutic Purposes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2867516>.
- (46) Alvarez, M. G.; Milanesio, M.; Rivarola, V.; Durantini, E.; Batlle, A.; Fukuda, H. Endogenous and Exogenous Porphyrins as Photosensitizers in the Hep-2 Human Carcinoma Cell Line. *Cell Mol Biol* **2009**, *55* (2), 8–14. <https://doi.org/10.1170/T846>.
- (47) Detty, M. R.; Gibson, S. L.; Wagner, S. J. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. July 29, 2004, pp 3897–3915. <https://doi.org/10.1021/jm040074b>.

- (48) Mfouo-Tynga, I. S.; Dias, L. D.; Inada, N. M.; Kurachi, C. Features of Third Generation Photosensitizers Used in Anticancer Photodynamic Therapy: Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier B.V. June 1, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102091>.
- (49) Zenkevich, E.; Sagun, E.; Knyukshto, V.; Shulga, A.; Mironov, A.; Efremova, O.; Bonnett, R.; Evgenii Sagun; Songca, S. P.; Kassem, M. Photophysical and Photochemical Properties of Potential Porphyrin and Chlorin Photosensitizers for PDT. *J Photochem Photobiol B* **1996**, 33 (6), 171–180. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1011-1344\(95\)07241-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1011-1344(95)07241-1).
- (50) Pushpan, S. K.; Venkatraman, S.; Anand, V. G.; Sankar, J.; Parmeswaran, D.; Ganesan, S.; Chandrashekar, T. K. *Porphyrins in Photodynamic Therapy-A Search for Ideal Photosensitizers*; 2002; Vol. 2.
- (51) Skřivanová, K.; Škorpíková, J.; Švihálek, J.; Mornstein, V.; Janisch, R. Photochemical Properties of a Potential Photosensitiser Indocyanine Green in Vitro. *J Photochem Photobiol B* **2006**, 85 (2), 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.06.004>.
- (52) Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. Photodynamic Therapy – Mechanisms, Photosensitizers and Combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS October 1, 2018, pp 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>.
- (53) Tavakkoli Yarak, M.; Liu, B.; Tan, Y. N. Emerging Strategies in Enhancing Singlet Oxygen Generation of Nano-Photosensitizers Toward Advanced Phototherapy. *Nano-Micro Letters*. Springer Science and Business Media B.V. December 1, 2022. <https://doi.org/10.1007/s40820-022-00856-y>.
- (54) Li, M.; Xu, Y.; Peng, X.; Kim, J. S. From Low to No O₂-Dependent Hypoxia Photodynamic Therapy (HPDT): A New Perspective. *Acc Chem Res* **2022**, 55 (22), 3253–3264. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.2c00531>.
- (55) Bacellar, I. O. L.; Tsubone, T. M.; Pavani, C.; Baptista, M. S. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG August 31, 2015, pp 20523–20559. <https://doi.org/10.3390/ijms160920523>.
- (56) Itri, R.; Junqueira, H. C.; Mertins, O.; Baptista, M. S. Membrane Changes under Oxidative Stress: The Impact of Oxidized Lipids. *Biophysical Reviews*. March 2014, pp 47–61. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0128-9>.
- (57) Gai, S.; Yang, G.; Yang, P.; He, F.; Lin, J.; Jin, D.; Xing, B. Recent Advances in Functional Nanomaterials for Light-Triggered Cancer Therapy. *Nano Today*. Elsevier B.V. April 1, 2018, pp 146–187. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2018.02.010>.
- (58) Moslemi, N.; Rouzmeh, N.; Shakerinia, F.; Bahador, A.; Azar, P. S.; Kharazifard, M. J.; Paknejad, M.; Fekrazad, R. Photodynamic Inactivation of *Porphyromonas Gingivalis* Utilizing Radachlorin and Toluidine Blue O as Photosensitizers: An in Vitro Study. *J Lasers Med Sci* **2018**, 9 (2), 107–112. <https://doi.org/10.15171/jlms.2018.21>.

- (59) Mashberg, A. Reevaluation of Toluidine Blue Application as a Diagnostic Adjunct in the Detection of Asymptomatic Oral Squamous Carcinoma: A Continuing Prospective Study of Oral Cancer III. *American Cancer Society* **1980**, *46*, 758–763. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19800815\)46:4<758::aid-cncr2820460420>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19800815)46:4<758::aid-cncr2820460420>3.0.co;2-8).
- (60) Jana, A. K. Solar Cells Based on Dyes. *J Photochem Photobiol A Chem* **2000**, *132*, 1–17.
- (61) Vidal, B. de C.; Mello, M. L. S. Toluidine Blue Staining for Cell and Tissue Biology Applications. *Acta Histochem* **2019**, *121* (2), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.11.005>.
- (62) Mariño-Ocampo, N.; Reyes, J. S.; Günther, G.; Heyne, B.; Fuentealba, D. Thiol-Reacting Toluidine Blue Derivatives: Synthesis, Photophysical Properties and Covalent Conjugation with Human Serum Albumin. *Dyes and Pigments* **2022**, *201*. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110225>.
- (63) Carrera, E. T.; Dias, H. B.; Corbi, S. C. T.; Marcantonio, R. A. C.; Bernardi, A. C. A.; Bagnato, V. S.; Hamblin, M. R.; Rastelli, A. N. S. The Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) in Dentistry: A Critical Review. *Laser Physics*. Institute of Physics Publishing December 1, 2016. <https://doi.org/10.1088/1054-660X/26/12/123001>.
- (64) Ilanchelian, M.; Ramaraj, R. Binding Interactions of Toluidine Blue O with Escherichia Coli DNA: Formation of Bridged Structure. *J Fluoresc* **2011**, *21* (4), 1439–1453. <https://doi.org/10.1007/s10895-010-0829-4>.
- (65) Tremblay, J. F.; Dussault, S.; Viau, G.; Gad, F.; Boushira, M.; Bissonnette, R. Photodynamic Therapy with Toluidine Blue in Jurkat Cells: Cytotoxicity, Subcellular Localization and Apoptosis Induction. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2002**, *1* (11), 852–856. <https://doi.org/10.1039/b204385h>.
- (66) Phoenix, D. A.; Sayed, Z.; Hussain, S.; Harris, F.; Wainwright, M. The Phototoxicity of Phenothiazinium Derivatives against Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2003**, *39* (1), 17–22. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00173-1](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00173-1).
- (67) Bonneau, R.; Pottier, R.; Jousset-dubien, J. PH Dependence of Singlet Oxygen Production in Aqueous Solutions Using Thiazine Dyes as Photosensitizers. *Photochem Photobiol* **1975**, *21*, 159–163.
- (68) Topaloglu, N.; Bakay, E.; Yünlü, M.; Onak, G. Induced Photo-Cytotoxicity on Prostate Cancer Cells with the Photodynamic Action of Toluidine Blue Ortho. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2021**, *34*. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102306>.
- (69) Calzavara-Pinton, P. G.; Venturini, M.; Sala, R. A Comprehensive Overview of Photodynamic Therapy in the Treatment of Superficial Fungal Infections of the Skin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. January 14, 2005, pp 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.06.006>.
- (70) Wakayama, Y.; Takagi, M.; Yano, K. Photosensitized Inactivation of E. Coli Cells in Toluidine Blue-Light System. *Photochem Photobiol* **1980**, *32*, 601–605.

- (71) Jori, G. *Tumour Photosensitizers: Approaches to Enhance the Selectivity and Efficiency of Photodynamic Therapy*; 1996; Vol. 36.
- (72) Pham, T. C.; Nguyen, V. N.; Choi, Y.; Lee, S.; Yoon, J. Recent Strategies to Develop Innovative Photosensitizers for Enhanced Photodynamic Therapy. *Chemical Reviews*. American Chemical Society November 10, 2021, pp 13454–13619. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00381>.
- (73) Yang, L.; Zhou, J.; Wang, Z.; Li, H.; Wang, K.; Liu, H.; Wu, F. Biocompatible Conjugated Porphyrin Nanoparticles with Photodynamic/Photothermal Performances in Cancer Therapy. *Dyes and Pigments* **2020**, *182*. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108664>.
- (74) Simões, J. C. S.; Sarpaki, S.; Papadimitroulas, P.; Therrien, B.; Loudos, G. Conjugated Photosensitizers for Imaging and PDT in Cancer Research. *Journal of Medicinal Chemistry*. American Chemical Society December 10, 2020, pp 14119–14150. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00047>.
- (75) Moreira, L. G.; Almeida, A. M.; Nield, T.; Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B. 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* **2021**, *218*. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112173>.
- (76) Camacho, S. A.; Kobal, M. B.; Moreira, L. G.; Bistaffa, M. J.; Roque, T. C.; Pazin, W. M.; Toledo, K. A.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. The Efficiency of Photothermal Action of Gold Shell-Isolated Nanoparticles against Tumor Cells Depends on Membrane Interactions. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2022**, *211*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112301>.
- (77) Bistaffa, M. J.; Camacho, S. A.; Melo, C. F. O. R.; Catharino, R. R.; Toledo, K. A.; Aoki, P. H. B. Plasma Membrane Permeabilization to Explain Erythrosine B Phototoxicity on in Vitro Breast Cancer Cell Models. *J Photochem Photobiol B* **2021**, *223*. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112297>.
- (78) Camacho, S. A.; Kobal, M. B.; Almeida, A. M.; Toledo, K. A.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. Molecular-Level Effects on Cell Membrane Models to Explain the Phototoxicity of Gold Shell-Isolated Nanoparticles to Cancer Cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2020**, *194*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111189>.
- (79) Pereira, L. S. A.; Camacho, S. A.; Almeida, A. M.; Gonçalves, R. S.; Caetano, W.; DeWolf, C.; Aoki, P. H. B. Mechanisms of Hypericin Incorporation to Explain the Photooxidation Outcomes in Phospholipid Biomembrane Models. *Chem Phys Lipids* **2022**, *244*. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2022.105181>.
- (80) Moreira, L. G.; Almeida, A. M.; Camacho, S. A.; Estevão, B. M.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. Chain Cleavage of Bioinspired Bacterial Membranes Photoinduced by Eosin Decyl Ester. *Langmuir* **2020**, *36* (32), 9578–9585. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01600>.

- (81) Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) Using Gold Nanoparticles. *Lasers Med Sci* **2008**, *23* (3), 217–228. <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0470-x>.
- (82) Elming, P. B.; Sørensen, B. S.; Oei, A. L.; Franken, N. A. P.; Crezee, J.; Overgaard, J.; Horsman, M. R. Hyperthermia: The Optimal Treatment to Overcome Radiation Resistant Hypoxia. *Cancers*. MDPI AG January 1, 2019. <https://doi.org/10.3390/cancers11010060>.
- (83) Gunver S. Kienle. Fever in Cancer Treatment: Coley's Therapy and Epidemiologic Observations. *Glob Adv Health Med* **2012**, *1* (1), 92–100.
- (84) Livraghi, T.; Lazzaroni, S.; Meloni, F. *Clinical Science: Review Radiofrequency Thermal Ablation of Hepatocellular Carcinoma*; 2001; Vol. 13. www.elsevier.com/locate/ejulttrasou.
- (85) Gordon, R. T.; Gordon, D. Intracellular Hyperthermia. A Biophysical Approach to Cancer Treatment via Intracellular Temperature and Biophysical Alterations. *Med Hypotheses* **1979**, *5*, 83–102.
- (86) Juzeniene, A.; Nielsen, K. P.; Moan, J. *Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy*; 2006; Vol. 25.
- (87) Wang, X.; Zhang, J.; Wang, Y.; Wang, C.; Xiao, J.; Zhang, Q.; Cheng, Y. Multi-Responsive Photothermal-Chemotherapy with Drug-Loaded Melanin-like Nanoparticles for Synergetic Tumor Ablation. *Biomaterials* **2016**, *81*, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.037>.
- (88) Zhang, J.; Yang, C.; Zhang, R.; Chen, R.; Zhang, Z.; Zhang, W.; Peng, S. H.; Chen, X.; Liu, G.; Hsu, C. S.; Lee, C. S. Biocompatible D–A Semiconducting Polymer Nanoparticle with Light-Harvesting Unit for Highly Effective Photoacoustic Imaging Guided Photothermal Therapy. *Adv Funct Mater* **2017**, *27* (13). <https://doi.org/10.1002/adfm.201605094>.
- (89) Chen, Q.; Xu, L.; Liang, C.; Wang, C.; Peng, R.; Liu, Z. Photothermal Therapy with Immune-Adjuvant Nanoparticles Together with Checkpoint Blockade for Effective Cancer Immunotherapy. *Nat Commun* **2016**, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13193>.
- (90) Ali, A. A.; Abuwatfa, W. H.; Al-Sayah, M. H.; Hussein, G. A. Gold-Nanoparticle Hybrid Nanostructures for Multimodal Cancer Therapy. *Nanomaterials* **2022**, *12* (20). <https://doi.org/10.3390/nano12203706>.
- (91) Wang, J.; Zhu, C.; Han, J.; Han, N.; Xi, J.; Fan, L.; Guo, R. Controllable Synthesis of Gold Nanorod/Conducting Polymer Core/Shell Hybrids Toward in Vitro and in Vivo near-Infrared Photothermal Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* **2018**, *10* (15), 12323–12330. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b16784>.
- (92) Wang, J.; Han, J.; Zhu, C.; Han, N.; Xi, J.; Fan, L.; Guo, R. Gold Nanorods/Polypyrrole/m-SiO₂ Core/Shell Hybrids as Drug Nanocarriers for Efficient Chemo-Photothermal Therapy. *Langmuir* **2018**, *34* (48), 14661–14669. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02667>.

- (93) Welch, A. J. The Thermal Response of Laser Irradiated Tissue. *Journal of Quantum Electronics* **1984**, 12, 1471–1781.
- (94) He, X.; Bischof, J. C. Quantification of Temperature and Injury Response in Thermal Therapy and Cryosurgery. *Crit Rev Biomed Eng* **2003**, 31 (5), 355–421.
- (95) Svaasand, L. O.; Gomer, C. J.; Morinelli, E. On the Physical Rationale of Laser Induced Hyperthermia. *Laser in Medical Science* **1990**, 5, 121–128.
- (96) Xia, B.; Wang, B.; Shi, J.; Zhang, Y.; Zhang, Q.; Chen, Z.; Li, J. Photothermal and Biodegradable Polyaniline/Porous Silicon Hybrid Nanocomposites as Drug Carriers for Combined Chemo-Photothermal Therapy of Cancer. *Acta Biomater* **2017**, 51, 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.015>.
- (97) Ahmed, K.; Zaidi, S. F.; Mati-ur-Rehman; Rehman, R.; Kondo, T. Hyperthermia and Protein Homeostasis: Cytoprotection and Cell Death. *Journal of Thermal Biology*. Elsevier Ltd July 1, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102615>.
- (98) Hildebrandt, B.; Wust, P.; Ahlers, O.; Dieing, A.; Sreenivasa, G.; Kerner, T.; Felix, R.; Riess, H. *The Cellular and Molecular Basis of Hyperthermia*; 2002; Vol. 43. www.elsevier.com/locate/critrevonc.
- (99) Lepock, J. R. Cellular Effects of Hyperthermia: Relevance to the Minimum Dose for Thermal Damage. *International Journal of Hyperthermia* **2003**, 19 (3), 252–266. <https://doi.org/10.1080/0265673031000065042>.
- (100) Weissleder, R. *A Clearer Vision for in Vivo Imaging*; 2001; Vol. 19.
- (101) Yang, X.; Yang, M.; Pang, B.; Vara, M.; Xia, Y. Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chemical Reviews*. American Chemical Society October 14, 2015, pp 10410–10488. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00193>.
- (102) Link, S.; El-Sayed, M. A. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103 (40), 8410–8426. <https://doi.org/10.1021/jp9917648>.
- (103) Link, S.; El-Sayed, M. A. Optical Properties and Ultrafast Dynamics of Metallic Nanocrystals. *Annual Review of Physical Chemistry*. Annual Reviews Inc. 2003, pp 331–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.54.011002.103759>.
- (104) Petryayeva, E.; Krull, U. J. Localized Surface Plasmon Resonance: Nanostructures, Bioassays and Biosensing-A Review. *Analytica Chimica Acta*. November 7, 2011, pp 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.020>.
- (105) Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) Using Gold Nanoparticles. *Lasers in Medical Science*. July 2008, pp 217–228. <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0470-x>.
- (106) Norouzi, H.; Khoshgard, K.; Akbarzadeh, F. In Vitro Outlook of Gold Nanoparticles in Photo-Thermal Therapy: A Literature Review. *Lasers in Medical Science*. Springer London May 1, 2018, pp 917–926. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2467-z>.

- (107) Cai, W.; Gao, T.; Hong, H.; Sun, J. *Applications of Gold Nanoparticles in Cancer Nanotechnology*; 2008. <http://www.cdc.gov>.
- (108) Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (10), 1957–1962. <https://doi.org/10.1021/cm020732l>.
- (109) De Abajo, F. J. G. Nonlocal Effects in the Plasmons of Strongly Interacting Nanoparticles, Dimers, and Waveguides. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112* (46), 17983–17987. <https://doi.org/10.1021/jp807345h>.
- (110) Jaworski, M. (Editor); Marciniak, M.; IEEE Photonics Society; Institute of Electrical and Electronics Engineers. *17th International Conference on Transparent Optical Networks (ICTON 2015) and 7th Sub-Wavelength Photonics Conference (SWP 2015), and 13th Colloquium on Microwave Communications (MICROCOLL 2015) : Budapest, Hungary, July 5-9, 2015*.
- (111) Gu, X.; Timchenko, V.; Yeoh, G. H.; Dombrovsky, L.; Taylor, R. The Effect of Gold Nanorods Clustering on Near-Infrared Radiation Absorption. *Applied Sciences (Switzerland)* **2018**, *8* (7). <https://doi.org/10.3390/app8071132>.
- (112) Sabahat, S.; Ejaz, M.; Saira, F.; Saleem, R. S. Z.; Nazish, Y.; Khalil, L.; Naeem, A. Surface Plasmon Resonance-Based Synthesis of Gold Nanorods for Sensing Applications. *Chemical Papers* **2023**, *77* (10), 5901–5911. <https://doi.org/10.1007/s11696-023-02909-x>.
- (113) Pellas, V.; Hu, D.; Mazouzi, Y.; Mimoun, Y.; Blanchard, J.; Guibert, C.; Salmain, M.; Boujday, S. Gold Nanorods for LSPR Biosensing: Synthesis, Coating by Silica, and Bioanalytical Applications. *Biosensors*. MDPI October 1, 2020. <https://doi.org/10.3390/BIOS10100146>.
- (114) Hu, X.; Gao, X. Multilayer Coating of Gold Nanorods for Combined Stability and Biocompatibility. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13* (21), 10028–10035. <https://doi.org/10.1039/c0cp02434a>.
- (115) Barreto, Â.; Luis, L. G.; Girão, A. V.; Trindade, T.; Soares, A. M. V. M.; Oliveira, M. Behavior of Colloidal Gold Nanoparticles in Different Ionic Strength Media. *Journal of Nanoparticle Research* **2015**, *17* (12), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3302-0>.
- (116) Gupta, A.; Moyano, D. F.; Parnsubsakul, A.; Papadopoulos, A.; Wang, L. S.; Landis, R. F.; Das, R.; Rotello, V. M. Ultrastable and Biofunctionalizable Gold Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, *8* (22), 14096–14101. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b02548>.
- (117) Liu, X.; Huang, N.; Li, H.; Wang, H.; Jin, Q.; Ji, J. Multidentate Polyethylene Glycol Modified Gold Nanorods for in Vivo Near-Infrared Photothermal Cancer Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* **2014**, *6* (8), 5657–5668. <https://doi.org/10.1021/am5001823>.
- (118) Liu, J.; Kan, C.; Cong, B.; Xu, H.; Ni, Y.; Li, Y.; Shi, D. Plasmonic Property and Stability of Core-Shell Au@SiO₂ Nanostructures. *Plasmonics* **2014**, *9* (5), 1007–1014. <https://doi.org/10.1007/s11468-014-9708-1>.

- (119) van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, 9 (2), 112–124.
- (120) Simons, K.; Sampaio, J. L. Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2011, pp 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004697>.
- (121) Lingwood, D.; Simons, K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science (1979)* **2010**, 327 (5961), 46–50.
- (122) Rohde, M. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol Spectr* **2019**, 7 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0044-2018>.
- (123) Silhavy, T. J.; Kahne, D.; Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.
- (124) Gram, H. C. Ueber Die Farbung Der Scizomyceten in Schitt-Und Trockenpreparaten. *Fortschritte der Med* **1884**, 2 (1), 185–186.
- (125) Nikaido, H.; Vaara, M. *Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability*; 1985. <https://journals.asm.org/journal/mr>.
- (126) Pasquina-Lemonche, L.; Burns, J.; Turner, R. D.; Kumar, S.; Tank, R.; Mullin, N.; Wilson, J. S.; Chakrabarti, B.; Bullough, P. A.; Foster, S. J.; Hobbs, J. K. The Architecture of the Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Nature* **2020**, 582 (7811), 294–297. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2236-6>.
- (127) Raetz, C. R. H.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*. 2002, pp 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>.
- (128) Benz, R. STRUCTURE AND FUNCTION OF PORINS FROM GRAM-NEGATIVE BACTERIA. *Annual Reviews Microbiology* **1988**, 42, 359–393.
- (129) Malanovic, N.; Lohner, K. Gram-Positive Bacterial Cell Envelopes: The Impact on the Activity of Antimicrobial Peptides. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2016**, 1858 (5), 936–946. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.004>.
- (130) Alberts, B. ; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *The Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.; Garland Science: New York, 2002.
- (131) Van Meer, G.; De Kroon, A. I. P. M. Lipid Map of the Mammalian Cell. *Journal of Cell Science*. January 1, 2011, pp 5–8. <https://doi.org/10.1242/jcs.071233>.
- (132) Regen, S. L. The Origin of Lipid Rafts. *Biochemistry*. American Chemical Society December 15, 2020, pp 4617–4621. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00851>.
- (133) Rajendran, L.; Simons, K. Lipid Rafts and Membrane Dynamics. *J Cell Sci* **2005**, 118 (6), 1099–1102. <https://doi.org/10.1242/jcs.01681>.
- (134) Connor, J.; Bucana, C.; Fidler, I. J.; Schroit, A. J. *Differentiation-Dependent Expression of Phosphatidylserine in Mammalian Plasma Membranes: Quantitative Assessment of Outer-Leaflet Lipid by Prothrombinase Complex Formation (Asymmetry/Recognition/Macrophage)*; 1989; Vol. 86.

- (135) Szlasa, W.; Zendran, I.; Zalesińska, A.; Tarek, M.; Kulbacka, J. Lipid Composition of the Cancer Cell Membrane. *J Bioenerg Biomembr* **2020**, *52*, 321–342. <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09846-4/Published>.
- (136) Menendez, J. A.; Lupu, R. Fatty Acid Synthase and the Lipogenic Phenotype in Cancer Pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*. October 2007, pp 763–777. <https://doi.org/10.1038/nrc2222>.
- (137) Brockman, H. Lipid Monolayers: Why Use Half a Membrane to Characterize Protein-Membrane Interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 438–443.
- (138) Oliveira, O. N.; Caseli, L.; Ariga, K. The Past and the Future of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films. *Chemical Reviews*. American Chemical Society March 23, 2022, pp 6459–6513. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00754>.
- (139) Irving Langmuir, B. THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. II. LIQUIDS.1. *American Chemical Society* **1917**, *39*, 1848–1906.
- (140) Biolin Scientific. Software Manual Langmuir and Langmuir-Blodgett Devices All Models Table of Contents. https://www.ccmr.cornell.edu/wp-content/uploads/sites/2/2015/11/KSV-NIMA-LB-Software-Manual_v1.4.pdf.
- (141) Rapp, B. E. Measuring Surface Tension and Free Surface Energy. In *Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics*; Elsevier, 2017; pp 453–465. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-3141-1.50022-8>.
- (142) Borrell, J. H.; Domènech, Ò.; Keough, K. M. W. Physicochemical Properties of Lipids and Macromolecules in Higher Level Organization. In *In Membrane Protein - Lipid Interactions: Physics and Chemistry in the Bilayer*; 2016; pp 31–61.
- (143) Ma, G.; Allen, H. C. DPPC Langmuir Monolayer at the Air-Water Interface: Probing the Tail and Head Groups by Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Langmuir* **2006**, *22* (12), 5341–5349. <https://doi.org/10.1021/la0535227>.
- (144) Lee, K. Y. C. Collapse Mechanisms of Langmuir Monolayers. *Annu Rev Phys Chem* **2008**, *59*, 771–791. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104619>.
- (145) Langmuir, I.; Schaefer, V. J. *Activities of Urease and Pepsin Monolayers*; 1938.
- (146) Kurniawan, J.; Ventrici De Souza, J. F.; Dang, A. T.; Liu, G. Y.; Kuhl, T. L. Preparation and Characterization of Solid-Supported Lipid Bilayers Formed by Langmuir-Blodgett Deposition: A Tutorial. *Langmuir* **2018**, *34* (51), 15622–15639. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03504>.
- (147) Wamke, A.; Dopierała, K.; Prochaska, K.; Maciejewski, H.; Biadasz, A.; Dudkowiak, A. Characterization of Langmuir Monolayer, Langmuir-Blodgett and Langmuir-Schaefer Films Formed by POSS Compounds. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2015**, *464*, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.10.022>.
- (148) Dynarowicz-Łątka, P.; Dhanabalan, A.; Oliveira, O. N. Modern Physicochemical Research on Langmuir Monolayers. *Adv Colloid Interface Sci* **2001**, *91*, 221–293.

- (149) Gaffney, J. S.; Marley, N. A.; Jones, D. E. *FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) SPECTROSCOPY*; 2012.
- (150) Chan, S. I.; Bocian, D. F.; Petersen, N. O. Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Phospholipid Membrane. In *Membrane Spectroscopy*; Grell, E., Ed.; Molecular Biology Biochemistry and Biophysics; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1981; Vol. 31. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-81537-9>.
- (151) Krimm', S.; Bandekart, J. VIBRATIONAL SPECTROSCOPY AND CONFORMATION OF PEPTIDES, POLYPEPTIDES, AND PROTEINS. *Adv Protein Chem* **1986**, 181–364.
- (152) De Alwis, C.; Leftwich, T. R.; Perrine, K. A. New Approach to Simultaneous in Situ Measurements of the Air/Liquid/Solid Interface Using PM-IRRAS. *Langmuir* **2020**, 36 (13), 3404–3414. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03958>.
- (153) Corn, R. M. *Polarization-Modulation FTIR Spectroscopy of Self-Assembled Monolayers and Multilayers at Metal Surfaces*; 1994; Vol. 2089. <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/>.
- (154) Vázquez, R. F.; Daza Millone, M. A.; Pavinatto, F. J.; Fanani, M. L.; Oliveira, O. N.; Vela, M. E.; Maté, S. M. Impact of Sphingomyelin Acyl Chain (16:0 vs 24:1) on the Interfacial Properties of Langmuir Monolayers: A PM-IRRAS Study. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2019**, 173, 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.018>.
- (155) Roldán-Carmona, C.; Giner-Casares, J. J.; Pérez-Morales, M.; Martín-Romero, M. T.; Camacho, L. Revisiting the Brewster Angle Microscopy: The Relevance of the Polar Headgroup. *Advances in Colloid and Interface Science*. May 15, 2012, pp 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.02.002>.
- (156) Kaercher, T.; H6nig, D.; Mobius, D. *Section: New Developments, Products and Techniques Brewster Angle Microscopy A New Method of Visualizing the Spreading of Meibomian Lipids*; Kluwer Academic Publishers, 1993; Vol. 17.
- (157) Honig, D.; Mobius, D. *Reflectometry at the Brewster Angle and Brewster Angle Microscopy at the Air-Water Interface*; 1992; Vol. 210.
- (158) Zheng, J.; Cheng, X.; Zhang, H.; Bai, X.; Ai, R.; Shao, L.; Wang, J. Gold Nanorods: The Most Versatile Plasmonic Nanoparticles. *Chemical Reviews*. American Chemical Society November 10, 2021, pp 13342–13453. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00422>.
- (159) Rai, M.; Ingle, A. P.; Birla, S.; Yadav, A.; Santos, C. A. Dos. Strategic Role of Selected Noble Metal Nanoparticles in Medicine. *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor and Francis Ltd September 2, 2016, pp 696–719. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1018131>.
- (160) Arvizo, R. R.; Bhattacharyya, S.; Kudgus, R. A.; Giri, K.; Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. Intrinsic Therapeutic Applications of Noble Metal Nanoparticles: Past, Present and Future. *Chem Soc Rev* **2012**, 41 (7), 2943–2970. <https://doi.org/10.1039/c2cs15355f>.

- (161) Ferreira de Macedo, E.; Ducatti Formaggio, D. M.; Salles Santos, N.; Batista Tada, D. Gold Nanoparticles Used as Protein Scavengers Enhance Surface Plasmon Resonance Signal. *Sensors (Basel)* **2017**, *17* (12). <https://doi.org/10.3390/s17122765>.
- (162) Daniel, M.-C.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346. <https://doi.org/10.1021/cr030698>.
- (163) Formaggio, D. M. D.; de Oliveira Neto, X. A.; Rodrigues, L. D. A.; de Andrade, V. M.; Nunes, B. C.; Lopes-Ferreira, M.; Ferreira, F. G.; Wachesk, C. C.; Camargo, E. R.; Conceição, K.; Tada, D. B. In Vivo Toxicity and Antimicrobial Activity of AuPt Bimetallic Nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* **2019**, *21* (11). <https://doi.org/10.1007/s11051-019-4683-2>.
- (164) Arvizo, R. R.; Bhattacharyya, S.; Kudgus, R. A.; Giri, K.; Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. Intrinsic Therapeutic Applications of Noble Metal Nanoparticles: Past, Present and Future. *Chem Soc Rev* **2012**, *41* (7), 2943–2970. <https://doi.org/10.1039/c2cs15355f>.
- (165) De Abajo, F. J. G. Nonlocal Effects in the Plasmons of Strongly Interacting Nanoparticles, Dimers, and Waveguides. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112* (46), 17983–17987. <https://doi.org/10.1021/jp807345h>.
- (166) Mieszawska, A. J.; Mulder, W. J. M.; Fayad, Z. A.; Cormode, D. P. Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease. *Molecular Pharmaceutics*. American Chemical Society March 4, 2013, pp 831–847. <https://doi.org/10.1021/mp3005885>.
- (167) Amina, S. J.; Guo, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd 2020, pp 9823–9857. <https://doi.org/10.2147/IJN.S279094>.
- (168) Lee, J. H.; Cho, H. Y.; Choi, H. K.; Lee, J. Y.; Choi, J. W. Application of Gold Nanoparticle to Plasmonic Biosensors. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG July 11, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19072021>.
- (169) Nascimento, L. S.; MacEdo, E. F.; Magalhães, J. A.; Dona', L. R. M.; Tada, D. B. Application of Gold and Platinum Bimetallic Nanoparticle to Enhance Surface Plasmon Resonance Signal. *MRS Adv* **2020**. <https://doi.org/10.1557/adv.2020.288>.
- (170) Liu, Y.; Crawford, B. M.; Vo-Dinh, T. Gold Nanoparticles-Mediated Photothermal Therapy and Immunotherapy. *Immunotherapy*. Future Medicine Ltd. September 1, 2018, pp 1175–1188. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0029>.
- (171) Magalhães, J. A.; Fernandes, A. U.; Junqueira, H. C.; Nunes, B. C.; Cursino, T. A. F.; Formaggio, D. M. D.; Da S Baptista, M.; Tada, D. B. Bimetallic Nanoparticles Enhance Photoactivity of Conjugated Photosensitizer. *Nanotechnology* **2020**, *31* (9). <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab55c0>.
- (172) Costantini, P. E.; Di Giosia, M.; Ulfo, L.; Petrosino, A.; Saporetti, R.; Fimognari, C.; Pompa, P. P.; Danielli, A.; Turrini, E.; Boselli, L.; Calvaresi, M. Spiky Gold

- Nanoparticles for the Photothermal Eradication of Colon Cancer Cells. *Nanomaterials* **2021**, *11* (6). <https://doi.org/10.3390/nano11061608>.
- (173) Wang, J.; Zhu, C.; Han, J.; Han, N.; Xi, J.; Fan, L.; Guo, R. Controllable Synthesis of Gold Nanorod/Conducting Polymer Core/Shell Hybrids Toward in Vitro and in Vivo near-Infrared Photothermal Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* **2018**, *10* (15), 12323–12330. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b16784>.
- (174) Nejati, K.; Dadashpour, M.; Gharibi, T.; Mellatyar, H.; Akbarzadeh, A. Biomedical Applications of Functionalized Gold Nanoparticles: A Review. *Journal of Cluster Science*. Springer January 1, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01955-9>.
- (175) Kim, H. S.; Lee, D. Y. Photothermal Therapy with Gold Nanoparticles as an Anticancer Medication. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. Springer Netherlands January 1, 2017, pp 19–26. <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0292-6>.
- (176) Cai, Z.; Zhang, Y.; He, Z.; Jiang, L. P.; Zhu, J. J. NIR-Triggered Chemo-Photothermal Therapy by Thermosensitive Gold Nanostar@Mesoporous Silica@Liposome-Composited Drug Delivery Systems. *ACS Appl Bio Mater* **2020**, *3* (8), 5322–5330. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00651>.
- (177) Pérez-Juste, J.; Correa-Duarte, M. A.; Liz-Marzán, L. M. Silica Gels with Tailored, Gold Nanorod-Driven Optical Functionalities. In *Applied Surface Science*; Elsevier, 2004; Vol. 226, pp 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2003.11.013>.
- (178) Mahmoud, N. N.; Alhusban, A. A.; Ali, J. I.; Al-Bakri, A. G.; Hamed, R.; Khalil, E. A. Preferential Accumulation of Phospholipid-PEG and Cholesterol-PEG Decorated Gold Nanorods into Human Skin Layers and Their Photothermal-Based Antibacterial Activity. *Sci Rep* **2019**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42047-7>.
- (179) Sordillo, L. A.; Pratavieira, S.; Pu, Y.; Salas-Ramirez, K.; Shi, L.; Zhang, L.; Budansky, Y.; Alfano, R. R. Third Therapeutic Spectral Window for Deep Tissue Imaging. In *Optical Biopsy XII*; SPIE, 2014; Vol. 8940, p 89400V. <https://doi.org/10.1117/12.2040604>.
- (180) Rabiee, N.; Ahmadi, S.; Akhavan, O.; Luque, R. Silver and Gold Nanoparticles for Antimicrobial Purposes against Multi-Drug Resistance Bacteria. *Materials*. MDPI March 1, 2022. <https://doi.org/10.3390/ma15051799>.
- (181) Basak, S.; Singh, P.; Rajurkar, M. Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. *J Pathog* **2016**, *2016*, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2016/4065603>.
- (182) Mahmoud, N. N.; Alkilany, A. M.; Khalil, E. A.; Al-Bakri, A. G. Nano-Photothermal Ablation Effect of Hydrophilic and Hydrophobic Functionalized Gold Nanorods on Staphylococcus Aureus and Propionibacterium Acnes. *Sci Rep* **2018**, *8* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24837-7>.
- (183) Koulenti, D.; Song, A.; Ellingboe, A.; Abdul-Aziz, M. H.; Harris, P.; Gavey, E.; Lipman, J. Infections by Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: What's New in Our Arsenal and What's in the Pipeline? *International Journal of Antimicrobial*

- Agents*. Elsevier B.V. March 1, 2019, pp 211–224.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.10.011>.
- (184) Cepas, V.; López, Y.; Muñoz, E.; Rolo, D.; Ardanuy, C.; Martí, S.; Xercavins, M.; Horcajada, J. P.; Bosch, J.; Soto, S. M. Relationship between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microbial Drug Resistance* **2019**, 25 (1), 72–79. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>.
- (185) Abadeer, N. S.; Murphy, C. J. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*. American Chemical Society March 10, 2016, pp 4691–4716. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11232>.
- (186) Rolain, J. M.; Abat, C.; Jimeno, M. T.; Fournier, P. E.; Raoult, D. Do We Need New Antibiotics? *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V. May 1, 2016, pp 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.012>.
- (187) Vivas, R.; Barbosa, A. A. T.; Dolabela, S. S.; Jain, S. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. *Microbial Drug Resistance* **2019**, 25 (6), 890–908. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0319>.
- (188) Borzenkov, M.; Pallavicini, P.; Taglietti, A.; D'Alfonso, L.; Collini, M.; Chirico, G. Photothermally Active Nanoparticles as a Promising Tool for Eliminating Bacteria and Biofilms. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2020**, 11, 1134–1146.
<https://doi.org/10.3762/BJNANO.11.98>.
- (189) Teng, C. P.; Zhou, T.; Ye, E.; Liu, S.; Koh, L. D.; Low, M.; Loh, X. J.; Win, K. Y.; Zhang, L.; Han, M. Y. Effective Targeted Photothermal Ablation of Multidrug Resistant Bacteria and Their Biofilms with NIR-Absorbing Gold Nanocrosses. *Adv Healthc Mater* **2016**, 5 (16), 2122–2130. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600346>.
- (190) Lepock, J. R. Cellular Effects of Hyperthermia: Relevance to the Minimum Dose for Thermal Damage. In *International Journal of Hyperthermia*; 2003; Vol. 19, pp 252–266. <https://doi.org/10.1080/0265673031000065042>.
- (191) Elming, P. B.; Sørensen, B. S.; Oei, A. L.; Franken, N. A. P.; Crezee, J.; Overgaard, J.; Horsman, M. R. Hyperthermia: The Optimal Treatment to Overcome Radiation Resistant Hypoxia. *Cancers*. MDPI AG January 1, 2019.
<https://doi.org/10.3390/cancers11010060>.
- (192) Kuo, W. S.; Chang, C. N.; Chang, Y. T.; Yeh, C. S. Antimicrobial Gold Nanorods with Dual-Modality Photodynamic Inactivation and Hyperthermia. *Chemical Communications* **2009**, No. 32, 4853–4855. <https://doi.org/10.1039/b907274h>.
- (193) Jo, W.; Kim, M. J. Influence of the Photothermal Effect of a Gold Nanorod Cluster on Biofilm Disinfection. *Nanotechnology* **2013**, 24 (19).
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/19/195104>.
- (194) Barreto, Â.; Luis, L. G.; Girão, A. V.; Trindade, T.; Soares, A. M. V. M.; Oliveira, M. Behavior of Colloidal Gold Nanoparticles in Different Ionic Strength Media. *Journal of Nanoparticle Research* **2015**, 17 (12), 1–13.
<https://doi.org/10.1007/s11051-015-3302-0>.

- (195) Hu, X.; Gao, X. Multilayer Coating of Gold Nanorods for Combined Stability and Biocompatibility. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13* (21), 10028–10035. <https://doi.org/10.1039/c0cp02434a>.
- (196) Liu, J.; Kan, C.; Cong, B.; Xu, H.; Ni, Y.; Li, Y.; Shi, D. Plasmonic Property and Stability of Core-Shell Au@SiO₂ Nanostructures. *Plasmonics* **2014**, *9* (5), 1007–1014. <https://doi.org/10.1007/s11468-014-9708-1>.
- (197) Hanske, C.; Sanz-Ortiz, M. N.; Liz-Marzán, L. M. Silica-Coated Plasmonic Metal Nanoparticles in Action. *Advanced Materials*. Wiley-VCH Verlag July 5, 2018. <https://doi.org/10.1002/adma.201707003>.
- (198) Kim, G. W.; Yoon, S.; Lee, J.; Lee, J. H.; Ha, J. W. High-Throughput Characterization and in Situ Control of Three-Dimensional Orientations of Single Gold Nanorods Coated with Spherical Mesoporous Silica Shell. *Journal of Physical Chemistry C* **2020**, *124* (26), 14279–14286. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c03652>.
- (199) Blodgett, K. B. MONOMOLECULAR FILMS OF FATTY ACIDS ON. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56* (2), 495. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ja01317a513>.
- (200) Langmuir, I. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. II Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, *39* (9), 1848–1906. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ja02254a006>.
- (201) Oliveira, O. N.; Caseli, L.; Ariga, K. The Past and the Future of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films. *Chemical Reviews*. American Chemical Society March 23, 2022, pp 6459–6513. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00754>.
- (202) Moreira, L. G.; Almeida, A. M.; Nield, T.; Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B. 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* **2021**, *218*. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112173>.
- (203) Osborn, M. J.; Gander, J. E.; Parisi, E.; Carson, J. Mechanism of Assembly of the Outer Membrane of Salmonella Typhimurium. *Journal of Biological Chemistry* **1972**, *247* (12), 3962–3972. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)45127-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)45127-2).
- (204) Mishra, N. N.; Yang, S. J.; Sawa, A.; Rubio, A.; Nast, C. C.; Yeaman, M. R.; Bayer, A. S. Analysis of Cell Membrane Characteristics of in Vitro-Selected Daptomycin-Resistant Strains of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53* (6), 2312–2318. <https://doi.org/10.1128/AAC.01682-08>.
- (205) Liu, W.; Wang, Z.; Fu, L.; Leblanc, R. M.; Yan, E. C. Y. Lipid Compositions Modulate Fluidity and Stability of Bilayers: Characterization by Surface Pressure and Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Langmuir* **2013**, *29* (48), 15022–15031. <https://doi.org/10.1021/la4036453>.
- (206) Aroca, R. F.; Teo, G. Y.; Mohan, H.; Guerrero, A. R.; Albella, P.; Moreno, F. Plasmon-Enhanced Fluorescence and Spectral Modification in SHINEF. *Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (42), 20419–20424. <https://doi.org/10.1021/jp205997u>.

- (207) Baffou, G.; Quidant, R. Thermo-Plasmonics: Using Metallic Nanostructures as Nano-Sources of Heat. *Laser and Photonics Reviews*. March 2013, pp 171–187. <https://doi.org/10.1002/lpor.201200003>.
- (208) Richardson, H. H.; Carlson, M. T.; Tandler, P. J.; Hernandez, P.; Govorov, A. O. Experimental and Theoretical Studies of Light-to-Heat Conversion and Collective Heating Effects in Metal Nanoparticle Solutions. *Nano Lett* **2009**, 9 (3), 1139–1146. <https://doi.org/10.1021/nl8036905>.
- (209) Tada, D. B.; Baptista, M. S. Photosensitizing Nanoparticles and the Modulation of ROS Generation. *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S. A 2015. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00033>.
- (210) Herigstad, B.; Hamilton, M.; Heersink, J. How to Optimize the Drop Plate Method for Enumerating Bacteria. *J Microbiol Methods* **2001**, 44, 121–129. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00241-4).
- (211) Huang, X.; El-Sayed, M. A. Gold Nanoparticles: Optical Properties and Implementations in Cancer Diagnosis and Photothermal Therapy. *Journal of Advanced Research*. January 2010, pp 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>.
- (212) Sun, Q.; Shi, X.; Feng, J.; Zhang, Q.; Ao, Z.; Ji, Y.; Wu, X.; Liu, D.; Han, D. Cytotoxicity and Cellular Responses of Gold Nanorods to Smooth Muscle Cells Dependent on Surface Chemistry Coupled Action. *Small* **2018**, 14 (52). <https://doi.org/10.1002/sml.201803715>.
- (213) An, J.; Yang, X. Q.; Cheng, K.; Song, X. L.; Zhang, L.; Li, C.; Zhang, X. S.; Xuan, Y.; Song, Y. Y.; Fang, B. Y.; Hou, X. L.; Zhao, Y. Di; Liu, B. In Vivo Computed Tomography/Photoacoustic Imaging and NIR-Triggered Chemo-Photothermal Combined Therapy Based on a Gold Nanostar-, Mesoporous Silica-, and Thermosensitive Liposome-Composited Nanoprobe. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, 9 (48), 41748–41759. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b15296>.
- (214) Zhang, Z.; Wang, L.; Wang, J.; Jiang, X.; Li, X.; Hu, Z.; Ji, Y.; Wu, X.; Chen, C. Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods as a Light-Mediated Multifunctional Theranostic Platform for Cancer Treatment. *Advanced Materials* **2012**, 24 (11), 1418–1423. <https://doi.org/10.1002/adma.201104714>.
- (215) Monem, A. S.; Elbially, N.; Mohamed, N. Mesoporous Silica Coated Gold Nanorods Loaded Doxorubicin for Combined Chemo-Photothermal Therapy. *Int J Pharm* **2014**, 470 (1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.04.067>.
- (216) Gao, Z.; Burrows, N. D.; Valley, N. A.; Schatz, G. C.; Murphy, C. J.; Haynes, C. L. In Solution SERS Sensing Using Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods. *Analyst* **2016**, 141 (17), 5088–5095. <https://doi.org/10.1039/c6an01159d>.
- (217) Zhang, M.; Zhang, X.; Zhao, K.; Dong, Y.; Yang, W.; Liu, J.; Li, D. Assembly of Gold Nanorods with L-Cysteine Reduced Graphene Oxide for Highly Efficient NIR-Triggered Photothermal Therapy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2022**, 266. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120458>.

- (218) Wang, J.; Han, J.; Zhu, C.; Han, N.; Xi, J.; Fan, L.; Guo, R. Gold Nanorods/Polypyrrole/m-SiO₂ Core/Shell Hybrids as Drug Nanocarriers for Efficient Chemo-Photothermal Therapy. *Langmuir* **2018**, *34* (48), 14661–14669. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02667>.
- (219) Pratap, D.; Vikas; Gautam, R.; Shaw, A. K.; Soni, S. Photothermal Properties of Stable Aggregates of Gold Nanorods. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2022**, *635*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.128054>.
- (220) Duan, Q.; Wang, J.; Zhang, B.; Wang, X.; Xue, J.; Zhang, W.; Sang, S. Polydopamine Coated Au-Pt Nanorods: Enhanced Photothermal Properties and Efficient Reactive Oxygen Scavengers. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2022**, *210*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112247>.
- (221) Aoki, P. H. B.; Volpati, D.; Caetano, W.; Constantino, C. J. L. Study of the Interaction between Cardiolipin Bilayers and Methylene Blue in Polymer-Based Layer-by-Layer and Langmuir Films Applied as Membrane Mimetic Systems. In *Vibrational Spectroscopy*; 2010; Vol. 54, pp 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.03.013>.
- (222) Aoki, P. H. B.; Caetano, W.; Volpati, D.; Riul, A.; Constantino, C. J. L. Sensor Array Made with Nanostructured Films to Detect a Phenothiazine Compound. *J Nanosci Nanotechnol* **2008**, *8* (9), 4341–4348. <https://doi.org/10.1166/jnn.2008.297>.
- (223) Almeida, A. M.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. Role of Toluidine Blue-O Binding Mechanism for Photooxidation in Bioinspired Bacterial Membranes. *Langmuir* **2019**, *35* (51), 16745–16751. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03045>.
- (224) Ferreira, J. V. N.; Lago, J. H. G.; Caseli, L. Thymol in Cellular Membrane Models Formed by Negative Charged Lipids Causes Aggregation at the Air-Water Interface. *Chem Phys Lett* **2019**, *717*, 87–90. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.01.006>.
- (225) Vaia, R. A.; Teukolsky, R. K.; Giannelis, E. P. Interlayer Structure and Molecular Environment of Alkylammonium Layered Silicates. *Chem. Mater* **1994**, *6*, 1017–1022. <https://doi.org/10.1021/cm00043a025>.
- (226) Snyder, R. G.; Aljibury, A. L.; Strauss, H. L.; Casal, H. L.; Gough, K. M.; Murphy, W. F. Isolated C-H Stretching Vibrations of n-Alkanes: Assignments and Relation to Structure. *J Chem Phys* **1984**, *81* (12), 5352–5361. <https://doi.org/10.1063/1.447677>.
- (227) Chen, Y. F.; Tsang, K. Y.; Chang, W. F.; Fan, Z. A. Differential Dependencies on [Ca²⁺] and Temperature of the Monolayer Spontaneous Curvatures of DOPE, DOPA and Cardiolipin: Effects of Modulating the Strength of the Inter-Headgroup Repulsion. *Soft Matter* **2015**, *11* (20), 4041–4053. <https://doi.org/10.1039/c5sm00577a>.
- (228) Madejová, J.; Sekeráková, J.; Bizovská, V.; Slaný, M.; Jankovič, J.; Uboš. Near-Infrared Spectroscopy as an Effective Tool for Monitoring the Conformation of Alkylammonium Surfactants in Montmorillonite Interlayers. *Vib Spectrosc* **2016**, *84*, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.02.010>.

- (229) Kensbock, R.; Ahrens, H.; Helm, C. A. Interactions of Monovalent and Divalent Cations with Cardiolipin Monolayers. *Langmuir* **2019**, *35* (10), 3624–3633. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03637>.
- (230) Pasparakis, G. Light-Induced Generation of Singlet Oxygen by Naked Gold Nanoparticles and Its Implications to Cancer Cell Phototherapy. *Small* **2013**, *9* (24), 4130–4134. <https://doi.org/10.1002/sml.201301365>.
- (231) Gao, L.; Liu, R.; Gao, F.; Wang, Y.; Jiang, X.; Gao, X. Plasmon-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species from near-Infrared Light Excited Gold Nanocages for Photodynamic Therapy in Vitro. *ACS Nano* **2014**, *8* (7), 7260–7271. <https://doi.org/10.1021/nn502325j>.
- (232) Minai, L.; Yeheskely-Hayon, D.; Yelin, D. High Levels of Reactive Oxygen Species in Gold Nanoparticle-Targeted Cancer Cells Following Femtosecond Pulse Irradiation. *Sci Rep* **2013**, *3*. <https://doi.org/10.1038/srep02146>.
- (233) Dix, T. A.; Aikenst, J. Perspectives Mechanisms and Biological Relevance of Lipid Peroxidation Initiation. *Chem. Res. Toxicol* **1993**, *6*, 2–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/tx00031a001>.
- (234) Gu, X.; Timchenko, V.; Yeoh, G. H.; Dombrovsky, L.; Taylor, R. The Effect of Gold Nanorods Clustering on Near-Infrared Radiation Absorption. *Applied Sciences (Switzerland)* **2018**, *8* (7). <https://doi.org/10.3390/app8071132>.
- (235) Lv, Z.; He, S.; Wang, Y.; Zhu, X. Noble Metal Nanomaterials for NIR-Triggered Photothermal Therapy in Cancer. *Advanced Healthcare Materials*. John Wiley and Sons Inc March 1, 2021. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001806>.
- (236) Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) Using Gold Nanoparticles. *Lasers in Medical Science*. July 2008, pp 217–228. <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0470-x>.
- (237) Ilanchelian, M.; Ramaraj, R. Binding Interactions of Toluidine Blue O with Escherichia Coli DNA: Formation of Bridged Structure. *J Fluoresc* **2011**, *21* (4), 1439–1453. <https://doi.org/10.1007/s10895-010-0829-4>.
- (238) Usacheva, M. N.; Teichert, M. C.; Sievert, C. E.; Biel, M. A. Effect of Ca²⁺ on the Photobactericidal Efficacy of Methylene Blue and Toluidine Blue against Gram-Negative Bacteria and the Dye Affinity for Lipopolysaccharides. *Lasers Surg Med* **2006**, *38* (10), 946–954. <https://doi.org/10.1002/lsm.20400>.
- (239) Monteiro-Cardoso, V. F.; Silva, A. M.; Oliveira, M. M.; Peixoto, F.; Videira, R. A. Membrane Lipid Profile Alterations Are Associated with the Metabolic Adaptation of the Caco-2 Cells to Aglycemic Nutritional Condition. *J Bioenerg Biomembr* **2014**, *46* (1), 45–57. <https://doi.org/10.1007/s10863-013-9531-y>.
- (240) Menendez, J. A.; Lupu, R. Fatty Acid Synthase and the Lipogenic Phenotype in Cancer Pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*. October 2007, pp 763–777. <https://doi.org/10.1038/nrc2222>.
- (241) Grandi, S.; Tomasi, C.; Mustarelli, P.; Clemente, F.; Carbonaro, C. M. Characterisation of a New Sol-Gel Precursor for a SiO₂-Rhodamine 6G Hybrid Class II

- Material. *J Solgel Sci Technol* **2007**, *41* (1), 57–63. <https://doi.org/10.1007/s10971-006-0119-4>.
- (242) Oliveira, O. N.; Caseli, L.; Ariga, K. The Past and the Future of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films. *Chemical Reviews*. American Chemical Society March 23, 2022, pp 6459–6513. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00754>.
- (243) Aroca, R. F.; Teo, G. Y.; Mohan, H.; Guerrero, A. R.; Albella, P.; Moreno, F. Plasmon-Enhanced Fluorescence and Spectral Modification in SHINEF. *Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (42), 20419–20424. <https://doi.org/10.1021/jp205997u>.
- (244) Huang, X.; El-Sayed, M. A. Gold Nanoparticles: Optical Properties and Implementations in Cancer Diagnosis and Photothermal Therapy. *J Adv Res* **2010**, *1* (1), 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>.
- (245) Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (10), 1957–1962. <https://doi.org/10.1021/cm020732l>.
- (246) Sun, Q.; Shi, X.; Feng, J.; Zhang, Q.; Ao, Z.; Ji, Y.; Wu, X.; Liu, D.; Han, D. Cytotoxicity and Cellular Responses of Gold Nanorods to Smooth Muscle Cells Dependent on Surface Chemistry Coupled Action. *Small* **2018**, *14* (52). <https://doi.org/10.1002/sml.201803715>.
- (247) An, J.; Yang, X. Q.; Cheng, K.; Song, X. L.; Zhang, L.; Li, C.; Zhang, X. S.; Xuan, Y.; Song, Y. Y.; Fang, B. Y.; Hou, X. L.; Zhao, Y. Di; Liu, B. In Vivo Computed Tomography/Photoacoustic Imaging and NIR-Triggered Chemo-Photothermal Combined Therapy Based on a Gold Nanostar-, Mesoporous Silica-, and Thermosensitive Liposome-Composited Nanoprobe. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, *9* (48), 41748–41759. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b15296>.
- (248) Camacho, S. A.; Kobal, M. B.; Almeida, A. M.; Toledo, K. A.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. Molecular-Level Effects on Cell Membrane Models to Explain the Phototoxicity of Gold Shell-Isolated Nanoparticles to Cancer Cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2020**, *194*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111189>.
- (249) Cai, W.; Gao, T.; Hong, H.; Sun, J. Applications of Gold Nanoparticles in Cancer Nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl* **2008**, *1*, 17–32.
- (250) Fort, E.; Grésillon, S. Surface Enhanced Fluorescence. *J Phys D Appl Phys* **2008**, *41* (1). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/41/1/013001>.
- (251) Ayala-Orozco, C.; Liu, J. G.; Knight, M. W.; Wang, Y.; Day, J. K.; Nordlander, P.; Halas, N. J. Fluorescence Enhancement of Molecules inside a Gold Nanomatryoshka. *Nano Lett* **2014**, *14* (5), 2926–2933. <https://doi.org/10.1021/nl501027j>.
- (252) Camacho, S. A.; Sobral-Filho, R. G.; Aoki, P. H. B.; Constantino, C. J. L.; Brolo, A. G. Immunoassay Quantification Using Surface-Enhanced Fluorescence (SEF) Tags. *Analyst* **2017**, *142* (15), 2717–2724. <https://doi.org/10.1039/c7an00639j>.

- (253) Gersten, J.; Nitzan, A. Spectroscopic Properties of Molecules Interacting with Small Dielectric Particles. *J Chem Phys* **1981**, *75* (3), 1139–1152. <https://doi.org/10.1063/1.442161>.
- (254) Lakowicz, J. R. Radiative Decay Engineering: Biophysical and Biomedical Applications. *Anal Biochem* **2001**, *298* (1), 1–24. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5377>.
- (255) Almeida Jr, A. M.; Moreira, L. G.; Camacho, S. A.; Ferreira, F. G.; Conceição, K.; Tada, D. B.; Aoki, P. H. B. Photochemical Outcomes Triggered by Gold Shell-Isolated Nanorods on Bioinspired Nanoarchitectonics for Bacterial Membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2023**, *1865* (8). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2023.184216>.
- (256) Zhang, Z.; Maji, S.; Antunes, A. B. D. F.; De Rycke, R.; Zhang, Q.; Hoogenboom, R.; De Geest, B. G. Salt Plays a Pivotal Role in the Temperature-Responsive Aggregation and Layer-by-Layer Assembly of Polymer-Decorated Gold Nanoparticles. *Chemistry of Materials* **2013**, *25* (21), 4297–4303. <https://doi.org/10.1021/cm402414u>.
- (257) Szlasa, W.; Zendran, I.; Zalesińska, A.; Tarek, M.; Kulbacka, J. Lipid Composition of the Cancer Cell Membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **2020**, *52*, 321–342. <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09846-4>/Published.
- (258) Ali, O.; Szabó, A. Review of Eukaryote Cellular Membrane Lipid Composition, with Special Attention to the Fatty Acids. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) November 1, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms242115693>.
- (259) Doktorova, M.; Symons, J. L.; Levental, I. Structural and Functional Consequences of Reversible Lipid Asymmetry in Living Membranes. *Nature Chemical Biology*. Nature Research December 1, 2020, pp 1321–1330. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00688-0>.
- (260) Connor, J.; Bucana, C.; Fidler, I. J.; Schroit, A. J. *Differentiation-Dependent Expression of Phosphatidylserine in Mammalian Plasma Membranes: Quantitative Assessment of Outer-Leaflet Lipid by Prothrombinase Complex Formation (Asymmetry/Recognition/Macrophage)*; 1989; Vol. 86. <https://www.pnas.org>.
- (261) Almeida, A. M.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. Role of Toluidine Blue-O Binding Mechanism for Photooxidation in Bioinspired Bacterial Membranes. *Langmuir* **2019**, *35* (51), 16745–16751. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03045>.
- (262) Zawisza, I.; Lachenwitzer, A.; Zamlynny, V.; Horswell, S. L.; Goddard, J. D.; Lipkowski, J. 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* **2003**, *85* (6), 4055–4075. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74819-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74819-X).
- (263) Aoki, P. H. B.; Morato, L. F. C.; Pavinatto, F. J.; Nobre, T. M.; Constantino, C. J. L.; Oliveira, O. N. Molecular-Level Modifications Induced by Photo-Oxidation of Lipid

- Monolayers Interacting with Erythrosin. *Langmuir* **2016**, 32 (15), 3766–3773. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00693>.
- (264) Hussein, N.; Lopes, C. C.; Pernambuco Filho, P. C. A.; Carneiro, B. R.; Caseli, L. Surface Chemistry and Spectroscopy Studies on 1,4-Naphthoquinone in Cell Membrane Models Using Langmuir Monolayers. *J Colloid Interface Sci* **2013**, 402, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.04.005>.
- (265) Liljeblad, J. F. D.; Bulone, V.; Tyrode, E.; Rutland, M. W.; Johnson, C. M. Phospholipid Monolayers Probed by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy: Instability of Unsaturated Phospholipids. *Biophys J* **2010**, 98 (10). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.009>.
- (266) Petryayeva, E.; Krull, U. J. Localized Surface Plasmon Resonance: Nanostructures, Bioassays and Biosensing-A Review. *Analytica Chimica Acta*. November 7, 2011, pp 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.020>.
- (267) Allison, R. R.; Sibata, C. H. Oncologic Photodynamic Therapy Photosensitizers: A Clinical Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. June 2010, pp 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>.
- (268) Aoki, P. H. B.; Schroder, A. P.; Constantino, C. J. L.; Marques, C. M. Bioadhesive Giant Vesicles for Monitoring Hydroperoxidation in Lipid Membranes. *Soft Matter* **2015**, 11 (30), 5995–5998. <https://doi.org/10.1039/c5sm01019e>.
- (269) Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J Am Chem Soc* **2006**, 128 (6), 2115–2120. <https://doi.org/10.1021/ja057254a>.
- (270) Nejabat, M.; Samie, A.; Ramezani, M.; Alibolandi, M.; Abnous, K.; Taghdisi, S. M. An Overview on Gold Nanorods as Versatile Nanoparticles in Cancer Therapy. *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V. February 1, 2023, pp 221–242. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.01.009>.
- (271) Jang, B.; Park, J. Y.; Tung, C. H.; Kim, I. H.; Choi, Y. Gold Nanorod-Photosensitizer Complex for near-Infrared Fluorescence Imaging and Photodynamic/Photothermal Therapy in Vivo. *ACS Nano* **2011**, 5 (2), 1086–1094. <https://doi.org/10.1021/nn102722z>.
- (272) Sun, M.; Peng, D.; Hao, H.; Hu, J.; Wang, D.; Wang, K.; Liu, J.; Guo, X.; Wei, Y.; Gao, W. Thermally Triggered in Situ Assembly of Gold Nanoparticles for Cancer Multimodal Imaging and Photothermal Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, 9 (12), 10453–10460. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16408>.
- (273) Garcia-Belinchón, M.; Sánchez-Osuna, M.; Martínez-Escardó, L.; Granados-Colomina, C.; Pascual-Guiral, S.; Iglesias-Guimaraes, V.; Casanelles, E.; Ribas, J.; Yuste, V. J. An Early and Robust Activation of Caspases Heads Cells for a Regulated Form of Necrotic-like Cell Death. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, 290 (34), 20841–20855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.644179>.
- (274) Krysko, D. V.; Vanden Berghe, T.; D’Herde, K.; Vandenabeele, P. Apoptosis and Necrosis: Detection, Discrimination and Phagocytosis. *Methods* **2008**, 44 (3), 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.12.001>.

