

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Faculdade de Ciências e Letras de Assis

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

L1 – Ciências dos Materiais

André Satoshi Ferreira

**Fotossensibilização de sistemas modelos de carcinoma colorretal
mediada pelo xantênico Rosa de Bengala**

Assis

2024

André Satoshi Ferreira

Fotossensibilização de sistemas modelos de carcinoma colorretal mediada
pelo xantênico Rosa de Bengala

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

Orientador: Prof^o Dr. Pedro Henrique Benites Aoki

Coorientadora: Prof^a Dr. Sabrina Aléssio Camacho

Assis

2024

F383f

Ferreira, André Satoshi

Fotossensibilização de sistemas modelos de carcinoma colorretal mediada pelo xantênico Rosa de Bengala / André Satoshi Ferreira. -- Presidente Prudente, 2024

73 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente

Orientador: Pedro Henrique Benites Aoki

Coorientadora: Sabrina Aléssio Camacho

1. terapia fotodinâmica. 2. Caco-2. 3. xantênicos. 4. Filmes de Langmuir. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

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

Aos 25 dias do mês de outubro do ano de 2024, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ANDRÉ SATOSHI FERREIRA, intitulada "**Fotossensibilização de sistemas modelos de carcinoma colorretal mediada pelo xantênico Rosa de Bengala**". 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, Profa. Dra. ANA PAULA RAMOS (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo-FFCLRP, Profa. Dra. PRISCILA ALESSIO CONSTANTINO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia - Unesp/Câmpus de Presidente Prudente. Após a exposição pelo mestrando 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

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar os agradecimentos agradecendo a minha família, em especial a minha mãe por todo apoio, conselhos e puxões na orelha durante esse caminho. Também agradeço ao meu irmão pela companhia e conversas durante todo esse período.

Sou muito agradecido ao meu orientador Pedro por todo apoio, tanto no âmbito profissional quanto no pessoal, pelas críticas e pela orientação fundamental para a concepção dessa dissertação. Agradeço a minha coorientadora Sabrina, pelas discussões dos resultados e pelas conversas cotidianas no laboratório que foram fundamentais para deixar o dia a dia no laboratório muito mais leves.

Agradecimentos especiais também aos professores Drs. Osvaldo Novais (USP/São Carlos), Karina Alves (UNESP/Assis), e Christine DeWolf (Concordia University) pelo apoio e colaboração durante o projeto que não só auxiliaram na obtenção de resultados como também na discussão e orientação durante o projeto.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro tanto no país (Nº Processo 2021/14020-0) quanto no exterior (Nº Processo 2023/01999-3).

Aos meus amigos Pato, Mirella, Ronaldo, Fabi, Gi Cisotto, Dani, Bruna, Gi Eller, Gabs, Thamís, Lucas, meus mais profundos agradecimentos pelo apoio nos mais diversos cenários e ocasiões, e por todos os papéis e companhia nesse período. Com certeza vocês fizeram essa jornada se tornar mais leve.

Gostaria também de agradecer aos amigos que fiz durante meu período em Montréal, Mari e Edson foi ótimo conhecer vocês e muito obrigado pela companhia nesses 4 meses que estivemos juntos e por ouvirem minhas aventuras e desabafos. Às minhas amigas e ex-roomates mexicanas Karen e Liliana *muchíssimas gracias* pelo apoio que me deram, mesmo não entendendo bem o que estava fazendo lá, e por todas as “horas do café” e dos *chismes*. *Nos vemos pronto*.

Para finalizar, dedico essa dissertação em memória a meu pai pois ele foi quem me inspirou a mudar completamente de área entre a IC e o Mestrado, e possibilitou a elaboração e realização deste projeto. Espero que, onde quer que esteja, esteja feliz e orgulhoso do que realizei aqui.

RESUMO

Rosa de Bengala (RB) é um fotossensibilizador (FS) promissor para terapia fotodinâmica (TFD), mas sua aplicação ao carcinoma colorretal permanece amplamente inexplorada. Neste cenário, ensaios *in vitro* foram utilizados para demonstrar que a incorporação do RB apresenta considerável fototoxicidade contra células Caco-2, com redução de mais de 80% na viabilidade celular por 24 horas de incubação com 5×10^{-6} mol/L de RB seguida de irradiação. Em contraste, o RB apresentou toxicidade mínima quando não irradiado. Os mecanismos de ação do RB foram elucidados utilizando microscopia confocal de fluorescência, monocamadas de Langmuir como modelos de membrana celular e citometria de fluxo para determinar as vias de morte celular. A citometria de fluxo revelou que o principal processo de morte celular foi a apoptose tardia. A incorporação de RB afetou a morfologia da membrana plasmática de Caco-2 sob irradiação, e as interações de membrana foram confirmadas usando monocamadas de Langmuir de extratos celulares de Caco-2. A incorporação do RB nas monocamadas deslocou as isotermas π -A para áreas moleculares maiores, especialmente em baixas pressões superficiais e com o aumento da concentração de RB (1, 10 e 25×10^{-6} mol/L). A adsorção de RB também causou uma diminuição no módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) das monocamadas Caco-2, levando a elevação na flexibilidade da monocamada à medida que a concentração de RB aumentava. De acordo com a espectroscopia de absorção de reflexão infravermelha modulada por polarização (PM-IRRAS), o RB aniônico interagiu eletrostaticamente com grupos fosfolipídicos carregados positivamente. Além disso, as mudanças na área superficial observadas nas monocamadas após incorporação e irradiação de RB foram atribuídas a reações de hidroxidação desencadeadas pela geração de oxigênio singlete (1O_2). Esses achados indicam que o RB pode ser utilizado como FS na terapia fotodinâmica do câncer colorretal, fornecendo informações detalhadas sobre seu mecanismo de ação e fototoxicidade.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, Caco-2, xantênicos, Filmes de Langmuir

ABSTRACT

Rose Bengal (RB) is a promising photosensitizer (PS) for photodynamic therapy (PDT), but its application to colorectal carcinoma remains largely unexplored. Herein, we employ *in vitro* assays to demonstrate that incorporation of RB has substantial phototoxicity against Caco-2 cells, with more than 80% reduction in cell viability for 24 h incubation with 5×10^{-6} mol/L RB followed by irradiation. In contrast, RB had minimal toxicity without irradiation. The mechanisms of RB action were further elucidated using confocal fluorescence microscopy, Langmuir monolayers as cell membrane models, and flow cytometry to determine the cell death pathways. Flow cytometry revealed that the primary mode of cell death was late apoptosis. RB incorporation affected Caco-2 plasma membrane morphology under light irradiation, and membrane interactions were confirmed using Langmuir monolayers of Caco-2 lipid extracts. Incorporation of RB into the monolayers shifted the pressure-area isotherms toward larger molecular areas, especially at low surface pressures and increasing RB concentrations (1, 10, and 25×10^{-6} mol/L). RB adsorption also caused a decrease in the compressibility modulus (C_s^{-1}) of the Caco-2 monolayers, with a large increase in monolayer flexibility as RB concentration increased. According to polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS), the anionic RB interacted electrostatically with positively charged phospholipid groups. Moreover, the changes in surface area observed in the monolayers upon RB incorporation and irradiation could be attributed to hydroperoxidation reactions triggered by the generation of singlet oxygen (1O_2). These findings indicate that RB may be used as a PS in the photodynamic therapy of colorectal cancer, providing detailed insights into its mechanism of action and phototoxicity.

Keywords: photodynamic therapy, Caco-2, xanthenes, Langmuir Films

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração da janela terapêutica considerando a absorção biológica da água (H₂O), hemoglobina (Hb) e hemoglobina na presença de oxigênio (HbO₂) no espectro de absorção visível e infravermelho próximo. Adaptado de ³⁷. 17
- Figura 2.** Mapa eletrostático da molécula rosa de bengala, em que a fração ilustrada em azul representa a porção eletrofílica, e a fração ilustrada em vermelho representa a porção nucleofílica. Adaptado de Buck et al. ⁵¹ 19
- Figura 3.** Esquema ilustrativo para geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) baseado no diagrama de Jablonski simplificado. Adaptado de ⁶⁰ 21
- Figura 4.** Esquema de (a) uma célula eucariótica e suas organelas básicas, e da (b) composição e organização da membrana plasmática. Adaptado de ^{63,64} 23
- Figura 5.** Estrutura de um fosfolípido, mais especificamente da fosfatidilcolina. Ilustrada como (a) um esquema, (b) uma fórmula, (c) um modelo de preenchimento espacial. Adaptado de ⁶⁴. 24
- Figura 6.** (a) isoterma π -A mostrando as três fases (b) de compressão do filme de Langmuir, até o colapso..... 27
- Figura 7.** Ilustração da espectroscopia PM-IRRAS e parâmetros utilizado na medida, posicionada sobre a cuba de Langmuir contendo lipídios em subfase contendo PBS e RB. 28
- Figura 8.** Esquema ilustrativo do princípio da reflexão e refração da luz, para (a) refração de luz não polarizada; (b) refração de luz polarizada ao incidir no ângulo de Brewster; e (c) a reflexão da luz polarizada em uma subfase contendo uma monocamada de Langmuir. 31
- Figura 9.** Diagrama esquemático de um microscópio de força atômica. O laser emitido pelo diodo laser é focado na extremidade do cantiléver (ou alavanca). O raio laser refletido é redirecionado para um fotodiodo quadrante. Os movimentos verticais e laterais do cantiléver são detectados pelo fotodiodo. O circuito fechado de *feedback* é implementado no controlador. O computador é usado para configurar parâmetros para o controlador e coletar dados dele para formar imagens. 32
- Figura 10.** Reação característica do ensaio MTT, no qual o sal de MTT (amarelo), torna-se formazan (roxo púrpura) através da atividade mitocondrial celular. 33
- Figura 11.** Mecanismo de avaliação da citotoxicidade causada à membrana celular via ensaio de LDH. 34
- Figura 12.** (a) Princípio de funcionamento de um microscópio de fluorescência. (b) Sistema de orifício utilizado na microscopia confocal. A definição de uma imagem no plano focal (vermelho) é aumentada pela eliminação da luz proveniente de regiões fora do plano fora do plano focal (verde). 35

- Figura 13.** Princípio do funcionamento e um citômetro de fluxo. Adaptado de ⁹⁴. 37
- Figura 14.** (a) Imagem obtida via microscopia de campo claro do cultivo celular e (b) foto do sistema utilizado para irradiação das células tratadas com fotossensibilizador. 40
- Figura 15.** Efeitos tóxicos (preto) e fototóxicos (verde) do FS RB em cultivo *in vitro* de células Caco-2, mensurados em ensaios de MTT. A viabilidade celular foi determinada para células incubadas por (a) 0,5, (b) 3 e (c) 24 h com diferentes concentrações e o cálculo de CC_{50} feito através de regressão não-linear. 46
- Figura 16.** Liberação de LDH para diferentes concentrações de RB considerando um período de incubação de 3 h. CLM é o controle positivo de liberação máxima de LDH. 49
- Figura 17.** Microscopia de fluorescência confocal de células Caco-2 incubadas por 3 h com 0,25, 1 e 10×10^{-6} mol/L de RB não irradiadas e após irradiação. A membrana celular (verde) foi marcada com WGA Alexa Fluor® 488 enquanto o núcleo (azul) com DAPI. A fluorescência do RB foi registrada em 620 nm (vermelho). 51
- Figura 18.** Valores médios do diâmetro dos núcleos celulares da Caco-2 antes e após irradiação. Aproximadamente 40 células foram contadas para cada grupo utilizando o *software* ImageJ®. * $p < 0.05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação a população não irradiada. 52
- Figura 19.** Análise da incorporação do RB através da citometria de fluxo observando o canal FL3 (excitação com laser 488 nm e filtro de 670 LP) para (a) controle, (b) 0,25, (c) 1 e (d) 10×10^{-6} mol/L de RB não-irradiados após 3 h de incubação. 53
- Figura 20.** Citometria de fluxo para marcação de Anexina V Alexa Fluor® 488 e PI. A distribuição da população celular nos canais de Anexina V Alexa Fluor® 488 e PI está representada em (a) controle não irradiado, (b) $0,25 \times 10^{-6}$ mol/L de RB não irradiado, e (c) 1×10^{-6} mol/L de RB não irradiado. Já os gráficos (d) mostram os dados para o controle irradiado, (e) $0,25 \times 10^{-6}$ mol/L de RB irradiado e (f) 1×10^{-6} mol/L de RB irradiado. Os gráficos mostram os dados compilados para (g) controles celulares, (h) $0,25$ e (i) 1×10^{-6} mol/L de RB, tanto para células irradiadas quanto não irradiadas após 3 horas de incubação. 54
- Figura 21.** (a) Isotermas de pressão de superfície (mN/m) versus área (cm^2/mL de extrato celular) do extrato celular Caco-2 em PBS e RB ($1, 10$ e 25×10^{-6} mol/L). A inserção fornece uma visão aproximada das curvas de isotermas a 30 mN/m , a partir das quais os deslocamentos na área relativa foram medidos. (b) Módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) do extrato celular Caco-2 em solução de PBS e RB. C_s^{-1} foi estimado a partir das isotermas π -A com a equação $C_s^{-1} = -A(\partial\pi/\partial A)$ 56
- Figura 22.** Espectros de PM-IRRAS de monocamadas de extrato celular de Caco-2 em PBS e em RB (25×10^{-6} mol/L), antes e após irradiação. Os modos vibracionais dos grupos da cabeça são exibidos em (a), enquanto os dos grupos da cadeia são apresentados em (b). 58
- Figura 23.** Esquema da interação proposta entre o extrato celular Caco-2 e o Rosa Bengala (RB) com base nos dados do PM-IRRAS. O extrato celular apresenta diferentes fosfolipídios com diferentes tamanhos de cadeias (representados pelos números 2 e 3). A

molécula RB interage principalmente com os grupos de cabeça dos fosfolipídios, por exemplo, os fosfatos, e grupos catiônicos, por exemplo, a colina (número 1)..... 59

Figura 24. Imagens de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) de monocamadas de Caco-2 em PBS (a-b) e em 25×10^{-6} mol/L de RB (e-f). Imagens de AFM de filmes LB depositados a partir de monocamadas de Caco-2 em PBS (c-d) e de monocamadas de Caco-2 em 25×10^{-6} mol/L de RB (g-h). 61

Figura 25. Evolução da área relativa (A/A_0) da monocamada do extrato celular de Caco-2 em PBS não irradiado (azul) e solução PBS + RB (25×10^{-6} mol/L) não irradiada (preto) e irradiada (vermelho). 62

Figura 26. Evolução da área relativa (A/A_0) da monocamada do extrato celular de Caco-2 em solução PBS não irradiada (preto) e irradiada (vermelho). 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de estudos que aplicaram o FS RB na TFD utilizando diferentes condições e linhagens celulares..... 48

Tabela 2. Deslocamentos de área relativos ($[\frac{A-A_0}{A_0}] \times 100$), onde A e A_0 são as áreas extrapoladas a 30 mN/m para o extrato celular de Caco-2 em soluções de PBS e RB, respectivamente..... 56

Tabela 3. Atribuições das principais bandas para as monocamadas de Caco-2 e deslocamentos induzidos pela interação e irradiação do RB..... 58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

| | |
|----------------------------------|---|
| $\Phi\Delta$ | Rendimento quântico |
| $^1\text{O}_2$ | Oxigênio singlete |
| $^3\text{O}_2$ | Oxigênio molecular |
| BAM | Brewster angle microscopy |
| CCR | Câncer colorretal |
| CLP | Cardiolipina |
| DAPI | 4',6'-diamino-2-fenil-indol |
| DMEM F12 | Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DOPC | 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine |
| DOPE | 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine |
| DOPG | 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) |
| DPPC | 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine |
| EB | Eritrosina B |
| EosDec | Eosina decil éster |
| ERO | Espécie reativa de oxigênio |
| EY | Eosina Y |
| FL | Fluoresceína |
| FS | Fotossensibilizador |
| LDH | Enzima lactato desidrogenase |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio |
| PBS | Phosphate Buffer Solution (Solução Tampão de Fosfato) |
| PM-IRRAS | Polarization modulation-infrared reflection-adsorption spectroscopy |
| POPC | 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine |
| RB | Rosa de bengala |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| TFD | Terapia fotodinâmica |
| WGA | Wheat Germ Agglutinin |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução..... | 15 |
| 1.1. Terapia Fotodinâmica (TFD) | 15 |
| 1.2. Fotossensibilizadores (FSs)..... | 16 |
| 1.3. Rosa de Bengala (RB) | 18 |
| 2. Conceitos Teóricos..... | 21 |
| 2.1. Processos de absorção, emissão de luz e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)..... | 21 |
| 2.2. Célula e a Membrana Plasmática | 22 |
| 2.3. Processos de morte celular | 24 |
| 2.4. Filmes de Langmuir | 25 |
| 2.5. PM-IRRAS..... | 28 |
| 2.6. Microscopia BAM | 29 |
| 2.7. Microscopia de Força Atômica | 31 |
| 2.8. Ensaio de MTT | 33 |
| 2.9. Ensaio de LDH..... | 33 |
| 2.10. Microscopia de fluorescência confocal | 34 |
| 3. Objetivos | 37 |
| 4. Materiais e Métodos | 39 |
| 4.1. Cultivo celular <i>in vitro</i>..... | 39 |
| 4.2. Fotoativação do Rosa de Bengala incorporado nas células Caco-2 | 39 |
| 4.3. Ensaio de MTT..... | 40 |
| 4.4. Ensaio de LDH..... | 41 |
| 4.5. Microscopia de fluorescência e confocal | 41 |
| 4.6. Citometria de Fluxo | 42 |
| 4.7. Extrato celular de células Caco-2..... | 43 |
| 4.8. Filmes Langmuir do extrato celular de Caco-2 | 43 |
| 4.9. Tratamento de dados | 45 |
| 5. Resultados e Discussão..... | 46 |
| 5.1. Determinação da toxicidade e fototoxicidade do RB..... | 46 |
| 5.1.1. Ensaio de MTT | 46 |
| 5.1.2. Ensaio de LDH | 49 |
| 5.2. Alterações morfológicas induzidas pela incorporação e fotoativação do RB..... | 50 |
| 5.3. Mecanismos de morte celular desencadeados pela fotoativação do RB | 52 |
| 5.4. Monocamadas de Langmuir como Modelos de Membrana de Células Caco-2... 55 | |
| 5.5. Fotoativação do RB nas monocamadas de extrato de Caco-2..... | 61 |
| 6. Conclusão | 65 |
| Referências..... | 66 |

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado teve como ponto de partida estudos anteriores do grupo, que investigaram o fotossensibilizador Rosa de Bengala (RB) em sistemas modelo de membranas celulares, utilizando lipídios sintéticos para analisar sua interação e os efeitos foto-oxidativos. A partir desses estudos, o presente projeto foi delineado com o objetivo de aplicar o conhecimento adquirido em sistemas mais complexos, além de explorar os efeitos fototóxicos do RB em sistemas *in vitro*. A intenção foi estabelecer correlações entre os resultados obtidos em sistemas modelo e aqueles observados em sistemas mais complexos.

Nesse contexto, o câncer colorretal foi escolhido como objeto de estudo devido à sua alta incidência e mortalidade. Além disso, a aplicação do RB na terapia fotodinâmica (TFD) deste tipo de câncer ainda era pouco explorada, o que motivou sua seleção para o projeto. O objetivo principal foi investigar o uso do RB como fotossensibilizador (FS) na TFD do câncer colorretal, através de duas abordagens complementares. A primeira consistiu na aplicação do RB em culturas celulares de câncer colorretal, visando avaliar sua eficácia na indução de morte celular e identificar quais vias de morte celular eram ativadas nesse processo. A segunda abordagem focou na utilização do extrato celular obtido diretamente dessas células para a construção de modelos de membrana por meio das técnicas de Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). Isso permitiu uma análise aprofundada dos mecanismos de interação do RB com a membrana celular e dos efeitos foto-oxidativos induzidos pela sua fotoativação.

A dissertação está estruturada em quatro capítulos. O **Capítulo 1** apresenta a contextualização do estudo e define conceitos teóricos fundamentais para a compreensão da pesquisa. No **Capítulo 2**, são detalhados os objetivos, materiais e métodos utilizados ao longo do trabalho. O **Capítulo 3** expõe os resultados obtidos, acompanhados de uma discussão sobre suas implicações. Finalmente, o **Capítulo 4** traz as conclusões do projeto, sintetizando os principais achados ao longo do mestrado.

CAPÍTULO 1

1. Introdução

O câncer representa uma das principais causas de morte na faixa etária de 30 a 70 anos, sendo considerado uma barreira para o aumento da expectativa de vida em todos os países.^{1,2} Em 2020, cerca de 20 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer e 10 milhões morreram desta doença ao redor do mundo.^{2,3} Neste cenário, o câncer colorretal (CCR) aparece em terceiro lugar no ranking de novos casos e em segundo no ranking de mortalidade. Esta alta mortalidade está associada, principalmente, ao diagnóstico tardio e a pouca eficácia das terapias convencionais.^{3,4} O tratamento do CCR é composto principalmente de cirurgia para retirada do tumor seguida de quimioterapia, radioterapia e imunoterapia.^{4,5} Esta abordagem é invasiva e desencadeia efeitos colaterais significativos para o paciente, como dor, fadiga, perda de cabelos, náuseas e vômitos.⁵ As altas taxas de ressurgimento associadas ao comprometimento orgânico causado por essas intervenções têm liderado uma busca crescente por novas terapias, mais eficientes, e em especial, menos invasivas.⁶ Neste quesito, o desenvolvimento de terapias baseadas em luz (fototerapias) tem sido alvo de estudos, especialmente aquelas fundamentadas nos efeitos da interação da luz com os tecidos biológicos.⁷⁻⁹ A luz pode ser facilmente focada e ajustada para realizar o tratamento localizado, causando relativamente menos danos aos tecidos saudáveis, sendo assim consideradas não invasivas e diretas.¹⁰

1.1. Terapia Fotodinâmica (TFD)

A terapia fotodinâmica (TFD) tem se mostrado uma modalidade inovadora em tratamentos clínicos menos invasivos.¹¹⁻¹⁵ Por exemplo, tem sido aplicada no tratamento de infecções bacterianas, principalmente de espécies com certo grau de resistência aos antibióticos,¹⁶ no tratamento de cânceres, desde tumores mais superficiais como o de pele, até os tipos mais profundos como o de pulmão, na área dermatológica, como opção de tratamento de acne,¹⁷ psoríase, e quelóide,¹⁸ na área oftalmológica,^{19,20} cardiovascular, para o combate a aterosclerose,²¹ e na área neurológica, principalmente para doença de Alzheimer.^{22,23}

A técnica se baseia na administração controlada de um fotossensibilizador (FS) em um ambiente tumoral contendo oxigênio, seguido por irradiação utilizando uma fonte luminosa de comprimento de onda específico.^{5,24,25} Estados excitados do FS podem

transferir energia ou elétrons para seu entorno, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) através das reações de Tipo I e Tipo II.²⁵⁻²⁷

A reação do Tipo I é um processo químico que ocorre quando os radicais livres são gerados através da transferência de elétrons ou da abstração de um átomo de hidrogênio de uma molécula vizinha.²⁵ Esses radicais livres podem interagir com moléculas de oxigênio no ambiente circundante, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como íons peróxido, superóxidos e radicais hidroxila. As EROs podem causar danos às células e tecidos, levando ao estresse oxidativo e lesão celular. Os efeitos nocivos das EROs são devidos à sua capacidade de reagir e modificar biomoléculas importantes, como lipídios, proteínas e DNA. Isso pode levar a uma variedade de respostas celulares, incluindo inflamação, apoptose e morte celular.^{26,27}

A reação do Tipo II, por sua vez, resulta na transferência de energia para o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) formando oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), uma espécie altamente reativa capaz de oxidar componentes biológicos e desencadear os processos de morte celular.^{24-26,28} Estima-se que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em meio biológico é de 0,04 μs , o que limita sua capacidade de difusão (~ 100 nm) e permite a geração de danos confinados nos arredores dos sítios de ligação dos FSs.²⁹⁻³¹ Portanto, o controle sobre a localização do FS é crucial para a eficácia da TFD, o que tem impulsionado a uma busca por FSs capazes de interagir especificamente com o alvo, além de possuírem elevado rendimento quântico ($\Phi\Delta$) para formação de $^1\text{O}_2$.^{30,32}

1.2. Fotossensibilizadores (FSs)

A eficácia da TFD depende essencialmente dos fotossensibilizadores (FSs), que devem apresentar uma série de características como: acumulação seletiva em tumores, elevada eficiência na geração de $^1\text{O}_2$, baixa taxa de *photobleaching*, baixa toxicidade quando não irradiado e um equilíbrio adequado entre hidrofiliicidade e hidrofobicidade para favorecer a acumulação em tumores.^{33,34} Além desses elementos, a absorção no infravermelho próximo (>700 nm), conhecida como janela terapêutica (Figura 1), desperta grande interesse quando se trata da potencial aplicação *in vivo* da TFD. A luz nesse intervalo é capaz de penetrar mais profundamente nos tecidos, devido ao seu baixo coeficiente de absorção por substâncias como a hemoglobina, melanina e água.³⁵ Para contextualizar, é válido mencionar que a região do espectro correspondente à cor verde (~ 530 nm) permite uma penetração de aproximadamente 0,32 mm, enquanto a utilização

de comprimentos de onda próximos ao infravermelho (700 nm) aumenta a capacidade de penetração para cerca de 0,55 mm.³⁶

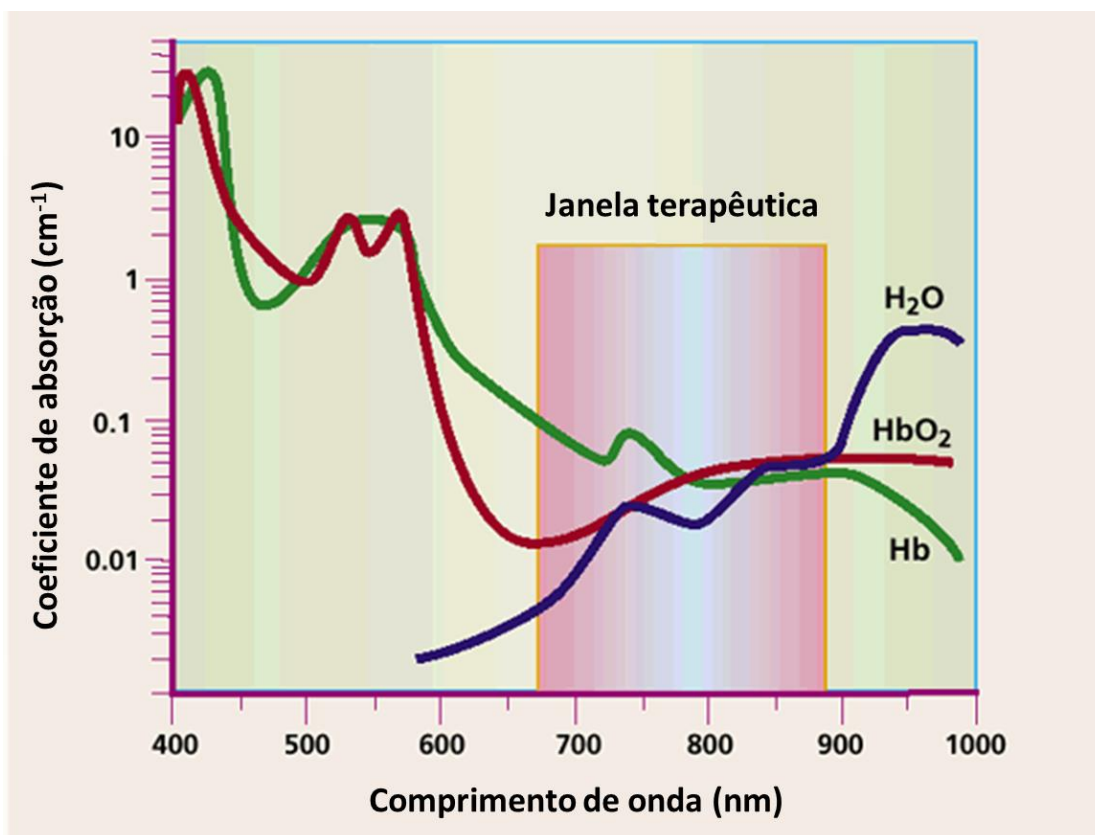


Figura 1. Ilustração da janela terapêutica considerando a absorção biológica da água (H₂O), hemoglobina (Hb) e hemoglobina na presença de oxigênio (HbO₂) no espectro de absorção visível e infravermelho próximo. Adaptado de ³⁷.

O efeito fotossensibilizador foi observado pela primeira vez em 1841, quando a hematoporfirina foi sintetizada através da remoção do ferro presente no sangue seco.³⁸ Apesar do potencial fotossensibilizador da hematoporfirina, a necessidade de altas doses e a baixa acumulação nos tecidos alvo motivaram a criação de novos FSs, originando a classe porfirina. Mesmo assim, esses FSs, considerados de primeira geração, apresentaram baixo coeficiente de absorção de luz na faixa do infravermelho e fraca penetração na região tumoral.^{38,39}

A segunda geração de FS vem como resposta às deficiências da primeira, tendo uma melhor absorção na região próxima ao infravermelho, e alto rendimento quântico de ¹O₂.⁴⁰ Dentre exemplos de FSs de segunda geração estão: compostos derivados de porfirina, como as clorinas, ftalocianinas, purpurinas e protoporfirinas, e composição não-porfirínicos, como as cianinas, ADPMs, corantes fenotiazínicos.³⁸ Atualmente, a área de pesquisas sobre novos FSs baseia-se no aprimoramento das moléculas já existentes, na síntese de nanoestruturas, e confecção de estruturas conjugadas que confirmam à molécula

fotossensibilizadora uma melhor penetração em tecidos tumorais, maior produção de EROs, principalmente de $^1\text{O}_2$, e maior seletividade ao tecido no qual é assimilado.³⁸⁻⁴⁰ Esses novos FSs são considerados como a terceira geração de FSs e tem como representantes: conjugados metálicos com FS, *nanodots* e *carbon-dots*.³⁸⁻⁴⁰

A utilização de compostos metálicos em combinação com FSs é fundamentada na amplificação da geração de $^1\text{O}_2$, alcançada por meio da interação entre materiais nanoestruturados e um FS.³⁸ Por exemplo, essa estratégia foi utilizada para a incorporação de nanopartículas de cobre e selênio juntamente com o FS clorina e-6, resultando na criação de uma nanoplataforma empregada no tratamento de câncer de mama.⁴¹ Adicionalmente, *nanodots* se referem a nanoestruturas com tamanhos na faixa de 2 a 20 nm. Estruturas ainda menores são denominadas *nanoclusters*, os quais podem ser fabricados utilizando um ou mais materiais distintos.⁴² Entre as variedades de *nanodots*, destacam-se os *carbon-dots*, que são nanoestruturas de carbono de até 15 nm. Eles têm despertado interesse significativo devido à síntese ambientalmente amigável, baixa toxicidade e alta biocompatibilidade, aliadas a uma alta estabilidade sob exposição à luz.⁴³ As aplicações potenciais dos *nanodots* e *carbon-dots* na TFD abrangem tratamentos como o câncer de mama^{44,45} e de fígado,⁴⁵ bem como a abordagem de infecções causadas por bactérias gram-negativas.⁴⁶

1.3. Rosa de Bengala (RB)

O Rosa de bengala (RB, 4,5,6,7-tetracloro-2',4',5',7'-tetraiodofluoresceína), também conhecido como *Acid Red 94* no *Color Index*, é um corante pertencente a segunda geração de FS, que foi sintetizado pela primeira vez no século XIX.²⁶ Sua descoberta remonta a Ghnem,²⁶ que adicionou halogênios à fluoresceína na tentativa de criar novos corantes para lã. O nome "Rosa de Bengala" é um nome fantasioso que provavelmente foi escolhido devido à sua semelhança com o ponto rosa tradicionalmente desenhado na testa de mulheres bengalis casadas na Índia.^{47,48}

A forma inicial da molécula sintetizada continha dois átomos de iodo, mas posteriormente foi modificada pela adição de mais dois átomos de iodo para obter sua forma atual, 3', 4', 5', 6'-tetracloro-2,4,5,7-tetraiodo-fluoresceína.⁴⁸ A Figura 2 mostra a distribuição eletrostática da molécula, destacando as porções eletrofílicas e nucleofílicas. O RB tem capacidade de coloração significativas para células bacterianas, protozoários e tecidos, tornando-se uma ferramenta valiosa para fins de pesquisa. Nos últimos anos,

devido seu potencial fotocatalítico, estudos envolvendo sua utilização em TFD tem crescido tanto na área de tratamento de câncer quanto para infecções bacterianas.⁴⁸⁻⁵⁰

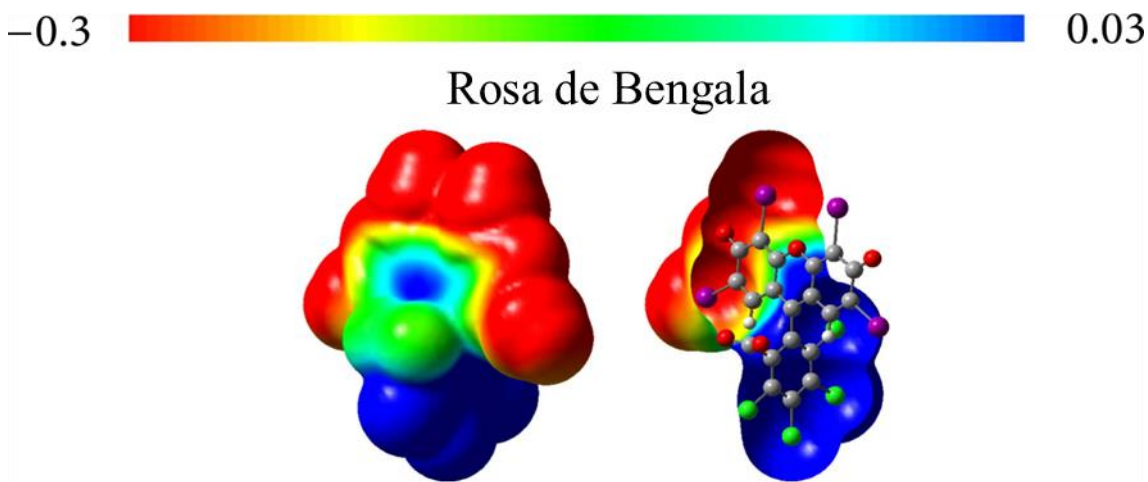


Figura 2. Mapa eletrostático da molécula rosa de bengala, em que a fração ilustrada em azul representa a porção eletrofílica, e a fração ilustrada em vermelho representa a porção nucleofílica. Adaptado de Buck *et al.*⁵¹

O RB pertence à classe dos derivados xantênicos, que recebem destaque por apresentarem não somente um elevado $\Phi\Delta^1\text{O}_2$, mas também alta afinidade por estruturas biológicas.⁵²⁻⁵⁴ O RB, Eritrosina B (EB), Eosina Y (EY) e Fluoresceína (FL), possuem como base o mesmo cromóforo central, formado por três anéis aromáticos, com um átomo de oxigênio no anel central, sendo os derivados com maior potencial de aplicações terapêuticas.⁵⁵ Especificamente, o RB se destaca em relação aos demais xantênicos mencionados, por apresentar o maior $\Phi\Delta^1\text{O}_2$ (RB>EB>EY>FL),⁵⁶ além de ser o único classificado como anfifílico a partir do Log de seu coeficiente de partição (Log P = 0,66).⁵⁶ Este caráter anfifílico favorece uma inserção mais eficiente do RB em membranas celulares, o que pode aumentar significativamente os danos fotodinâmicos sobre as estruturas lipídicas.

Diante deste contexto, o presente estudo está inserido em uma sequência de trabalhos realizados pelo grupo na área dos xantênicos e seu comportamento em diferentes modelos de membrana plasmática. Em trabalhos anteriores, mostramos que a hidroperoxidação pode ser fotoinduzida quando os derivados xantênicos EB⁵⁷ e EY⁵⁸ são incorporados em monocamadas de Langmuir, que atuam como modelos de membrana celular. Este efeito foi observado para monocamadas de Langmuir de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), que possuem insaturações em suas cadeias hidrofóbicas. Em contraste, a irradiação não

teve efeito em monocamadas saturadas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC). A evidência da hidroperoxidação foi obtida a partir do aumento da área molecular média das monocamadas lipídicas sob irradiação, acompanhada de uma diminuição de espessura dos filmes. A origem deste efeito foi apontada pelos dados de espectroscopia vibracional de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS), que indicaram a migração dos grupos hidroperóxidos em direção as cabeças polares dos lipídios. Esses efeitos foram confirmados em modelos mais complexos, aplicando a EB em filmes produzidos a partir de extrato celular de células de câncer de orofaringe (linhagem Hep-2).^{25,59}

Recentemente, Moreira *et al.*⁵⁹ avaliaram os efeitos desencadeados por um derivado da eosina Y, modificado quimicamente com uma calda de dez carbonos (EosDec), em sistemas modelos de membrana de *Escherichia coli*. Seus resultados demonstraram que o principal efeito da fotoativação da EosDec foi a clivagem de cadeias lipídicas, sendo contraponto aos resultados obtidos até o momento. Essa divergência foi explicada devido ao caráter hidrofóbico da molécula, que auxiliou na maior penetração do FS no modelo de membrana.^{25,60} Neste contexto, temos empregado nesta dissertação o FS RB, o único do conjunto que possui caráter anfifílico.⁵⁶ Modelos complexos de membrana celular vêm sendo utilizados, baseados em filmes de Langmuir fabricados a partir do extrato celular de células derivadas do câncer colorretal (Caco-2). O objetivo têm sido determinar os mecanismos moleculares de interação com os modelos de membrana, além dos mecanismos subjacentes à oxidação lipídica fotoinduzida. A meta final será correlacionar as informações em escala molecular com a eficiência fotodinâmica do RB em cultivo *in vitro* de células Caco-2.

2. Conceitos Teóricos

2.1. Processos de absorção, emissão de luz e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A Figura 3 mostra o diagrama de Jablonski, no qual processos de absorção de fótons, conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistemas e fosforescência são detalhados.

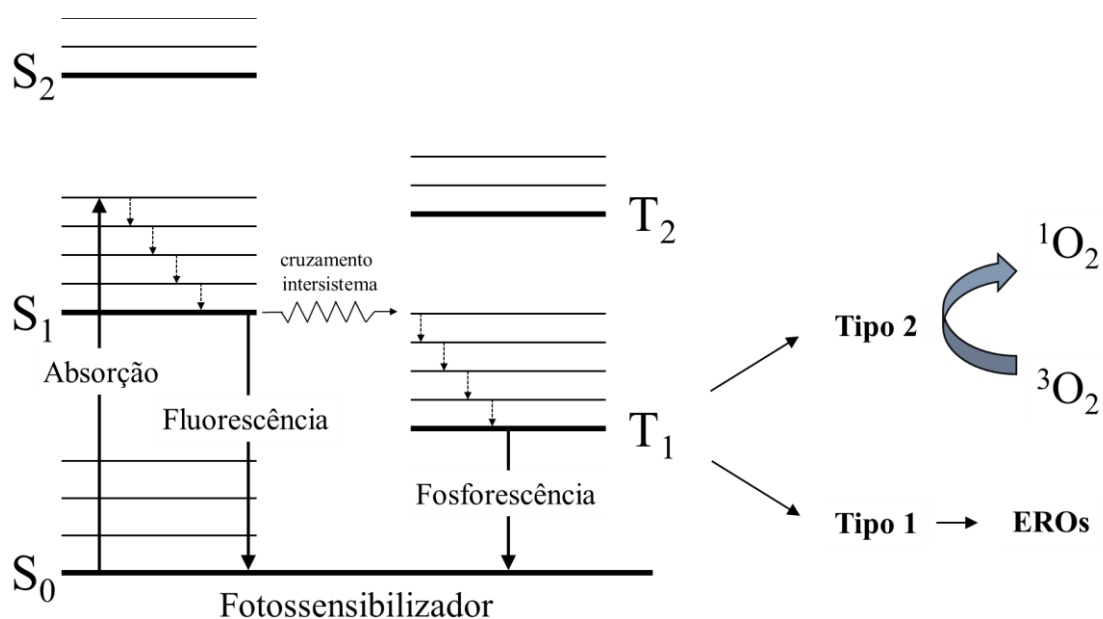


Figura 3. Esquema ilustrativo para geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) baseado no diagrama de Jablonski simplificado. Adaptado de ⁶⁰

Ao absorver energia, a molécula é excitada, alcançando um nível de energia superior ao seu estado fundamental. Uma vez que a molécula está nesse estado excitado, várias opções se apresentam para que ela retorne ao estado fundamental:

1. **Fluorescência:** em estados singletos excitados (S₁), o elétron no orbital excitado apresenta spin oposto em relação ao segundo elétron no orbital do estado fundamental (S₀). Isso possibilita o retorno ao estado fundamental com a emissão de um fóton. As moléculas em estado excitado podem permanecer em S₁ por períodos que variam de dezenas de picossegundos a algumas centenas de nanossegundos, dependendo das características moleculares e ambientais.^{61,62}
2. **Conversão interna:** transição não radiativa que ocorre entre dois estados eletrônicos. Após a absorção de luz, frequentemente há um processo de

relaxamento vibracional até o nível vibracional mais baixo do estado eletrônico.^{61,62}

3. **Cruzamento intersistema:** de relaxamento não radiativo do estado excitado S_1 para o estado triplo T_1 . Em princípio, a transição entre estados de multiplicidades diferentes é proibida, mas a influência do acoplamento spin-órbita pode ser suficientemente forte para permitir essa transição.^{61,62}
4. **Fosforescência:** envolve a emissão de luz do estado excitado T_1 para o estado fundamental S_0 , sendo deslocada para comprimentos de onda maiores (energia mais baixa) em comparação com a fluorescência. A transição T_1 para S_0 é proibida devido à paridade dos spins, o que resulta em taxas de emissão mais lentas. O tempo de vida de um estado triplo varia de microssegundos a segundos, sendo mais longo do que o estado singlete.^{61,62}
5. **Geração de EROs:** devido ao tempo de vida prolongado do estado T_1 , uma molécula em estado excitado pode interagir com outras moléculas presentes no ambiente, pelas reações de tipo I e II.^{61,62}

2.2. Célula e a Membrana Plasmática

A célula é a unidade básica da composição de um ser vivo, sendo classificada em células procarióticas e eucarióticas. A principal diferença entre as duas classes está na presença de um núcleo organizado, nos eucariotos, e na sua ausência, nos seres procariotos. Seres vivos mais complexos, como plantas, animais e fungos, são compostos por células eucarióticas.⁶³ A célula eucariótica, ilustrada na Figura 4a, é composta por uma membrana plasmática, um núcleo organizado envolto por uma membrana denominada envelope nuclear, e uma diversidade de organelas: mitocôndria, retículo endoplasmático (liso e rugoso), aparelho de Golgi, lisossomo, peroxissomos, e vesículas que se encontram no citoplasma.⁶³

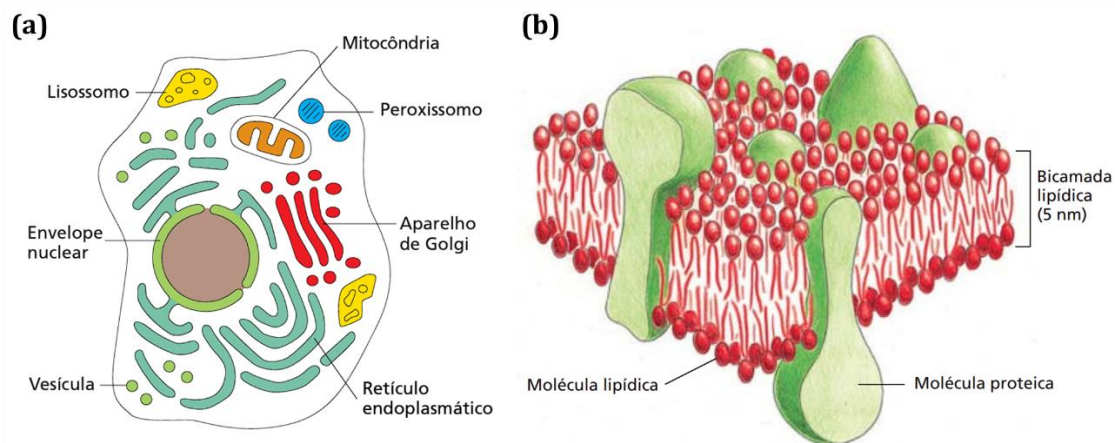


Figura 4. Esquema de (a) uma célula eucariótica e suas organelas básicas, e da (b) composição e organização da membrana plasmática. Adaptado de ^{63,64}

A estrutura de maior proeminência na célula é o núcleo, onde toda a informação genética da célula é armazenada. Os retículos endoplasmáticos são responsáveis pela produção dos componentes da membrana celular e moléculas, principalmente proteínas, a serem secretadas pela célula. O aparelho de Golgi é quem finaliza e encapsula as moléculas produzidas pelo retículo. A digestão e excreção de partículas é realizada pelos lisossomos, sendo capazes de liberar nutrientes oriundos de alimentos ingeridos, e também expulsar partículas e moléculas indesejadas. Os peroxissomos são uma classe de organelas que possuem capacidade de aplicar peróxido de hidrogênio para neutralizar possíveis moléculas tóxicas que porventura entrem no interior celular.⁶³ O núcleo e todas as organelas citadas são protegidas por uma estrutura fluida denominada membrana plasmática.

As membranas celulares desempenham um papel fundamental na preservação da homeostase celular. Elas participam da síntese de ATP, coordenam o transporte de substâncias e operam como barreiras seletivas, regulando o fluxo de entrada e saída de materiais da célula. Além disso, funcionam como sensores celulares para as condições do ambiente extracelular.^{63,64} São constituídas de lipídios e proteínas, organizados na forma de bicamada, conforme ilustra a Figura 4b. A porção lipídica é totalmente anfifílica, tendo suas moléculas uma região hidrofílica e outra hidrofóbica. O constituinte principal são os fosfolipídeos (Figura 5) que possuem uma região polar, popularmente denominada de cabeça, e outra região apolar, denominada de cauda e constituída de hidrocarbonetos.⁶⁴ Nos animais, os fosfolipídeos mais prevalentes são os fosfoglicerídeos, compostos por uma estrutura central de glicerol, duas cadeias de ácidos graxos e um grupo fosfato que

está ligado com os grupos polares da cabeça da molécula. Além dos fosfolipídeos, outros importantes componentes da membrana são os glicolipídeos e colesterol.⁶⁴

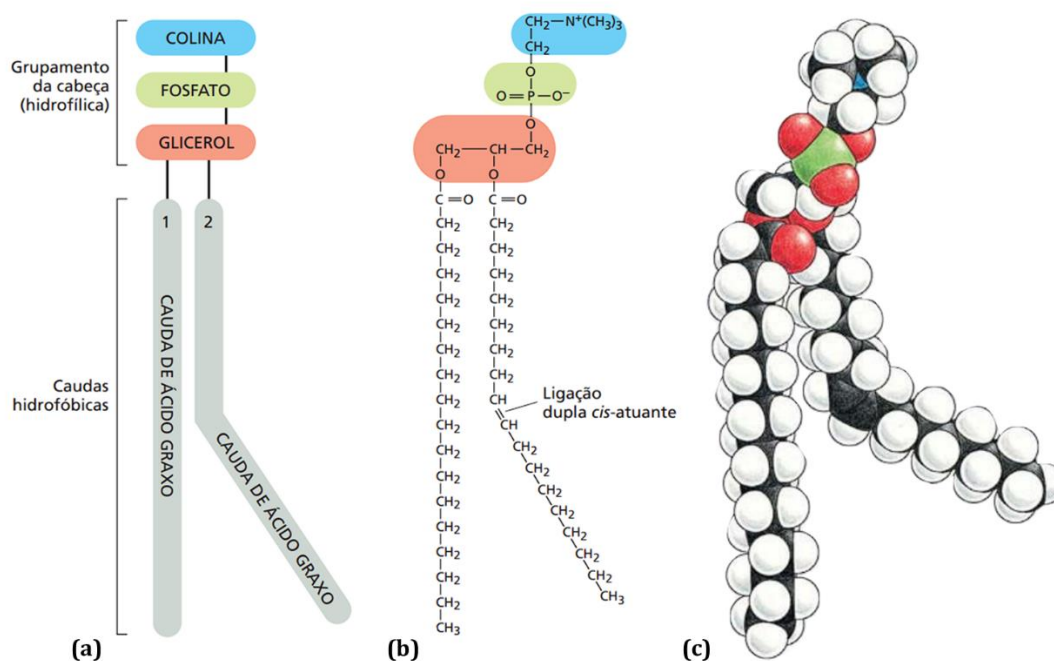


Figura 5. Estrutura de um fosfolipídeo, mais especificamente da fosfatidilcolina. Ilustrada como (a) um esquema, (b) uma fórmula, (c) um modelo de preenchimento espacial. Adaptado de ⁶⁴.

2.3. Processos de morte celular

A morte celular é um componente essencial para o desenvolvimento do organismo e para manutenção da homeostase.⁶⁵ A eliminação de materiais supérfluos para o organismo é importante também para assegurar a morfonogênese, ou seja, a formação e diferenciação de tecidos e órgãos.⁶⁵ Tradicionalmente os processos de morte celular podem ser divididos em mortes celulares acidentais (MCA) e mortes celulares programadas (MCP).⁶⁶ Enquanto as MCA são processos biológicos não controlados pelo organismo, as MCP envolvem sinalização e ativações de cascatas biológicas que acabam culminando na morte da célula.⁶⁶ Além dessa divisão tradicional, as mortes celulares podem ser classificadas com base na sua morfologia danos decorrentes à sua ativação, sendo que os principais tipos são: apoptose, necrose, autofagia, piroptose, e necroptose.

A apoptose, também conhecida popularmente como “morte celular programada”, é caracterizada pelo condensamento do citoplasma e do núcleo celular sem compromissar a integridade da membrana.⁶⁵ Com isso não é uma rota que causa diretamente a lise

celular e, por isso, não possui caráter inflamatório, diferentemente das respostas por piroptose, necroptose e necrose.⁶⁷

A necrose, por sua vez, é caracterizada pela perda precoce da integridade da membrana e consequente expansão do citoplasma.⁶⁵ Além disso, na necrose ocorre a deformação e inchaço de organelas e da célula como um todo, resultando em lise celular e processos inflamatórios na região.^{66,67}

A autofagia é um processo que se baseia na formação de vesículas, sendo essa sua principal característica.⁶⁶ A junção das vesículas com os lisossomos leva a degradação de organelas que não possuem mais serventia para a célula.⁶⁶ Dessa forma, a membrana celular permanece intacta durante o processo e a célula é destruída “de dentro para fora” através dos lisossomos.⁶⁶

A piroptose é uma forma de MCP que ocorre em resposta a perturbações associadas a imunidade inata sendo dependente da enzima inflamatória CASP1.⁶⁷ Nesse tipo de morte celular ocorre lise celular e ruptura da membrana, além da liberação de citocinas pró-inflamatórias que favorecem a ocorrência respostas inflamatórias acentuadas no local.⁶⁷

Por fim, a necroptose trata-se de uma necrose que é regulada pela própria célula, sendo independente de caspases.⁶⁶ Esse processo de morte celular é caracterizada pela deformação de organelas, degradação generalizada da célula, danos ao DNA e a formação de poros na membrana plasmática, levando à lise celular.^{66,67}

2.4. Filmes de Langmuir

Filmes ultrafinos e resistentes podem ser formados pela dispersão de uma gota de óleo sobre a superfície da água. Apesar de Irving Langmuir e Katherine Blodgett serem considerados os pioneiros da técnica atual de Langmuir e Langmuir-Blodgett, o primeiro registro desse fenômeno, ocorreu muito antes, no império babilônico, como escrito nas tábuas cuneiformes durante o reinado de Hamurabi.^{68,69} Em 1774, Benjamin Franklin conduziu o primeiro experimento no qual conseguiu observar a formação de um fino filme de óleo sobre a água.⁶⁹ No início do século XX, Irving conseguiu compilar os dados experimentais e teóricos que explicam não somente as características, como também as propriedades fundamentais, dos filmes monomoleculares.⁷⁰ Esses estudos marcaram o início do que hoje conhecemos como filmes de Langmuir.

A fabricação desses filmes monomoleculares ultrafinos e insolúveis em água exige o uso de moléculas que possuam um equilíbrio entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Os grupos hidrofílicos ajudam a dispersar as moléculas na superfície da água, enquanto os grupos hidrofóbicos evitam que as moléculas se misturem completamente com a água.⁷¹ Geralmente, uma solução que contém o material dissolvido em um solvente orgânico altamente volátil é espalhada sobre uma subfase de água ultrapura (18,2 MΩ.cm). Após a evaporação do solvente, as moléculas do material são comprimidas por barreiras móveis, formando uma monocamada conhecida como filme de Langmuir. A caracterização básica desses filmes é feita através de isotermas de pressão de superfície versus área molecular média (π -A).⁷¹ A pressão de superfície (π) é medida pela diferença entre a tensão superficial da água pura (γ_0) e a tensão superficial da combinação de água pura com a monocamada (γ), conforme mostrado na Eq. 1.

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{Eq. 1}$$

A isoterma de uma monocamada de Langmuir é composta por três fases distintas: primeiro, a fase gasosa, onde as moléculas estão dispersas e não interagem de forma significativa entre si; em seguida, a fase líquida, caracterizada por interações iniciais entre as moléculas; e, por fim, a fase condensada, onde as moléculas se organizam de maneira densa em uma estrutura monomolecular. Se a compressão do filme continuar além desse ponto, o ponto de colapso pode ser atingido, onde as moléculas começam a se sobrepor de maneira desordenada, levando ao colapso do filme (Figura 6a e 6b). Enquanto compostos mais simples como ácidos graxos (como o ácido esteárico) tendem a formar arranjos regulares e bem orientados sobre a subfase, nos materiais com moléculas maiores e mais complexas, como extratos lipídicos de células, essas três fases nem sempre são claramente distintas.^{71,72} A fabricação de monocamadas lipídicas através da técnica de Langmuir, são consideradas um modelo simplificado de biomembranas, e vêm sendo amplamente utilizadas para estudar processos biológicos em nível molecular.^{69,73} Por exemplo, a utilização da técnica para determinação mecanismos moleculares na ação de fármacos e moléculas de interesse biológico, relevantes para diversas áreas da saúde, principalmente para o eixo médico-farmacológico.⁷²

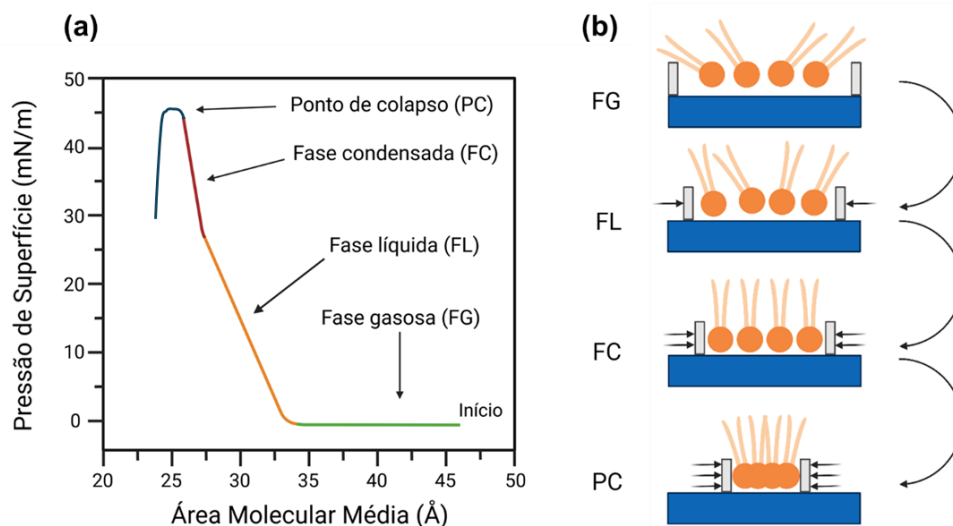


Figura 6. (a) isoterma π -A mostrando as três fases (b) de compressão do filme de Langmuir, até o colapso.

Para a fabricação desses filmes ultrafinos, utiliza-se um dispositivo experimental conhecido como cuba de Langmuir. Este equipamento é composto por uma cuba de teflon que contém a subfase líquida e é equipada com duas barreiras móveis que controlam a compressão do filme de maneira regulada, além de um sensor que monitora a pressão da superfície. Adicionalmente, o sistema pode incluir uma sonda para medir o potencial de superfície e um braço mecânico, conhecido como *dipper*, que transfere o filme para um substrato sólido. Hoje em dia, técnicas avançadas, como o microscópio de ângulo de Brewster (BAM), o elipsômetro e a espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS), são frequentemente acopladas à cuba de Langmuir para proporcionar uma caracterização mais detalhada dos filmes. A produção desses filmes requer um ambiente controlado, livre de contaminação e com temperatura estável. As isotermas π -A são amplamente utilizadas para examinar a estrutura da monocamada e detectar transições de fase, que podem ser associadas a mudanças na orientação molecular. A medição da pressão de superfície revela variações na tensão superficial da água ultrapura causadas pela presença da monocamada, um processo que é cuidadosamente descrito pelo método de Wilhelmy.

O método de Wilhelmy, que oferece medições extremamente precisas com sensibilidade de até 5×10^{-3} mN/m, emprega um sensor constituído por uma placa de platina ou papel de filtro parcialmente imerso na subfase, suspenso por um fio muito fino conectado a uma balança de alta precisão. Durante a compressão das moléculas na interface água/ar, tanto a pressão de superfície quanto a área molecular média são

continuamente monitoradas. Esse método mede as variações na tensão superficial da água resultantes da formação da monocamada, especificamente através das alterações na força de tração exercida sobre a placa parcialmente submersa. À medida que a monocamada se forma, ocorre uma mudança na tensão superficial da subfase, inicialmente água pura, depois água com a monocamada, o que leva a uma variação na força de tração no fio. Essa variação está diretamente ligada à mudança na tensão superficial da subfase e à geometria da placa.

2.5. PM-IRRAS

A espectroscopia vibracional de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS) é uma técnica de espectroscopia que utiliza do infravermelho para a mensuração dos modos vibracionais de moléculas e compostos presentes em uma superfície.⁷⁴ É utilizada para a caracterização de materiais orgânicos e inorgânicos. A região de comprimento de onda investigada pela técnica abrange a faixa de 1 a 100 μm , possibilitando a absorção em distintas frequências vibracionais, cada uma associada a tipos específicos de ligações.

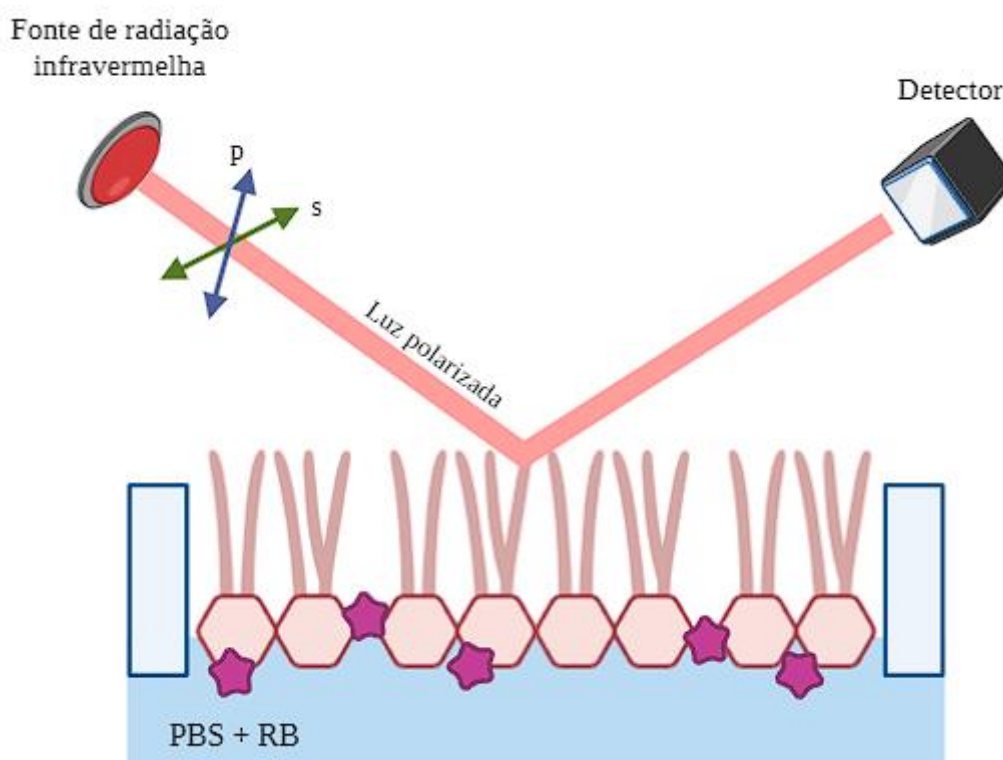


Figura 7. Ilustração da espectroscopia PM-IRRAS e parâmetros utilizado na medida, posicionada sobre a cuba de Langmuir contendo lipídios em subfase contendo PBS e RB.

Uma das primeiras aplicações da técnica de PM-IRRAS em filmes de Langmuir se deu por Blaudez *et al.*^{75,76} onde a modulação da radiação polarizada incidente (polarização “s” e “p”, Figura 7) é responsável pelo aumento da sensibilidade de absorção de radiação infravermelha pela superfície. Sendo assim, o sinal resultante é detectado pela refletividade diferencial expressa pela Eq. 2.^{69,74}

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad \text{Eq. 2}$$

O interferômetro presente no equipamento é o responsável por essa modulação da polarização da radiação infravermelha, que passa por um polarizador de ZnSe e um modulador fotoelástico de frequência fixa. O feixe é direcionado para a amostra em um ângulo de incidência desejado e convergido para o detector. Os sinais ($R_p - R_s$) e ($R_p + R_s$) são então extraídos, filtrados e demodulados, resultando no sinal PM-IRRAS, onde R_p é a refletividade da polarização "p" da radiação incidente e R_s é a refletividade da polarização "s" da radiação eletromagnética incidente.⁶⁹ As bandas no sinal PM-IRRAS dependem da orientação do momento dipolar de transição de um determinado grupo funcional.^{69 66}

2.6. Microscopia BAM

A microscopia de ângulo de Brewster é uma técnica capaz de analisar a organização 2D de uma monocamada de um material, incluído aspectos como tamanho, formato e heterogeneidade em filmes de Langmuir.⁷⁴ É uma metodologia muito versátil pelo fato de dispensar o uso de uma sonda e poder ser realizada diretamente na interfase líquido-ar.⁶⁹ Desta forma esse microscópio é capaz não apenas de possibilitar a visualização da passagem da fase LE para a LC como também de investigar as mudanças ocasionadas pela adsorção da molécula de interesse na monocamada.⁶⁹

A microscopia BAM tem como base a diferença dos índices de refração de dois meios isotrópicos e não absorventes distintos, o que ocasiona em uma reflexão da luz polarizada na interface entre esses meios. A refletividade, nesse caso, é afetada pela diferença entre os índices de refração dos dois meios ($n_2 > n_1$), pela polarização da luz e pelo ângulo de incidência. Quando uma fonte luminosa polarizada incide em uma interface líquido-ar com o ângulo de Brewster ($53,1^\circ$), nenhuma luz é refletida da interface entre esses dois meios de diferentes índices refrativos. Entretanto, nessa situação, a introdução de um filme de Langmuir modifica as condições de ângulo de

Brewster fazendo com que parte da luz seja refletida e seja utilizada para visualização e imageamento da região.⁷⁴

Em termos matemáticos, temos que a condição para que o ângulo de Brewster ocorra é que o ângulo de incidência da luz deve ser capaz de fazer com que as luzes refletida e refratada fiquem em um ângulo de 90° graus entre si, conforme ilustrado na Figura 8a. Nessa situação, é possível estabelecer uma relação entre os ângulos de incidência (Eq. 3) e reflexão da luz e a equação de Snell sobre a refração da luz (Eq. 4). A junção dessas duas equações origina a Eq.5, que pode ser reescrita conforme a Eq. 6 sendo uma forma simples de calcular o ângulo de Brewster.

$$\theta_r = 90 - \theta_i \quad \text{Eq. 3}$$

$$n_1 \times \text{sen}\theta_i = n_2 \times \text{sen}\theta_r \quad \text{Eq. 4}$$

$$n_1 \times \text{sen}\theta_i = n_2 \times \text{sen}(90 - \theta_i) = n_2 \times \text{cos}\theta_i \quad \text{Eq. 5}$$

$$\text{tg}\theta_i = \frac{n_2}{n_1} \quad \text{Eq. 6}$$

Sob as condições em que n_1 representa o índice de refração do ar, igual a 1, e n_2 corresponde ao índice de refração da água, com o valor de 1,333, o ângulo de Brewster será de 53,1°. Em teoria, nessas circunstâncias, nenhuma luz é refletida quando a luz polarizada incide sobre o meio n_2 , considerando um sistema ideal sem interferências atmosféricas não controladas e com uma interface plana (Figura 8b). Na prática, entretanto, a luz refletida será mínima, mas não totalmente inexistente, devido à presença de vapor d'água na atmosfera sobre a interface dos meios, e à organização rugosa da água na superfície, causada pelas forças de tensão superficial e capilaridade das moléculas. Além disso, a existência de uma camada lipídica ultrafina sobre a interface ar/água modifica o índice de refração (n_3), que passa a ser diferente do da água, fazendo com que a luz seja refletida e captada pelo microscópio (Figura 8c). A intensidade da luz refletida pela camada lipídica dependerá do tamanho da cadeia lipídica, da densidade molecular e das interações entre as moléculas da monocamada e a interface aquosa.

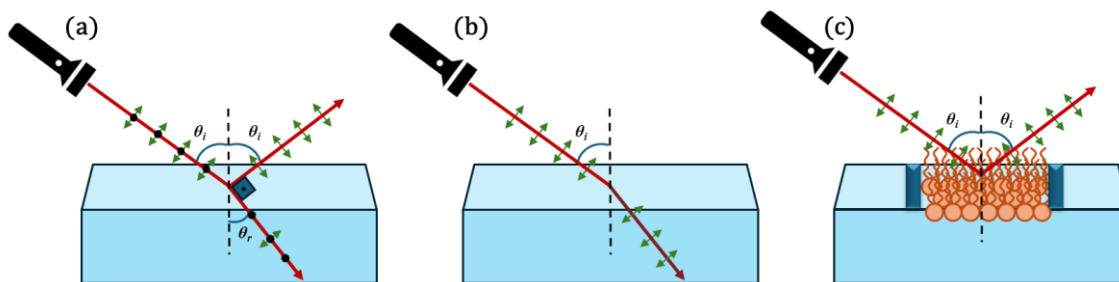


Figura 8. Esquema ilustrativo do princípio da reflexão e refração da luz, para (a) refração de luz não polarizada; (b) refração de luz polarizada ao incidir no ângulo de Brewster; e (c) a reflexão da luz polarizada em uma subfase contendo uma monocamada de Langmuir.

2.7. Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*, Figura 9) foi desenvolvida por Binnig, Quate e Gerber em 1984.⁷⁷ Esse grupo foi responsável pela construção de um microscópio capaz de detectar forças na casa de 10^{-12} a 10^{-8} N entre uma agulha e a superfície de uma amostra.⁷⁸ Este mecanismo possibilitou a captura de imagens na escala nanométrica realizando uma varredura perfilométrica sem destruir a amostra e sem necessitar de vácuo ou reagentes para contraste.^{78,79}

A técnica de AFM baseia-se na utilização de uma sonda muito pequena que percorre a superfície da amostra sem tocá-la diretamente. Durante o escaneamento, a sonda se movimenta nos três eixos (x,y e z) por um mecanismo de *feedback* para manter a força de interação sonda-amostra o mais constante possível.⁷⁹ O posicionamento da sonda em escala nanométrica é possível através de *scanners* piezoelétricos (sensores que medem a capacidade de transformar tensão mecânica em elétrica e vice-versa). Esses sensores funcionam através da aplicação de diferentes voltagens e proporcionam o movimento da sonda na amostra e, conseqüentemente, a obtenção de imagens em três dimensões em escala nanométrica de mais diversos tipos de materiais.⁷⁹

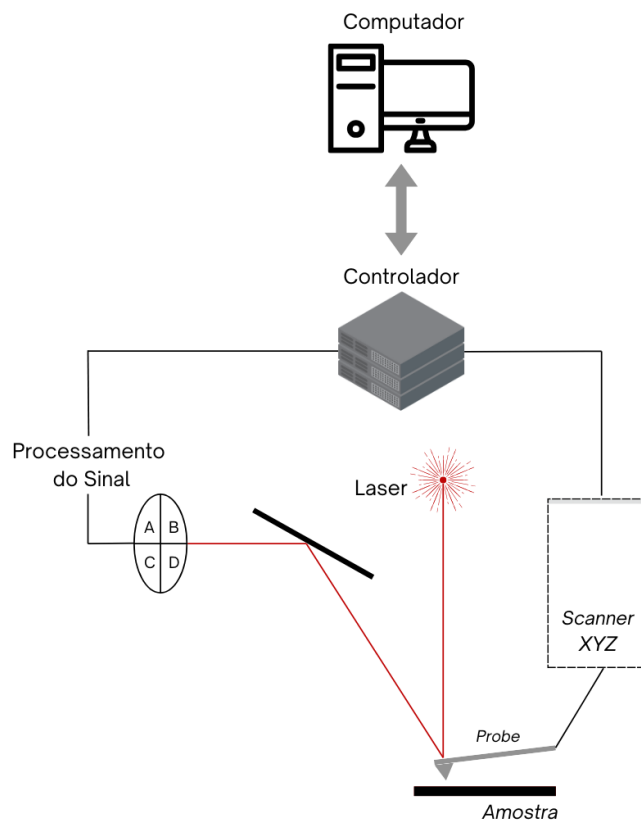


Figura 9. Diagrama esquemático de um microscópio de força atômica. O laser emitido pelo diodo laser é focado na extremidade do cantiléver (ou alavanca). O raio laser refletido é redirecionado para um fotodiodo quadrante. Os movimentos verticais e laterais do cantiléver são detectados pelo fotodiodo. O circuito fechado de *feedback* é implementado no controlador. O computador é usado para configurar parâmetros para o controlador e coletar dados dele para formar imagens.

Além dos sensores piezoelétricos, a utilização da sonda correta é fundamental para se chegar na melhor qualidade de imagem possível. De modo geral, as sondas consistem em um cantiléver com uma ponta afiada em sua extremidade, essa ponta pode ter diferentes tamanhos e formatos dependendo da sua aplicação.⁷⁹ Essas pontas normalmente vão até 30 nm, sendo que o cantiléver podem ter ente 125 a 420 μm de comprimento e 30 a 40 μm de largura.⁷⁹ Essas pontas ainda podem ser desenhadas conforme o modo de operação para que serão utilizadas, os modos de operação da técnica de AFM mais comuns são a pôr contato, o modo *tapping* ou intermitente, e o modo de não-contato.^{79,80}

O modo contato é operado aplicando uma força constante durante todo o escaneamento da imagem.⁷⁹ O modo intermitente por sua vez é caracterizado pela oscilação do cantiléver a uma determinada frequência, essa oscilação é causada por uma pequena peça de matéria piezoelétrico fundido ao suporte da sonda.⁷⁹ Por fim, no modo

não-contato, o interesse está na mensuração precisa da força de interação entre a sonda e a superfície através da oscilação da sonda em sua frequência de ressonância.^{79,80}

2.8. Ensaio de MTT

O ensaio de MTT foi o primeiro ensaio colorimétrico projetado para triagem de alto rendimento da viabilidade celular em um formato de 96 poços.³⁵ O ensaio foi criado para oferecer um substituto não radioativo para a incorporação de timidina tritiada no DNA, em ensaios de proliferação celular.⁸¹ Ganhou amplo uso em laboratórios acadêmicos devido à sua viabilidade econômica e precisão.⁸² Além disso, o ensaio MTT é um método rápido e direto, que elimina a necessidade de etapas de lavagem. Isso o torna extremamente benéfico para a triagem de muitas amostras ao mesmo tempo, servindo para realizar um *screening* inicial de uma substância, visando identificar a faixa de concentração ideal para trabalho.⁸²

O ensaio funciona medindo a redução do MTT amarelo (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, Sigma-Aldrich ref. M5655) em formazan (Figura 10), de coloração púrpura.^{81,82} Para realizar o ensaio, o sal de MTT é introduzido às células em uma concentração de 0,2–0,5 mg/mL e incubado por 1–4 horas. Depois disso, um solvente orgânico (como isopropanol ou dimetilsulfóxido) é adicionado para solubilizar o formazan. A absorbância em 560 nm é então medida usando um espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços. Como a metabolização do sal é diretamente proporcional à taxa metabólica celular, os dados de absorbância possibilitam inferir a mortalidade/viabilidade celular em cada poço analisado.

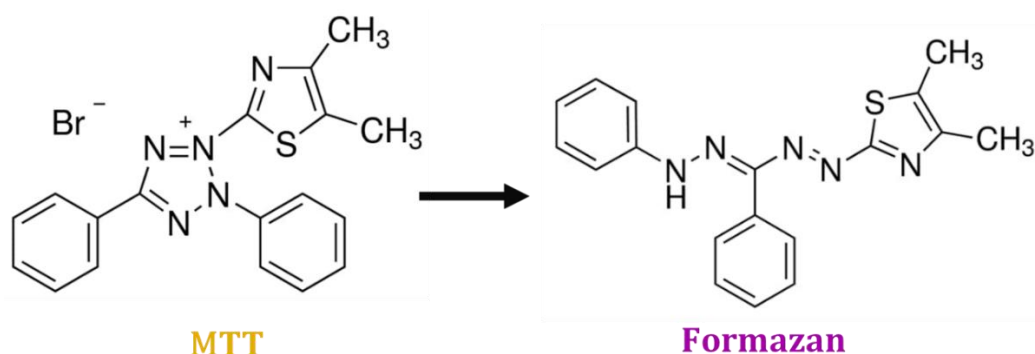


Figura 10. Reação característica do ensaio MTT, no qual o sal de MTT (amarelo), torna-se formazan (roxo púrpura) através da atividade mitocondrial celular.

2.9. Ensaio de LDH

O ensaio com a enzima lactato desidrogenase (LDH) avalia sua liberação extracelular em células que tenham perdido a integridade da membrana.⁸³ A enzima LDH é normalmente encontrada no citoplasma das células e sua redução indica que houve danos à membrana plasmática, desencadeando sua liberação no meio de cultura celular. A LDH extracelular pode ser quantificada por uma reação enzimática acoplada em que a LDH catalisa a conversão de lactato em piruvato via redução de NAD^+ em NADH. A oxidação de NADH pela diaforese leva à redução de um sal de tetrazólio (iodonitrotetrazólio (INT)) a um produto formazan (Figura 11), cuja absorbância pode ser medida em 560 nm. O nível de formação de formazan é diretamente proporcional à quantidade de LDH liberada no meio, o que é indicativo de citotoxicidade causada à integridade da membrana celular.

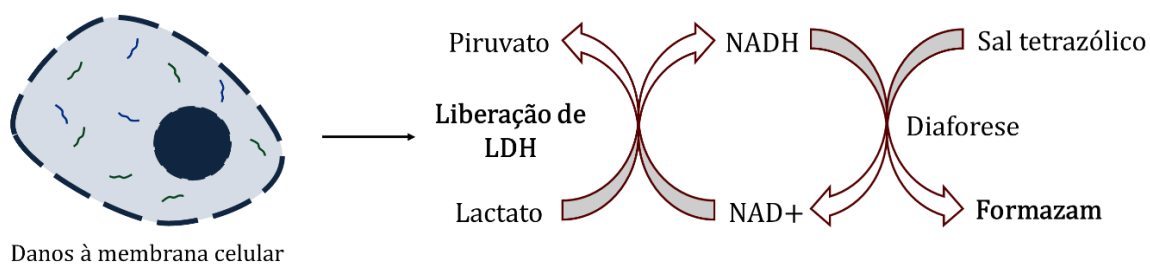


Figura 11. Mecanismo de avaliação da citotoxicidade causada à membrana celular via ensaio de LDH.

2.10. Microscopia de fluorescência confocal

O princípio de funcionamento da iluminação e observação por fluorescência baseia-se na marcação do material de interesse com uma molécula fluorescente.⁸⁴ A amostra é iluminada com luz de comprimento de onda específico para a excitação do marcador. Essa luz é refletida por um espelho dicróico até a amostra. A luz emitida por fluorescência é coletada pela objetiva do microscópio. Em seguida, passa pelo mesmo espelho dicróico e finalmente é separada da luz de excitação através do "filtro de emissão". O princípio de funcionamento da microscopia de fluorescência é exibido na Figura 12a. A microscopia confocal também é baseada na observação por fluorescência. Comparada à microscopia de fluorescência convencional, a microscopia confocal combina iluminação pontual com captação da luz emitida pela amostra através de um orifício (*pinhole*). Essa combinação permite eliminar a luz proveniente de regiões fora do plano focal, deixando a imagem com melhor definição, conforme exibido na Figura 12b. Outra vantagem sobre a microscopia de fluorescência é a capacidade de realizar imagens

em secções ópticas para amostras com maior espessura, possibilitando posterior sobreposição destas imagens para a formação de uma imagem em 3D. Porém, como apenas um ponto na amostra é iluminado por vez, as imagens 2D ou 3D exigem digitalização através de uma varredura pontual, o que faz com que a aquisição de imagens seja mais longa.

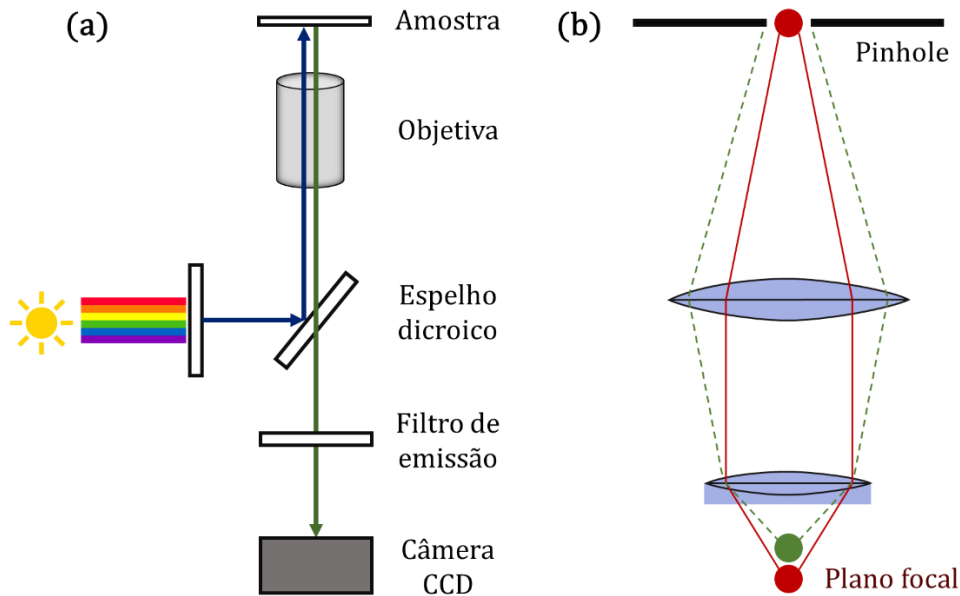


Figura 12. (a) Princípio de funcionamento de um microscópio de fluorescência. (b) Sistema de orifício utilizado na microscopia confocal. A definição de uma imagem no plano focal (vermelho) é aumentada pela eliminação da luz proveniente de regiões fora do plano fora do plano focal (verde).

2.11. Citometria de Fluxo

Em 1936, T. Casperson provou ser possível detectar e quantificar DNA cromossomal e citoplasmático utilizando diferentes comprimentos de onda dentro do UV.⁸⁵ Na década de 1940, Wallace H. Coulter criou uma técnica afim de solucionar a necessidade de contar partículas em suspensão de maneira mais eficiente.⁸⁶ Coulter, um engenheiro e inventor, introduziu o "Princípio de Coulter", capaz de medir as mudanças na resistência elétrica provocadas por partículas que passam através de um pequeno orifício.⁸⁷

Após isso, na década de 1960, O. Casperson conseguiu aplicar uma técnica separada para comparar a distribuição do DNA em células cervicais normais, carcinomas cervicais e em células pré-malignas, representando um avanço nos estudos iniciados pelo seu pai T. Casperson.⁸⁸ Entretanto, o primeiro equipamento mais próximo de um

citômetro de fluxo foi construído em 1951 por Robert Mellors, que construiu um instrumento semi-automático chamado scanner microfluométrico usando luz UV com o objetivo de mensurar a autofluorescência de células que passavam por esse *scanner*.⁸⁸ Foi também Mellors que introduziu o uso de lasers e fluorocromos para a detecção de sinais de fluorescência pelas células.⁸⁸ Esse avanço foi essencial para ampliar as aplicações da citometria de fluxo que atualmente é aplicada para inúmeras áreas como: imunofenotipagem⁸⁹, análise de fluxo de íons, análise de citocinas e engenharia de proteínas.⁸⁸ As vantagens dessa técnica residem na capacidade de realizar análises multiparamétricas⁹⁰ de modo simultâneo por meio de avanços na área óptica e de *softwares* de análise.

A citometria de fluxo (Figura 13) é amplamente utilizada para a análise rápida e detalhada de células ou outras partículas em suspensão. Um passo crítico para garantir resultados confiáveis é a preparação adequada da amostra. As células, que podem estar aderidas ou não a uma superfície, são primeiramente ressuspensas em um fluido apropriado para citometria. Dependendo do objetivo do experimento, as células podem ser marcadas com fluoróforos específicos, que se ligam a moléculas-alvo, permitindo a detecção de diferentes biomarcadores simultaneamente. Após a marcação, as células são conduzidas através de um sistema no qual passam, uma a uma, por uma câmara de fluxo, onde são expostas a feixes de luz gerados por lasers. A interação de cada célula com o feixe de laser resulta na dispersão da luz, que é detectada e analisada com base em dois parâmetros principais: a dispersão frontal (*forward scatter* - FSC), que fornece informações sobre o tamanho celular, e a dispersão lateral (*side scatter* - SSC), que está relacionada à granularidade e complexidade interna da célula. Esses parâmetros, em conjunto com a fluorescência dos marcadores, possibilitam uma análise quantitativa detalhada da população celular.⁹¹

A detecção de fluorescência, além da dispersão de luz, desempenha um papel central na citometria de fluxo, ampliando a capacidade de análise celular. Normalmente, as células são fixadas com fluorocromos conjugados a anticorpos que se ligam a moléculas específicas presentes nas células. Quando estimulados por um laser, esses fluorocromos emitem luz em diferentes comprimentos de onda, que são captados por múltiplos detectores.⁹² A emissão de fluorescência resultante oferece informações cruciais, possibilitando a identificação e quantificação da expressão de proteínas específicas, além de fornecer importantes informações sobre o estado funcional das células, como sua atividade metabólica e se a célula está saudável ou passando por algum

processo de morte celular.⁹³ Os dados de dispersão e fluorescência obtidos são convertidos em sinais elétricos e processados por *softwares* avançados, que quantificam a intensidade dos sinais para distinguir e classificar diferentes populações celulares em uma amostra complexa. Essa capacidade de analisar rapidamente grandes quantidades de células individualmente é vital tanto para a pesquisa biomédica quanto para aplicações clínicas.⁹⁴ Na prática clínica, a citometria de fluxo é indispensável para o diagnóstico e acompanhamento de doenças hematológicas, como leucemias e linfomas, oferecendo avaliações rápidas e precisas das células sanguíneas. Além disso, a técnica é essencial no desenvolvimento e avaliação de terapias imunológicas inovadoras, como o uso de células CAR-T,^{95,96} que são modificadas para atacar células cancerígenas, possibilitando diagnósticos mais rápidos e a otimização de tratamentos, tornando-se uma tecnologia pioneira para se obter avanços na pesquisa e na área de tratamentos médicos.

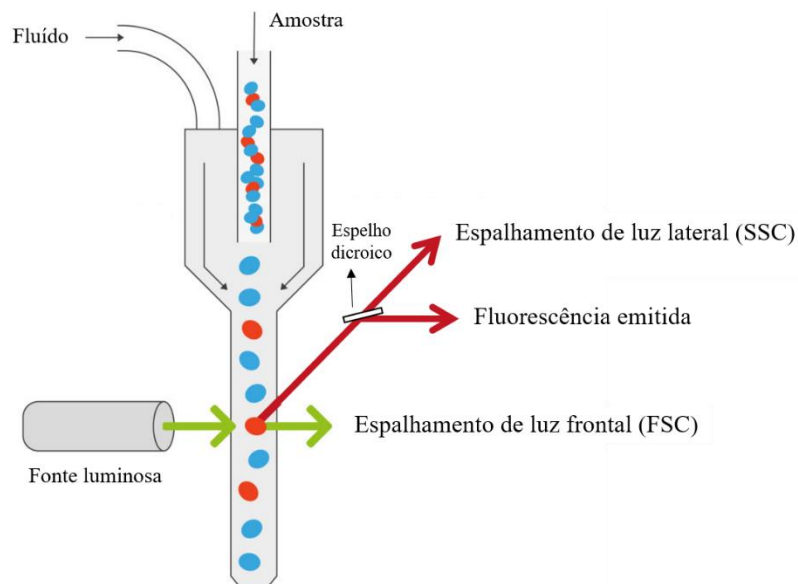


Figura 13. Princípio do funcionamento e um citômetro de fluxo. Adaptado de ⁹⁷.

3. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral contribuir para a área de nanobiotecnologia e para o melhor entendimento das tecnologias empregadas em fototerapias. Os objetivos específicos do projeto incluem:

- i. Fabricar um sistema modelo de membrana celular via filmes de Langmuir, construídos a partir do extrato celular de células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2);
- ii. Determinar os mecanismos moleculares de interação entre o xantênico Rosa de Bengala (RB) e os modelos de membrana fabricados;
- iii. Determinar os efeitos da oxidação lipídica fotoinduzida sobre as propriedades físico-químicas da membrana, desencadeados pela fotoativação do RB;
- iv. Avaliar a eficiência fotodinâmica do RB em cultivo *in vitro* de células Caco-2;
- v. Promover a colaboração com outros grupos de pesquisa nacionais e internacionais para construção de conhecimento multidisciplinar.

Dentre os objetivos propostos inicialmente, todos foram cumpridos. Os resultados e dificuldades enfrentadas serão discutidas nas próximas sessões da dissertação.

CAPÍTULO 2

4. Materiais e Métodos

4.1. Cultivo celular *in vitro*

As células de adenocarcinoma colorretal da linhagem Caco-2 (BCRJ ref. 0059) foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² (SLP ref. 70025 e 70075), incubadas em estufa umedecida a 37°C e 5% de CO₂ em meio RPMI (Gibco™ ref. 31800022), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab ref. 0521-500), antibióticos e antimicóticos (Gibco™ ref. 15240062). A troca do meio de cultura foi feita em dias alternados. O crescimento celular foi acompanhado diariamente através de um microscópio invertido (ECLIPSE TS100, Nikon, Spectron, São Paulo, SP, Brasil) e as manipulações com a cultura de células foram realizadas em uma capela de fluxo laminar.

O cultivo foi feito até as células atingirem uma confluência $\geq 80\%$. As células foram então lavadas com PBS (Sigma-Aldrich ref. P4417), seguida da adição de 1 mL de tripsina (Gibco™ ref. 12604-021) e incubação por 4 minutos em condições de cultivo. Na sequência, adicionou-se 10 mL meio de cultivo para neutralização da tripsina e 20 μ L da suspensão foram utilizados para contagem de células em câmara de Neubauer. A partir do valor obtido, foram realizados os cálculos necessários para os ensaios com o xantênico Rosa de Bengala a fim de avaliar sua toxicidade (sem irradiação) e fototoxicidade (irradiado).

4.2. Fotoativação do Rosa de Bengala incorporado nas células Caco-2

Células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços (5 x 10⁴ células/poço), diluídas em meio RPMI e incubadas por 24 horas em estufa umedecida a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio foi descartado e substituído por 100 μ L de solução de RB (Sigma-Aldrich ref. 330000) diluída em meio DMEM F12 (Sigma-Aldrich ref. D8900-10X1L) nas seguintes concentrações: 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 e 25 x 10⁻⁶ mol/L. Células cultivadas apenas em meio de cultura DMEM F12 foram consideradas 100% viáveis e utilizadas como controle celular (CC). O controle de luz (CL) foi obtido irradiando as células cultivadas na ausência de RB e o controle de morte (CM) foi feito através da adição de peróxido de hidrogênio (50 x 10⁻⁶ mol/L). As placas contendo todos os grupos (tratamento e controle) foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por períodos de 0,5, 3 e 24 horas. Após este período, o metabolismo celular foi avaliado por ensaios de MTT.

Os grupos expostos à luz para fotoativação do RB foram irradiados por 1 hora, com potência de $32,26 \text{ mW/cm}^2$, utilizando um LED BioLambda com comprimento de onda em 525 nm , resultando em uma irradiância de 116 J/cm^2 . Após o tratamento, a solução de RB e meio foram descartados e substituídos por meio DMEM F12 e incubadas por mais 24 horas antes da realização dos ensaios de MTT. Uma imagem obtida por microscopia de campo claro das células em tratamento e do sistema de irradiação utilizado são apresentadas nas Figuras 14a e 14b, respectivamente.

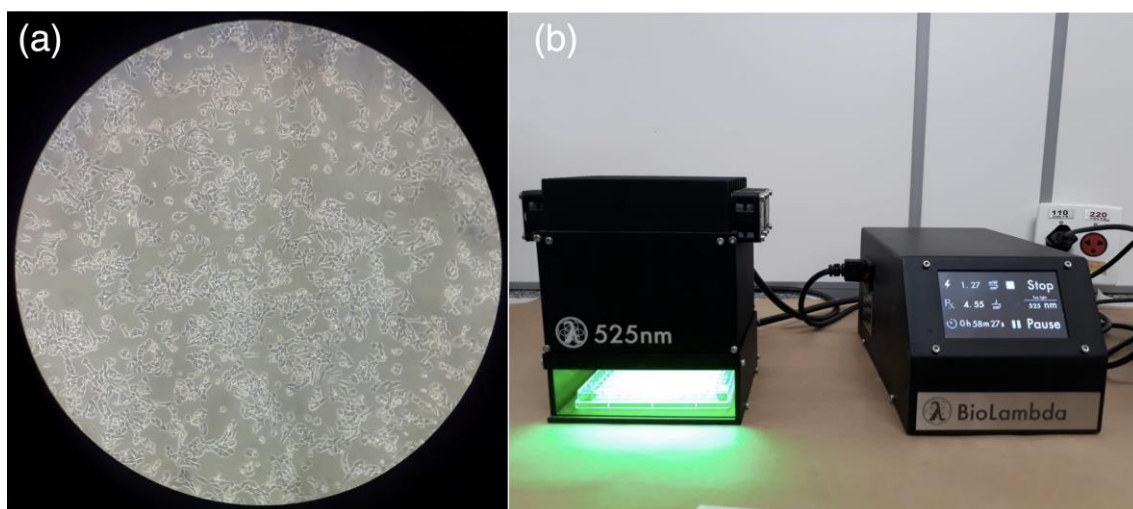


Figura 14. (a) Imagem obtida via microscopia de campo claro do cultivo celular e (b) foto do sistema utilizado para irradiação das células tratadas com fotossensibilizador.

4.3. Ensaios de MTT

Os ensaios de MTT foram realizados após o tratamento da célula Caco-2 com diferentes concentrações de RB (de $0,25$ a $25 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) e diferentes tempos de incubação ($0,5$, 3 e 24 horas). O sal de MTT foi diluído em meio DMEM F12 seguindo a concentração recomendada pelo fabricante ($0,5 \text{ mg/mL}$). O meio com o respectivo tratamento de cada poço foi descartado e substituindo por $100 \mu\text{L}$ da solução de MTT. As células foram então incubadas por 1 hora, quando o meio contendo MTT foi descartado e $50 \mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich ref. D4540-1L) foi adicionado para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância da solução foi mensurada em 560 nm (Multiskan™ FC *Microplate Photometer*, ref. 51119000), específico para coloração resultante da metabolização do sal. Para evitar contribuição do espectro de absorção do RB na leitura do sinal de formazan, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, antes da adição do sal de MTT.

4.4. Ensaio de LDH

A liberação de LDH foi avaliada para as células Caco-2 (3×10^4 /poço) tratadas com diferentes concentrações de RB ($1, 2,5$ e 10×10^{-6} mol/L) diluídas em meio de cultura DMEM F12 juntamente com os seguintes grupos controle: i) apenas em meio de cultura; ii) adição de $10 \mu\text{L}$ de água ultrapura filtrada aos $100 \mu\text{L}$ de meio DMEM F12 para liberação espontânea de LDH; e iii) adição de $10 \mu\text{L}$ do tampão de lise 10x, para a máxima liberação de LDH. O ensaio foi realizado utilizando o kit *CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay* (ref C20301, Invitrogen, ThermoFisher). Ao final do tempo de exposição celular e fotoativação, $50 \mu\text{L}$ do meio sobrenadante de cada poço foram transferidos para outra placa e receberam $50 \mu\text{L}$ da mistura de reação (54×10^{-3} mol/L L(+) lactato, $0,66 \times 10^{-3}$ mol/L cloreto de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil tetrazólio, $0,28 \times 10^{-3}$ mol/L metossulfato de fenazina, e $1,3 \times 10^{-3}$ mol/L NAD $0,2$ mol/L tampão Tris, pH 8.2). Após 30 minutos de incubação, foram adicionados, em cada poço, $50 \mu\text{L}$ da solução de parada. A absorbância foi medida através do leitor de placa Multiskan™ FC e a porcentagem de LDH liberado será obtida através da fórmula:

$$\% \text{ LDH liberada} = \frac{[(\text{Tratamento RB}) - (\text{Liberação espontânea})]}{[(\text{Liberação máxima}) - (\text{Liberação espontânea})]} \times 100$$

4.5. Microscopia de fluorescência e confocal

A marcação celular foi mediada por dois fluoróforos, WGA Alexa Fluor® 488 (*Wheat Germ Agglutinin Conjugates with Alexa Fluor® 488*; Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA, ref. W11261) e DAPI (4,6- diamidino- 2- phenylindole; Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA, ref. R37606). O WGA Alexa Fluor® 488 possui afinidade à membrana celular e, quando excitado em 495 nm, emite fluorescência na região do verde, caracterizando então a membrana das células. O DAPI liga-se ao DNA, emitindo fluorescência na região do azul ao ser excitado no comprimento de onda de 358 nm, demarcando assim o núcleo celular. O FS RB foi excitado em 525 nm, emitindo fluorescência na região do vermelho, caracterizando a região celular na qual foi incorporada. As imagens foram adquiridas utilizando o microscópio confocal (Eclipse Ti-E C2-C2SI, Nikon), disponível na FCT/UNESP de Presidente Prudente.

As células Caco-2 (3×10^5 / poço), diluídas em meio de cultivo DMEM F12, foram semeadas em placas de 24 poços previamente preparadas, com a presença de lamínulas,

e incubadas por 24 horas a 37 °C para atingirem confluência $\geq 80\%$. O FS RB foi então adicionado e posteriormente incubado por 24 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante foi retirado para adição de 400 μL do corante de membrana WGA Alexa Fluor® 488 (5×10^{-6} g/ml). Após 10 minutos, o excesso de WGA Alexa Fluor® 488 foi retirado e os poços foram lavados com PBS, por no mínimo 4 vezes. Na sequência, as lamínulas foram retiradas do poço, sobre as quais 5×10^{-6} L de DAPI foram adicionados. Após o período de secagem, as lamínulas foram finalizadas com base incolor de unha (Risque) e mantidas na geladeira até realização do experimento.

4.6. Citometria de Fluxo

O processo de determinação da via de morte celular foi avaliado para tanto as células que não foram expostas à radiação quanto as que foram, por meio da técnica de citometria de fluxo. Células foram diluídas em um meio de cultivo e distribuídas em placas de cultura com 24 poços (1×10^5 células por poço), sendo incubadas a 37°C por 24 horas até alcançarem 80% de confluência. Em seguida, foram adicionados 0,25, 1 e 10×10^{-6} mol/L de RB ao meio de cultura, com incubação subsequente de 3 e 24 horas. Após a incubação, para o grupo irradiado, a irradiação foi realizada utilizando um LED BioLambda com comprimento de onda em 525 nm e potência de 32,26 mW/cm² (dose de luz: 116 J/cm²).

A análise por citometria de fluxo foi conduzida utilizando um equipamento BD Accuri/C6 Plus Cytometer (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA), em conjunto com o kit de Apoptose/Necrose (*Annexin V Alexa Fluor® 488 e Propidium Iodide (PI)/Dead Cell*; referência V13245, *Invitrogen*), seguindo as instruções do fabricante. As células foram tratadas com tripsina (5 minutos a 37°C), suspensas e transferidas para tubos de citometria. Posteriormente, após centrifugação, as células foram ressuspensas em 400 $\times 10^{-6}$ L de um tampão de ligação para Anexina V (1X; 50×10^{-3} mol/L de HEPES, 100×10^{-3} mol/L de NaCl e $12,537 \times 10^{-3}$ mol/L de CaCl₂) e incubadas por 15 minutos com 5 $\times 10^{-6}$ L de Alexa Fluor® 488 de Anexina V (25×10^{-3} mol/L de HEPES, 140×10^{-3} mol/L de NaCl, 10^{-3} mol/L de EDTA). Finalmente, foi adicionado 10^{-6} L de Iodeto de Propídeo (PI).

As células foram categorizadas como necróticas na ausência de sinal da Anexina V Alexa Fluor® 488 e presença de sinal do PI. No caso de apoptose, a classificação foi atribuída quando as células exibiam sinal para Anexina V Alexa Fluor® 488 e ausência

de sinal para PI. Células foram consideradas viáveis quando não havia marcação dupla, enquanto estágio tardio de apoptose foi designado para aquelas que apresentavam dupla marcação positiva. Adicionalmente, um controle com RB foi conduzido para avaliar o impacto da fluorescência na análise dos resultados.

4.7. Extrato celular de células Caco-2

O extrato celular das células Caco-2 foi obtido adaptando protocolos anteriores.^{98,99} As células Caco-2 foram destacadas do frasco de cultura e transferidas para um tubo Falcon. Em seguida, as amostras foram centrifugadas utilizando uma centrífuga (Rotina 380 R, Tuttlingen, Alemanha) a 1500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, deixando o pellet de células no fundo do tubo. A este pellet, foi adicionado 1 mL de água ultrapura, e a mistura foi agitada em vórtex por 10 minutos. Após a agitação, 4 mL de clorofórmio foram adicionados à solução, que foi novamente agitada por mais 10 minutos. A mistura resultante foi sonicada por 30 minutos e, em seguida, submetida a uma nova centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. Esse processo gerou três fases distintas: uma fase superior contendo componentes solúveis em água, uma fração intermediária com a massa celular, e uma fase inferior rica em fragmentos lipídicos solúveis em clorofórmio. A fase inferior, contendo os lipídios extraídos das células Caco-2, foi cuidadosamente transferida para um frasco âmbar e armazenada a -20 °C.

4.8. Filmes Langmuir do extrato celular de Caco-2

Filmes de Langmuir foram preparados em uma cuba de Langmuir (KSV-NIMA/KN 2002) espalhando uma solução de extrato celular de Caco-2 em PBS ou PBS contendo RB a 1, 10 e 25 x 10⁻⁶ mol/L. O extrato celular espalhado foi deixado em repouso por 10 minutos para garantir a completa evaporação do clorofórmio. O material remanescente na interface ar-líquido foi então submetido a compressão simétrica usando barreiras móveis, com uma taxa de compressão de 3,75 cm²/min. Isotermas de pressão superficial (π) versus área (A) superficial foram obtidas pelo método de Wilhelmy, usando uma haste de platina. A área nas isotermas serão apresentadas como área por mL de extrato, em vez da área molecular tradicional, pois a composição exata do extrato não é conhecida. A temperatura da subfase foi mantida a 21°C com um banho termostático (SSDu-10L, SolidSteel, Piracicaba, Brasil). Embora lipídios insaturados expostos ao ar

possam resultar em mudanças na pressão superficial devido à oxidação dos lipídios, nenhuma precaução foi tomada aqui para evitar a oxidação. No entanto, as isotermas foram reprodutíveis, com variações de pressão superficial dentro de 2 mN/m. O módulo de compressibilidade das monocamadas (C_S^{-1}) foi determinado a partir das isotermas π -A aplicando a equação $C_S^{-1} = -A(\partial\pi/\partial A)$.

Os efeitos do RB na estabilidade da monocamada de Caco-2 foram investigados a uma pressão superficial fixa de 30 mN/m, enquanto se monitorava a área superficial ao longo de uma observação de 2 horas. A escolha dessa pressão superficial foi baseada na literatura, segundo a qual a pressão lateral nas membranas plasmáticas de células eucarióticas é em torno de 30 mN/m.¹⁰⁰ Testes de estabilidade foram conduzidos em monocamadas de extrato celular de Caco-2 em subfases de PBS ou RB. De maneira similar, testes foram conduzidos em monocamadas de extrato celular de Caco-2 em subfases de RB fotoativado, onde a irradiação começou assim que a monocamada atingiu uma pressão de 30 mN/m. Para isso, um sistema de irradiação LED (a 525 nm) da BioLambda (32,26 mW/cm²; São Paulo, Brasil) foi empregado, posicionado 20 cm acima da cuba de Langmuir com um ângulo de 30°. O comportamento dinâmico do sistema foi caracterizado monitorando-se mudanças dependentes do tempo na área relativa média.

Medições de espectroscopia de absorção-reflexão infravermelha modulada por polarização (PM-IRRAS, KSV PMI550) foram realizadas com um ângulo de incidência de 81° e uma resolução de 8 cm⁻¹ para avaliar as interações moleculares entre monocamadas de extrato celular de Caco-2 e RB. Os espectros de PM-IRRAS foram obtidos de monocamadas de extrato celular de Caco-2 em PBS e PBS contendo RB (25 x 10⁻⁶ mol/L), a uma pressão superficial constante de 30 mN/m. Para monocamadas irradiadas, os espectros de PM-IRRAS foram prontamente adquiridos após o período de irradiação de 20 minutos, realizado com uma fonte de LED (50 W de potência). A reprodutibilidade espectral foi garantida pela condução de pelo menos três experimentos para cada condição. Portanto, modificações na posição das bandas e/ou intensidade relativa não derivaram de dispersão espectral, mas sim de interações entre a monocamada de extrato celular de Caco-2 e RB. As imagens de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) foram obtidas usando um elipsômetro de imagem I-Elli2000 (I-Elli2000, Nanofilm Technologies) acoplado a uma cuba de Langmuir (Nima Technology). Este instrumento está equipado com um laser Nd de 50 mW ($\lambda = 532$ nm), e as imagens foram obtidas usando uma lente de ampliação de 20× com resolução lateral de 1 μ m e ângulo de incidência de 53,15°. As monocamadas foram comprimidas a uma taxa de 5 cm²/min.

A Microscopia de Força Atômica (AFM) foi usada para obter imagens dos filmes lipídicos de Caco-2 em PBS e RB (25×10^{-6} mol/L). Os filmes foram transferidos para substratos de mica (qualidade V1, da *Electron Microscopy Sciences*) usando a técnica de deposição Langmuir–Blodgett (LB) da interface ar/líquido. Neste método, uma folha de mica recém-cortada foi imersa na subfase antes da dispersão do lipídio. Subsequentemente, o substrato foi retirado da subfase a uma taxa controlada de 3,75 cm²/min, mantendo a pressão superficial constante a 15 ou 30 mN/m. Um microscópio *Bruker Multimode 8HR Nanoscope 9.7 (Digital Instruments, Santa Barbara, CA)* foi usado para adquirir as imagens de AFM na interface ar-sólido em condições ambientais. As imagens foram capturadas usando o modo de *tapping*, a uma taxa de varredura de 0,3-1 Hz, empregando uma sonda SCANASYST-AIR (com uma alavanca de nitreto de silício, frequência de ressonância de 70 kHz, constante de mola nominal de 0,4 N/m e raio de ponta de 2 nm). A análise das imagens foi conduzida usando o *software Nanoscope versão 2.0*.

4.9. Tratamento de dados

Os dados experimentais de citotoxicidade e fototoxicidade foram analisados com os *softwares* Microsoft Excel®, Origin® e GraphPad Prism® 8 e avaliados com análise de variância (*one-unpaired multiple t test*), seguido de correção de Bonferroni, utilizando nível de significância $p \leq 0,05$. Todos os testes foram realizados em triplicata. Para a concepção dos esquemas ilustrativos e de fórmulas estruturais foram utilizados os *softwares* Adobe Illustrator 2020® e ChemDraw 19.0®.

CAPÍTULO 3

5. Resultados e Discussão

5.1. Determinação da toxicidade e fototoxicidade do RB

5.1.1. Ensaios de MTT

Com o objetivo de avaliar se o tempo de exposição ao fotossensibilizador (FS) tem influência sobre os efeitos tóxicos e fototóxicos, foram conduzidos ensaios de MTT em três períodos de incubação com RB, 0,5, 3 e 24 h. As concentrações de RB estudadas variaram de 0,25 a 25 x 10⁻⁶ mol/L, todas expostas a mesma dose de luz (116 J/cm²) em 525 nm. Após 24 h da irradiação, o ensaio de MTT foi realizado e os resultados obtidos são apresentados na Figura 15a, 15b e 15c para os períodos de incubação de 0,5, 3 e 24h, respectivamente. O cálculo da concentração de RB necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (CC₅₀), foi realizado via uma regressão não-linear dos dados de cada um dos períodos de incubação.

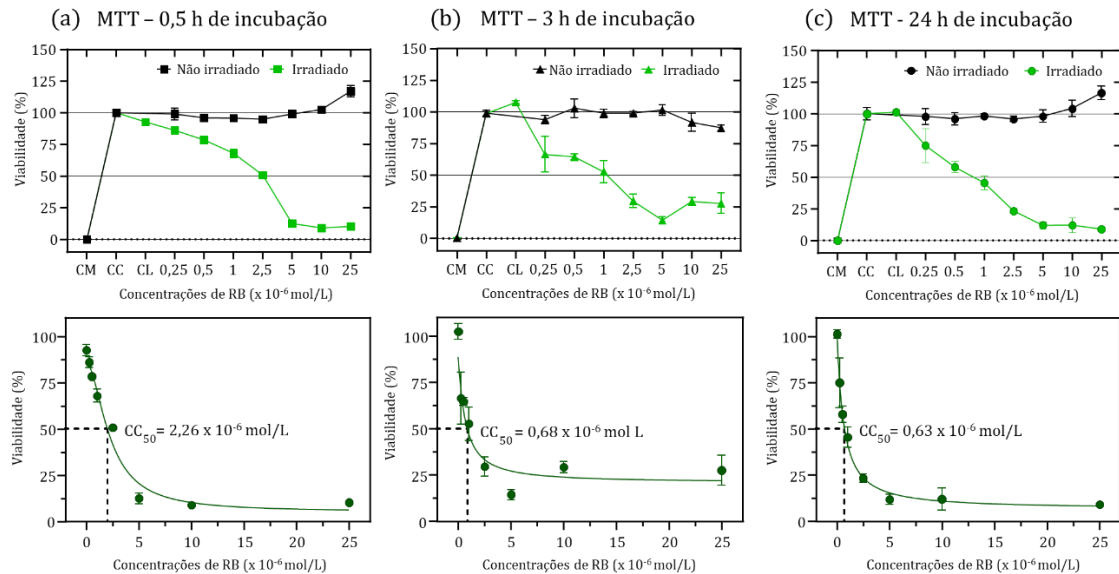


Figura 15. Efeitos tóxicos (preto) e fototóxicos (verde) do FS RB em cultivo in vitro de células Caco-2, mensurados em ensaios de MTT. A viabilidade celular foi determinada para células incubadas por (a) 0,5, (b) 3 e (c) 24 h com diferentes concentrações e o cálculo de CC₅₀ feito através de regressão não-linear.

As diferentes concentrações de RB (0,25 a 25 x 10⁻⁶ mol/L) incubadas no escuro (não irradiadas) por 0,5, 3 e 24 h não afetaram de maneira significativa a viabilidade do cultivo celular, sugerindo baixa toxicidade do FS nestas condições. A viabilidade só diminuiu de maneira significativa em presença de luz, dependendo das concentrações de RB e dos períodos de incubação. A capacidade do RB de produzir espécies reativas de

oxigênio (EROs), especialmente o $^1\text{O}_2$, é a justificativa para sua fototoxicidade, uma vez que essas espécies desencadeiam reações oxidativas nas células que as levam à morte.¹⁰¹ Ao considerar o período de incubação de 0,5 h, a concentração de RB necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (CC₅₀) foi de $2,26 \times 10^{-6}$ mol/L. No entanto, para os períodos de incubação de 3 e 24 h, essa concentração foi reduzida para $0,68$ e $0,63 \times 10^{-6}$ mol/L, respectivamente, evidenciando que o efeito terapêutico é influenciado pelo tempo de exposição ao FS. A tendência de diminuição da viabilidade com o aumento da concentração de RB é observada para todos os períodos de incubação até a concentração de 5×10^{-6} mol/L, a partir da qual a viabilidade celular se estabiliza em valores próximos a 10%. A dependência dos efeitos fototóxicos com as concentrações de RB e os diferentes períodos de incubação deve estar relacionada aos mecanismos de incorporação do FS às células, o que abordaremos a partir de experimentos de citometria de fluxo e filmes de Langmuir. De fato, trabalhos anteriores com o xantênico eritrosina demonstraram que o aumento do tempo de incubação resulta em uma diminuição do CC₅₀, indicando uma maior incorporação do FS com o passar do tempo.²⁵ Outro exemplo é o estudo de Sztandera *et al.*¹⁰² que observou uma redução menor na viabilidade celular com a incorporação de RB em células Caco-2 usando uma concentração de 5×10^{-6} mol/L de RB, uma incubação de 5 h e 30 min de irradiação, levando a uma diminuição de 50% na viabilidade celular.

De modo geral, a aplicação do RB na TFD não segue um padrão, uma vez que os parâmetros experimentais utilizados nos estudos são variáveis, dificultando a comparação direta com os resultados obtidos. Em um estudo realizado por McEwan *et al.*¹⁰³, o RB foi testado em células de melanoma murino na concentração de $0,5 \times 10^{-6}$ mol/L. As células foram incubadas com RB por 3 h e irradiadas com luz branca por 30 e 60 segundos, resultando em uma dose de luz total de $11,4$ e $22,8 \text{ J/cm}^2$, respectivamente. Para essas condições, houve uma redução de cerca de 20% e 30% na viabilidade celular para a menor e maior dose de luz, respectivamente. Dhillon *et al.*¹⁰⁴ realizou um trabalho semelhante utilizando concentrações de RB entre $0,05$ e 1×10^{-6} mol/L em quatro linhagens distintas de câncer, a B16-F10-Luc2 (melanoma), MCF-7 (câncer de mama), Panc-01 (câncer de pâncreas) e HeLa (câncer cervical). As células foram incubadas com RB durante 3 h, seguidas de irradiação com uma dose de luz branca de $22,8 \text{ J/cm}^2$. A diminuição da viabilidade celular observada para a concentração máxima (1×10^{-6} mol/L) foi de cerca de 30% para a B16-F10-Luc2, 20% para a MCF-7, 35% para Panc-01 e de 40% para HeLa. Por outro lado, no estudo realizado por Uppal *et al.*¹⁰⁵, a fotoativação de RB em

câncer oral (linhagem 4451) e de mama (linhagem MCF-7), incubado por um período 4 h e fotoativado com luz branca (dose de luz não mencionada), resultou em uma redução de cerca de $50 \pm 5\%$ (para a 4451) e $15 \pm 10\%$ (para a MCF-7) na viabilidade celular utilizando uma concentração de 24×10^{-6} mol/L.

A Tabela 1 sumariza os principais resultados reportados na literatura e nesta dissertação. Com base nestes dados, é possível que a eficácia da TFD utilizando RB esteja condicionada à linhagem celular, uma vez que os mecanismos de incorporação do FS podem variar entre diferentes tipos de células. Até o momento, não foram encontrados estudos na literatura que tenham utilizado o RB em células Caco-2. No entanto, para essa linhagem celular, o tratamento com RB demonstrou ser mais eficaz do que o tratamento estudado por Şueki *et al.*¹⁰⁶, que utilizou um precursor de porfirinas 5-ALA em conjunto com curcumina como potenciais FS, resultando em uma redução de viabilidade de 62,4% com uma concentração de 25×10^{-6} mol/L.

Tabela 1. Relação de estudos que aplicaram o FS RB na TFD utilizando diferentes condições e linhagens celulares.

| Estudo | Linhagem celular | Período de incubação | Fonte de luz | Dose de luz (J/cm ²) | Redução na viabilidade celular |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------------|---|
| Presente Dissertação | Caco-2 | 0,5, 3 e 24 h | LED de 525 nm | 116 | Aproximadamente 91% com 24 h de incubação |
| McEwan <i>et al.</i> | B16-F10-Luc2 | 3 h | Luz branca | 11,4 e 22,8 | Aproximadamente 30% para irradiância de 22,8 J/cm ² |
| Dhillon <i>et al.</i> | B16-F10-Luc2, MCF-7, Panc-01 e HeLa | 3 h | Luz branca | 22,8 | Aproximadamente 30% para a B16-F10-Luc2, 20% para a MCF-7, 35% para Panc-01 e de 40% para HeLa. |
| Uppal <i>et al.</i> | 4451 e MCF-7 | 4 h | Luz branca | não definida | Aproximadamente 50% para a 4451 e 15% para a MCF-7 |
| Sztandera <i>et al.</i> | Caco-2, HT-29, HepG2 e Hep3B | 5h | Lâmpada Q. Light Pro Unit | 72 | CC ₅₀ de 19,84, 20,64, 5,03 e 2,75 para Caco-2, HT-29, HepG2, e Hep3B, respectivamente |

5.1.2. Ensaio de LDH

Com o objetivo de complementar os resultados de MTT, foram realizados ensaios de LDH, um método para avaliar a toxicidade através da mensuração da toxicidade na membrana celular, baseado na liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) para o meio extracelular em decorrência de danos na membrana. As concentrações de 0,25 , 1 e 10×10^{-6} mol/L foram incubadas por 3 h para a realização destes ensaios. Essas condições foram selecionadas com base nos dados de MTT, os quais indicaram que as concentrações escolhidas resultam em uma redução leve, moderada e acentuada na viabilidade celular quando irradiadas, respectivamente. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 16.

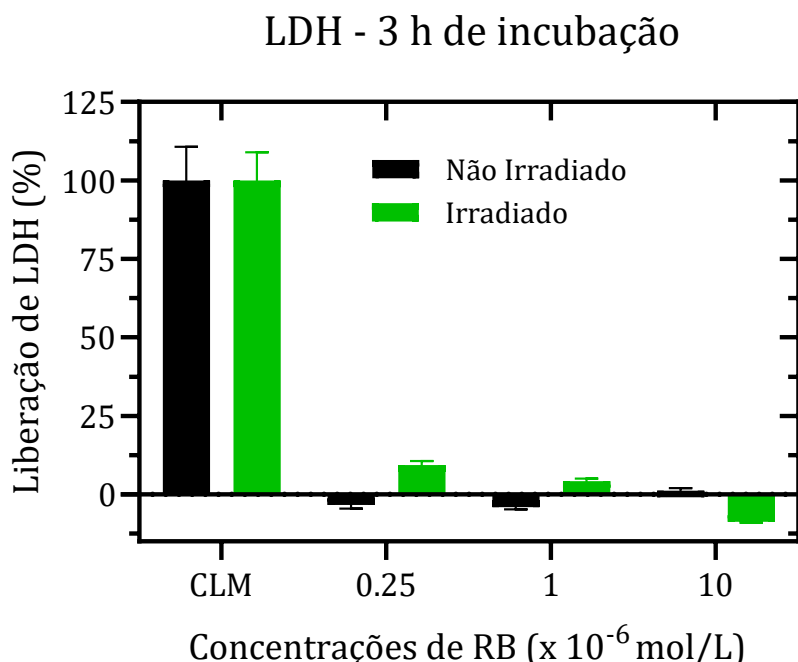


Figura 16. Liberação de LDH para diferentes concentrações de RB considerando um período de incubação de 3 h. CLM é o controle positivo de liberação máxima de LDH.

Os níveis de liberação de LDH observados nos grupos não irradiados foram próximos a 0%, indicando que houve pouco ou nenhum dano à membrana celular. Esse resultado está em concordância com os ensaios de MTT, os quais não demonstraram efeitos tóxicos significativos, confirmando uma viabilidade celular próxima a 100%. Entretanto, mesmo em concentrações de 1 e 10×10^{-6} mol/L, que apresentaram elevada mortalidade celular mensurada por MTT, não foi observada liberação de LDH nos grupos irradiados, o que não era esperado. Tomados em conjunto, esses resultados indicam uma alta taxa de mortalidade celular provocada pela irradiação do RB (MTT para 1 e 10×10^{-6}

⁶ mol/L), sem causar danos significativos à membrana celular que possam resultar no extravasamento do LDH. A princípio, esses resultados parecem contraditórios pois (i) não encontramos evidências na literatura que corroborassem com esses efeitos e (ii) em trabalhos anteriores envolvendo outros derivados xantênicos a eficiência fotodinâmica esteve diretamente relacionado aos danos causados à membrana celular.^{25,98}

A fim de descartar possíveis artefatos experimentais que possam ter afetado os resultados para os grupos irradiados, experimentos subsidiários foram realizados para verificar a possibilidade do LDH liberado estar sendo degradado neste período de 24 h entre o tratamento e o ensaio. Contudo, os experimentos realizados logo após a irradiação do sistema também não mostraram aumento nos níveis de LDH extravasado. Portanto, antes de concluir que não há permeabilização celular, experimentos adicionais de citometria de fluxo (detalhes na seção 5.3.) foram realizados.

5.2. Alterações morfológicas induzidas pela incorporação e fotoativação do RB

Assim como para os ensaios de LDH, as microscopias confocais foram realizadas para o período de 3 h de incubação e as concentrações de 0,25, 1 e 10×10^{-6} mol/L. As imagens obtidas são exibidas na Figura 17, para os grupos não irradiados (Figuras 17a a 17d) e irradiados (Figuras 17e a 17h). Para o grupo não irradiado observou-se a manutenção da morfologia das células, independente da concentração de RB, o que é consistente com a ausência de toxicidade nessa faixa de concentração. Na maior concentração de RB (10×10^{-6} mol/L) foi possível detectar a fluorescência do RB, especialmente na região das membranas celulares. Esse é um indicativo de que a interação RB – membrana plasmática deve desempenhar um papel importante nos mecanismos de incorporação celular, o que será abordado com os filmes de Langmuir. Além disso, a fluorescência do RB reforça a hipótese levantada pelos dados de MTT, de que o aumento da concentração de RB está diretamente relacionado ao aumento da quantidade de moléculas incorporadas pelas células. Bistaffa *et al.*^{25,98} investigaram os efeitos da eritrosina em células HEp-2 e MCF-7 e também não observaram mudanças morfológicas significativas para os grupos não irradiados. A incorporação da eritrosina nessas células foi detectada apenas a partir da concentração de 10×10^{-6} mol/L, principalmente na região da membrana. No entanto, a intensidade do sinal para essa concentração foi menor do que a observada na Caco-2 com RB, sugerindo uma maior incorporação do RB.

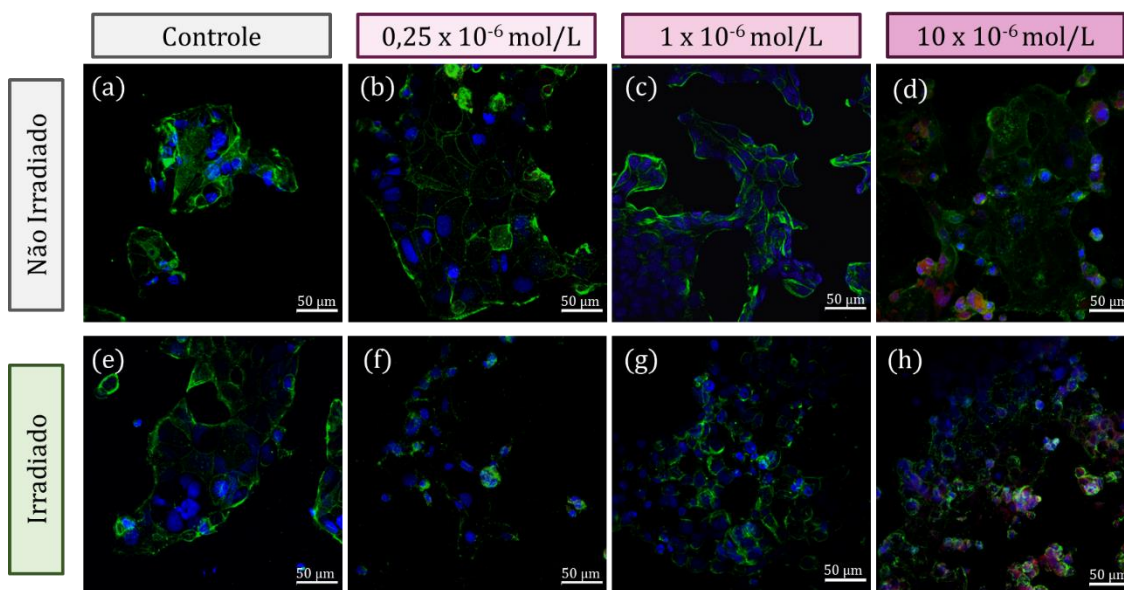


Figura 17. Microscopia de fluorescência confocal de células Caco-2 incubadas por 3 h com $0,25$, 1 e 10×10^{-6} mol/L de RB não irradiadas e após irradiação. A membrana celular (verde) foi marcada com WGA Alexa Fluor® 488 enquanto o núcleo (azul) com DAPI. A fluorescência do RB foi registrada em 620 nm (vermelho).

Ao observar os grupos irradiados, é possível notar uma alteração morfológica significativa que aumenta com as concentrações de RB. Na concentração de $0,25 \times 10^{-6}$ mol/L de RB observa-se uma mudança na marcação da membrana que se repete nos grupos de concentrações superiores. Na concentração de 10×10^{-6} mol/L, assim como no grupo não irradiado, foi possível identificar a fluorescência do RB. No entanto, a presença de RB neste grupo foi mais difusa em comparação ao grupo não irradiado, o que pode sugerir uma possível permeação e interiorização do FS na célula. Além das mudanças observadas na marcação da membrana celular, foi observada também modificações no tamanho dos núcleos das células. Para a análise desse parâmetro, foram medidas as dimensões do núcleo de 40 células usando o *software* ImageJ® e, em seguida, foi calculada a média e o desvio padrão para cada grupo. Na Figura 18 são apresentados os resultados obtidos, os quais indicam que houve uma redução significativa ($p < 0,05$) no tamanho dos núcleos em todas as concentrações de RB irradiadas comparadas a população não irradiada.

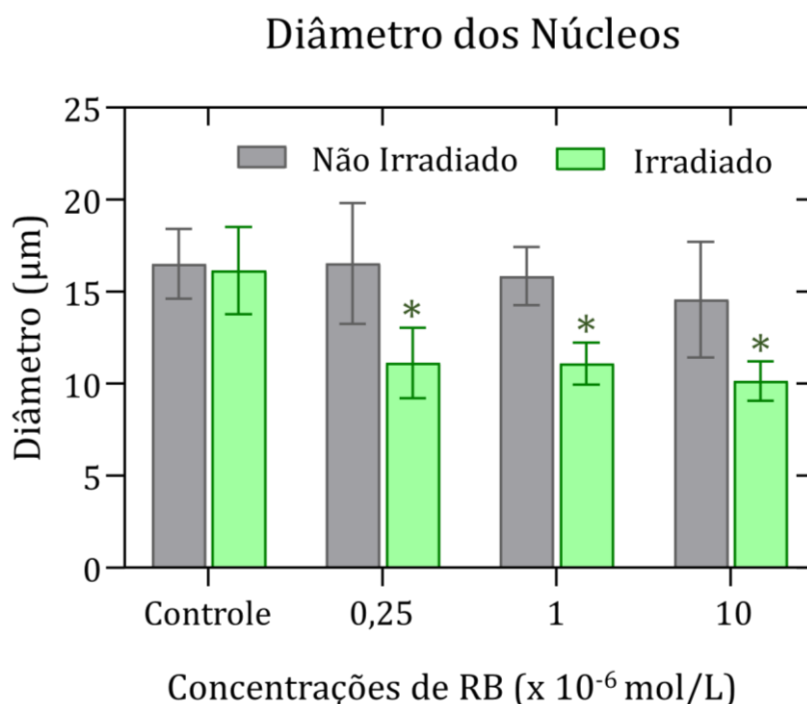


Figura 18. Valores médios do diâmetro dos núcleos celulares da Caco-2 antes e após irradiação. Aproximadamente 40 células foram contadas para cada grupo utilizando o *software* ImageJ®. * $p < 0.05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação a população não irradiada.

O conjunto de mudanças na morfologia da Caco-2 são indicativos de que processos apoptóticos e necróticos possam ter sido desencadeados pelo estresse oxidativo gerado pela irradiação. A diminuição dos núcleos pode estar relacionada a processos apoptóticos, caracterizados principalmente pela compactação do citoplasma, condensação da cromatina e fragmentação do DNA.¹⁰⁷ Por outro lado, as modificações sobre a membrana plasmática podem resultar em permeabilização, o que é consistente com processos de necrose.^{25,108} Em trabalhos anteriores utilizando eritrosina observamos a ativação de apoptose tardia e necrose nas células HEP-2 e principalmente apoptose nas células da linhagem MCF-7.^{25,98} Esses resultados indicam que os mecanismos de morte celular ativados podem variar de acordo com a linhagem celular estudada, ainda que para o mesmo FS. Buscando complementar os dados de MTT, LDH e de microscopia confocal, medidas de citometria de fluxo foram realizadas para determinar as rotas de morte celular fotoinduzidas pelo RB nas células Caco-2.

5.3. Mecanismos de morte celular desencadeados pela fotoativação do RB

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para dois propósitos distintos. A primeira a fim de investigar a incorporação do RB nas células via captura do sinal de fluorescência emitida pelo FS e a segunda visando a mensuração da viabilidade celular após a TFD e identificação das rotas de morte celular ativadas pela terapia. Os dados relacionados à incorporação do RB estão apresentados na Figura 19, onde é demonstrado um aumento progressivo na fluorescência detectada pelo canal FL3 (excitação a 488 nm e filtro de 670 LP), o mesmo utilizado para a detecção do iodeto de propídeo (PI). Observa-se que, à medida que a concentração de RB aumenta, a incorporação nas células também se eleva. Esse resultado confirma as observações feitas nas imagens de microscopia, especialmente nas Figuras 17d e 17h, que também evidenciam essa relação dose-dependente. No entanto, a fluorescência gerada pelo RB comprometeu os dados de citometria de fluxo para o grupo tratado com 10×10^{-6} mol/L de RB, inviabilizando a apresentação desses resultados.

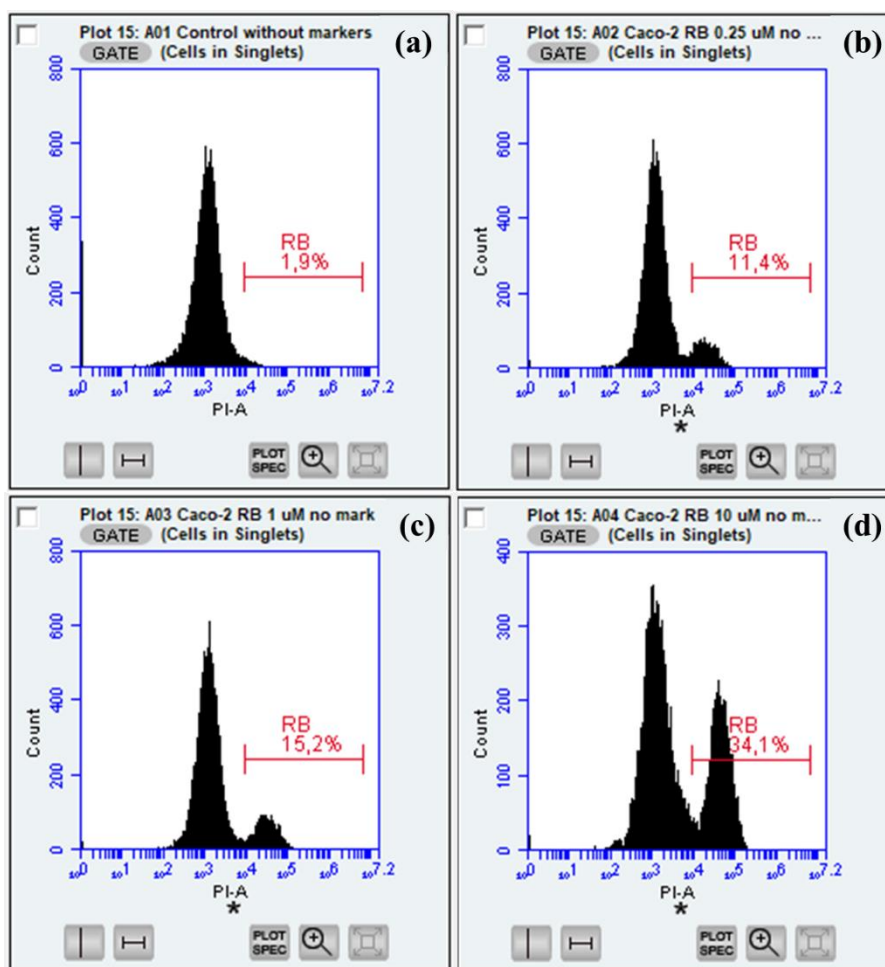


Figura 19. Análise da incorporação do RB através da citometria de fluxo observando o canal FL3 (excitação com laser 488 nm e filtro de 670 LP) para (a) controle, (b) 0,25, (c) 1 e (d) 10×10^{-6} mol/L de RB não-irradiados após 3 h de incubação.

Para determinar as vias de morte celular ativadas, a apoptose e a necrose foram avaliadas usando o protocolo de coloração dupla de Anexina V Alexa Fluor[®] 488 / PI após 3 h de incubação com 0,25 e 1 x 10⁻⁶ mol/L de RB (Figura 20). Em células apoptóticas, as fosfatidilserinas translocam-se para a membrana externa, permitindo a ligação da Anexina V Alexa Fluor[®] 488, enquanto as células necróticas expõem o material nuclear, que se liga ao PI. As células viáveis são identificadas pela ausência de fluorescência (duplo-negativo), células apoptóticas iniciais pela coloração Anexina V Alexa Fluor[®] 488-positiva/PI-negativo, células necróticas pela coloração PI-positiva/Anexina V Alexa Fluor[®] 488-negativa e células apoptóticas tardias pela fluorescência duplo-positiva.^{109,110}

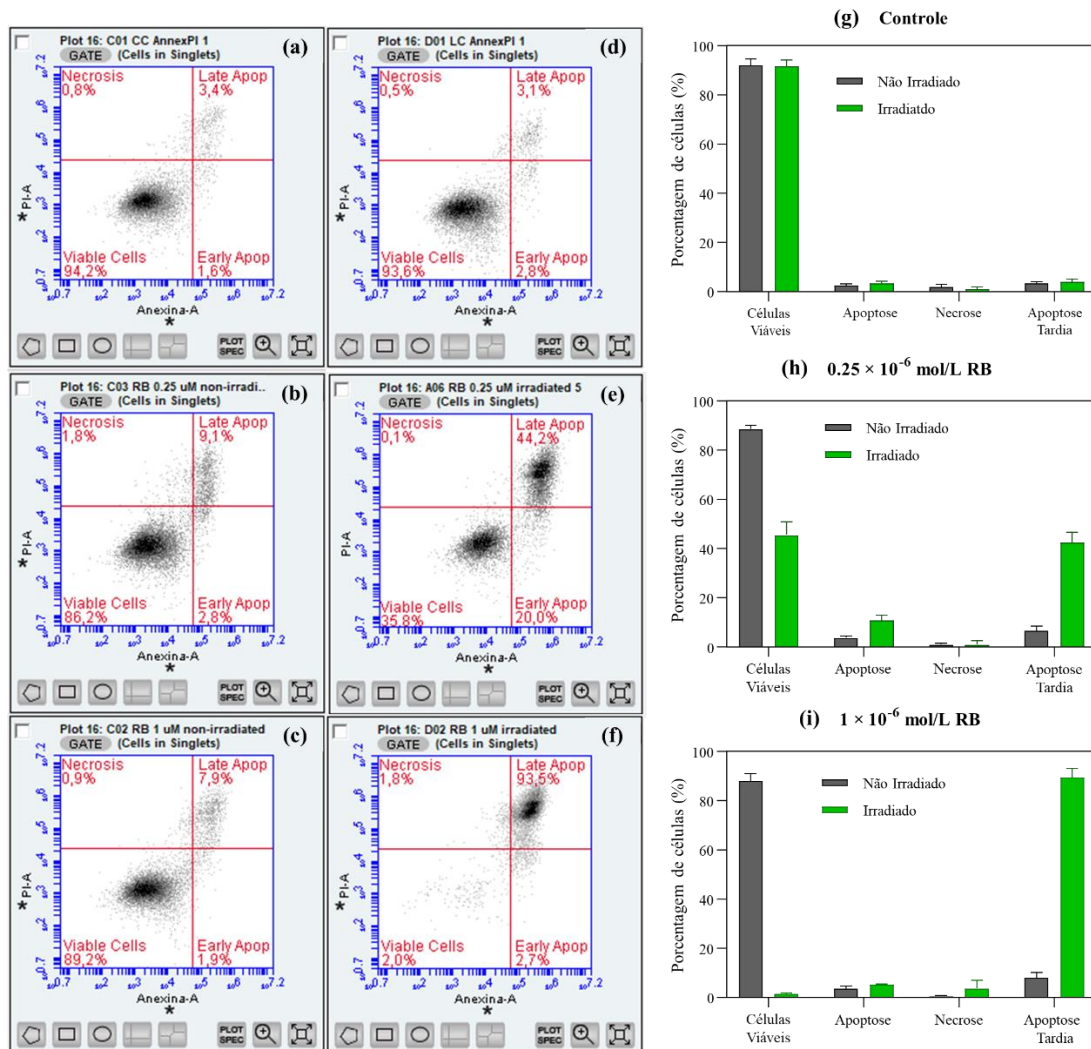


Figura 20. Citometria de fluxo para marcação de Anexina V Alexa Fluor[®] 488 e PI. A distribuição da população celular nos canais de Anexina V Alexa Fluor[®] 488 e PI está representada em (a) controle não irradiado, (b) 0,25 x 10⁻⁶ mol/L de RB não irradiado, e (c) 1 x 10⁻⁶ mol/L de RB não irradiado. Já os gráficos (d) mostram os dados para o controle irradiado, (e) 0,25 x 10⁻⁶ mol/L de RB irradiado e (f) 1 x 10⁻⁶ mol/L de RB irradiado. Os gráficos mostram os dados compilados para (g) controles celulares, (h) 0,25

e (i) 1×10^{-6} mol/L de RB, tanto para células irradiadas quanto não irradiadas após 3 horas de incubação.

A análise dos gráficos de distribuição da população celular (Figuras 20a-20f) revelou que, nos grupos não irradiados, cerca de 90% das células permaneceram no quadrante de células viáveis (Figuras 20a-20c). No entanto, nos grupos irradiados, observou-se uma clara migração das células do quadrante de viáveis para o de apoptose tardia. Essa transição foi evidenciada pela presença de aproximadamente 44% e 94% das células no quadrante de apoptose tardia para as concentrações de 0,25 e 1×10^{-6} mol/L de RB, respectivamente. As Figuras 20g-20i sumarizam essa distribuição da população. O aumento nas células apoptóticas tardias correlaciona-se com uma maior incorporação de RB, conforme indicado pelos dados de microscopia confocal e pela análise de incorporação mostrada na Figura 19. Embora os dados de viabilidade celular obtidos no ensaio MTT sugiram outro cenário, a ativação da cascata apoptótica foi claramente observada após 3 h de incubação com 1×10^{-6} mol/L de RB, seguida da irradiação. Isso sugere que a eficácia da TFD mediada por RB pode ser mais elevada do que os resultados do MTT inicialmente indicaram.

Os resultados acima indicam um papel importante das modificações na membrana plasmática para a terapia fotodinâmica (TFD). No entanto, eles não são suficientes para determinar as interações moleculares responsáveis pelos efeitos na membrana durante a TFD. Isso pode ser alcançado utilizando modelos de membrana celular, como foi feito aqui com monocamadas de Langmuir,⁶⁹ que serão discutidos a seguir.

5.4. Monocamadas de Langmuir como Modelos de Membrana de Células Caco-2

A membrana plasmática das células Caco-2 pode ser mimetizada usando monocamadas de Langmuir a partir do extrato celular de Caco-2. As isotermas de pressão superficial (π) em relação à área (cm^2/mL) deste extrato em PBS e em diferentes concentrações de RB são mostradas na Figura 21a. A incorporação de RB nos filmes de Caco-2 deslocou as isotermas para áreas maiores à medida que a concentração de RB na subfase aumentava, especialmente em baixas pressões superficiais. Em pressões superficiais mais altas, as isotermas convergiram, sugerindo que algumas moléculas de RB adsorvidas nas monocamadas foram expelidas para a subfase. A Tabela 2 lista os

deslocamentos relativos de área calculados pela extrapolação da área de 30 mN/m (inserção da Figura 21a) para 0 mN/m. Essa pressão superficial é considerada representativa da pressão lateral nas membranas celulares.¹¹¹

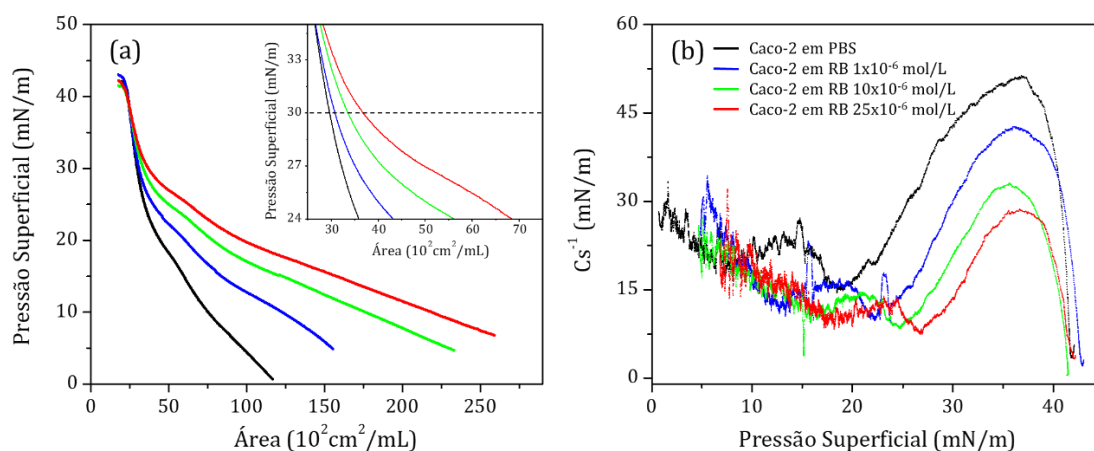


Figura 21. (a) Isotermas de pressão de superfície (mN/m) *versus* área (cm²/mL de extrato espalhado) do extrato celular de Caco-2 em PBS e RB (1, 10 e 25 × 10⁻⁶ mol/L). A inserção fornece uma visão aproximada das curvas de isotermas a 30 mN/m, a partir das quais os deslocamentos na área relativa foram medidos. (b) Módulo de compressibilidade (C_s⁻¹) do extrato celular de Caco-2 em solução de PBS e RB. C_s⁻¹ foi estimado a partir das isotermas π-A com a equação C_s⁻¹ = - A(∂π/∂A).

Tabela 2. Deslocamentos de área relativos ($[\frac{A-A_0}{A_0}] \times 100$), onde A e A₀ são as áreas extrapoladas a 30 mN/m para o extrato celular de Caco-2 em soluções de PBS e RB, respectivamente.

| Concentrações de RB (mol/L) | Mudanças de área relativas no extrato de células Caco-2 (%) |
|-----------------------------|---|
| 1 × 10 ⁻⁶ | 22 ± 2 |
| 10 × 10 ⁻⁶ | 60 ± 1 |
| 25 × 10 ⁻⁶ | 140 ± 6 |

Pesquisas anteriores sobre derivados xantênicos aniônicos revelaram uma interação mais forte com grupos lipídicos catiônicos, atribuída a atrações eletrostáticas. Isso resultou em taxas de adsorção mais altas com monocamadas de fosfatidilcolinas (PC)^{25,57} zwitteriônicas e mais baixas com fosfatidilserinas aniônicas.²⁵ Em células mamíferas saudáveis, a camada externa da membrana plasmática é predominantemente composta de PC, enquanto a camada interna consiste principalmente de fosfatidilserina.^{112,113} Tal assimetria lipídica está ausente em células tumorais.¹¹⁴ Apesar da complexidade variada nas estruturas lipídicas, pode-se presumir que o principal mecanismo que facilita a inserção do RB aniônico na monocamada do extrato de Caco-2 é a atração eletrostática com os grupos carregados positivamente dos fosfolípidios.¹¹⁴ À

medida que a concentração de RB na subfase aumentou, o módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) para as monocamadas de Caco-2 diminuiu (Figura 21b), indicando uma maior flexibilidade dos filmes. A capacidade de modular a elasticidade da membrana celular facilita o transporte de massa através das membranas celulares, reduzindo sua seletividade, aumentando assim a adsorção de moléculas de FS no filme lipídico.¹¹⁵ Resultados comparáveis foram observados com o uso de diferentes fotossensibilizadores, incluindo EB, éster decílico de eosina (EosDec), azul de toluidina e nanoestruturas como nanopartículas de ouro isoladas com casca de sílica (AuSHINs).^{57,59,98,99,116}

O mecanismo de inserção de RB em nível molecular em monocamadas de Caco-2 foi avaliado usando PM-IRRAS, com experimentos realizados em soluções de PBS e de RB (25×10^{-6} mol/L). Os espectros são mostrados na Figura 22, enquanto a atribuição de bandas é dada na Tabela 3. A incorporação de RB teve efeitos mais fortes nos grupos polares dos fosfolipídios (Figuras 22a) do que na região alifática (Figura 22b). Por exemplo, o ν_s (CN) em 829 cm^{-1} mudou para 821 cm^{-1} e o ν_{as} (PO^{2-}) deslocou de 1238 cm^{-1} para 1226 cm^{-1} , acompanhado por um aumento na intensidade. Esses deslocamentos indicam que a incorporação de RB pode resultar na hidratação dos grupos fosfatos.¹¹⁶ Outras modificações incluíram o deslocamento do $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ de 1597 cm^{-1} para 1605 cm^{-1} e o desaparecimento do $\nu_{as}(\text{CN}+(\text{CH}_3)_3)$ em 956 cm^{-1} , o primeiro relacionado aos grupos carboxilato do FS e o último aos grupos colina da PC.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Portanto, pode-se presumir que as interações eletrostáticas são um fator-chave na adsorção de RB em filmes de Caco-2, como previamente hipotetizado.

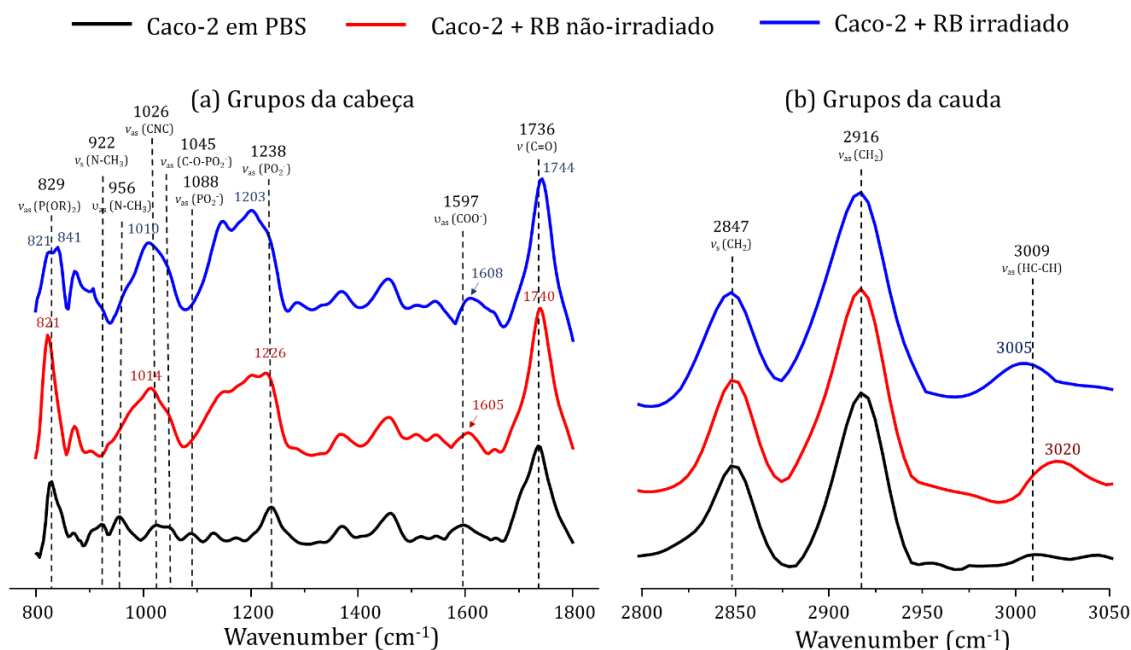


Figura 22. Espectros de PM-IRRAS de monocamadas de extrato celular de Caco-2 em PBS e em RB (25×10^{-6} mol/L), antes e após irradiação. Os modos vibracionais dos grupos da cabeça são exibidos em (a), enquanto os dos grupos da cadeia são apresentados em (b).

Tabela 3. Atribuições das principais bandas para as monocamadas de Caco-2 e deslocamentos induzidos pela interação e irradiação do RB.

| Extrato celular de Caco-2 (cm ⁻¹) | | | Atribuição |
|---|------|-----------------|---|
| PBS | RB | RB + irradiação | |
| 829 | 821 | 821 and 841 | ν _s (CN) |
| 922 | - | - | δ(NH ₃ ⁺) _{rocking} + ν(C-N) |
| 956 | - | - | ν _{asv} (CN ⁺ (CH ₃) ₃) |
| 1026 | 1014 | 1010 | ν _{as} (CNC) |
| 1045 | - | - | ν _{as} (C-O-PO ₂ ⁻) |
| 1088 | - | - | ν _s (PO ₂ ⁻) |
| 1238 | 1226 | 1203 | ν _{as} (PO ₂ ⁻) |
| 1597 | 1605 | 1608 | ν _{as} (COO ⁻) |
| 1736 | 1740 | 1744 | ν (C=O) |
| 2847 | 2847 | 2847 | ν _s (CH ₂) |
| 2916 | 2916 | 2916 | ν _{as} (CH ₂) |
| 3009 | 3020 | 3005 | ν (HC=CH) |

Em relação a cadeia hidrofóbica, a única diferença discernível nos espectros foi observada no modo ν_{as} (HC=CH), que mudou de 3009 cm⁻¹ para 3020 cm⁻¹. Não houve alteração no modo de ordenação, como indicado pela razão I ν_s (CH₂) / I ν_{as} (CH₂), que

permaneceu relativamente inalterada ($0,57 \pm 0,01$ em PBS e $0,60 \pm 0,05$ em RB não irradiado). Esse comportamento difere de estudos anteriores envolvendo outros derivados de xantênicos como EB, EY e EosDec.^{57,98,119,120} Os últimos derivados tiveram interações mais substanciais com grupos polares, o que levou a mudanças na ordenação das caudas alifáticas. Esse comportamento distinto de RB sugere que forças eletrostáticas atrativas podem confinar a adsorção de RB aos grupos catiônicos das cabeças de fosfolipídios Caco-2, conforme ilustrado no esquema da Figura 23.

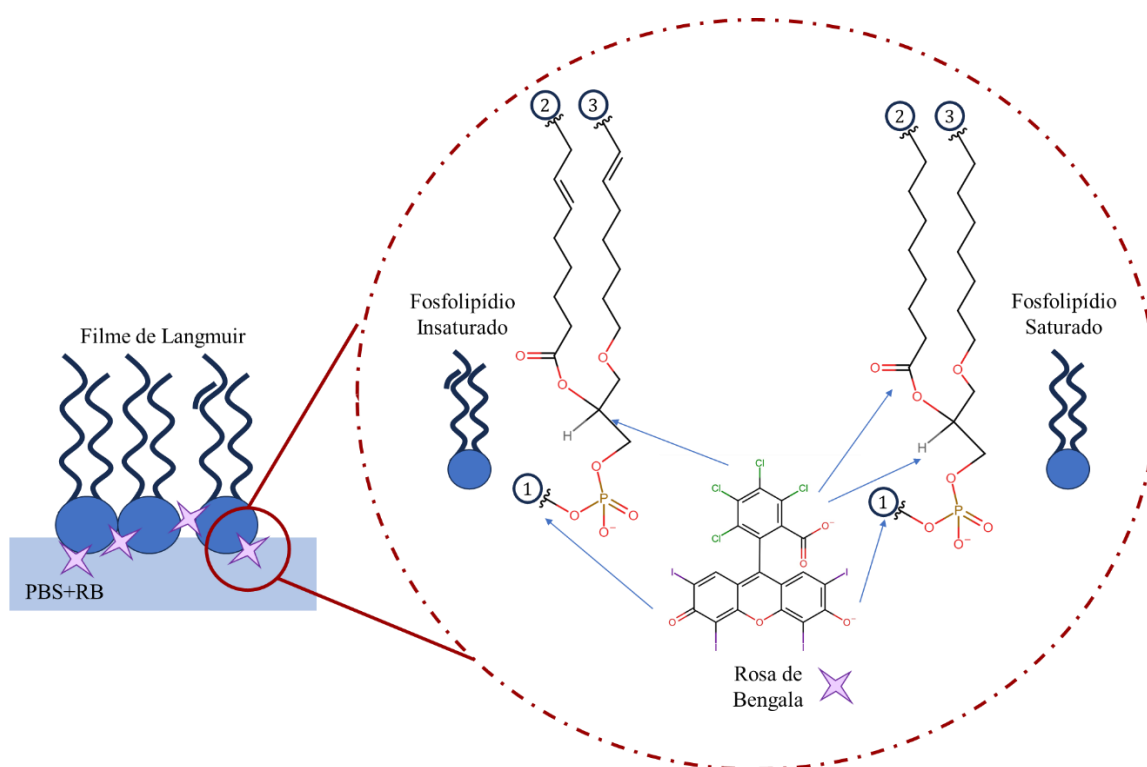


Figura 23. Esquema da interação proposta entre o extrato celular Caco-2 e o Rosa Bengala (RB) com base nos dados do PM-IRRAS. O extrato apresenta diferentes fosfolipídios com diferentes tamanhos de cadeias (representados pelos números 2 e 3). A molécula RB interage principalmente com os grupos de cabeça dos fosfolipídios, por exemplo, os fosfatos, e grupos catiônicos, por exemplo, a colina (número 1).

Imagens de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) de monocamadas de Caco-2 em PBS e RB (25×10^{-6} mol/L) em pressões de superfície de 15 e 30 mN/m são exibidas na Figura 24 (painéis esquerdos). A 0 mN/m (resultado não mostrado), a morfologia da superfície de ambas as condições (na presença ou ausência de RB) é homogênea devido a interações intermoleculares mínimas. À medida que as barreiras se fecharam e a pressão da superfície da monocamada aumentou até 30 mN/m, uma fase

caracterizada por domínios circulares emergiu. Esse comportamento pode estar relacionado ao arranjo estrutural inicial dos fosfolipídios Caco-2. A 15 mN/m, há uma influência perceptível no tamanho dos domínios com RB, enquanto a 30 mN/m a morfologia se assemelha àquela vista em PBS, indicando um impacto mínimo na organização das monocamadas em escala micrométrica.

O impacto da incorporação de RB em monocamadas de Caco-2 é mais pronunciado na escala nanométrica, conforme evidenciado por imagens de AFM registradas para filmes LB depositados a 15 mN/m e 30 mN/m em subfases de PBS (Figuras 24c e 24d) e RB (Figuras 24g e 24h). A Tabela 4 lista a altura e o diâmetro médios dos domínios, além da rugosidade do filme derivada das imagens analisadas. Para um filme LB depositado a 15 mN/m de uma monocamada de Caco-2 em PBS, aparecem domínios elípticos junto a outros mais difusamente organizados. A 15 mN/m, há domínios elípticos maiores que estão a menos de 1 nm acima da matriz de fundo, e domínios menores e mais brilhantes sobre os domínios elípticos, aproximadamente 1,4-1,5 nm acima do fundo, além de alguns pequenos agregados que são muito mais altos e bastante variáveis em altura, levando a uma altura média de 4,4 nm (alturas dos domínios na Tabela 4). Quanto ao filme LB contendo RB, o diâmetro médio dos domínios mais brilhantes aumentou de 1,0 μm para 2,4 μm , e a altura média aumentou de 4,4 nm para 10,6 nm. Essas diferentes populações permanecem a 30 mN/m, embora com ligeiras reduções nas diferenças de altura, provavelmente devido ao aumento da espessura da matriz líquido-expandida conforme é comprimida. Nessa pressão superficial biologicamente relevante, não há diferenças significativas nas morfologias, o que sugere que a incorporação de RB na membrana em si não é prejudicial às suas propriedades. Apenas a altura média dos domínios é afetada pela incorporação de RB, aumentando de 2,6 nm para 4,4 nm; ambos os valores são elevados para um domínio de monocamada e sugerem que estruturas de dupla ou múltiplas camadas são formadas. Esses achados estão alinhados com os dados obtidos das isotermas de pressão superficial, sustentando que as moléculas de RB têm uma inserção limitada nas monocamadas densamente compactadas (a altas pressões), tendendo a se localizar principalmente abaixo da monocamada. Isso também está de acordo com as isotermas que mostram que o RB começa a ser expelido do filme nessa pressão superficial.

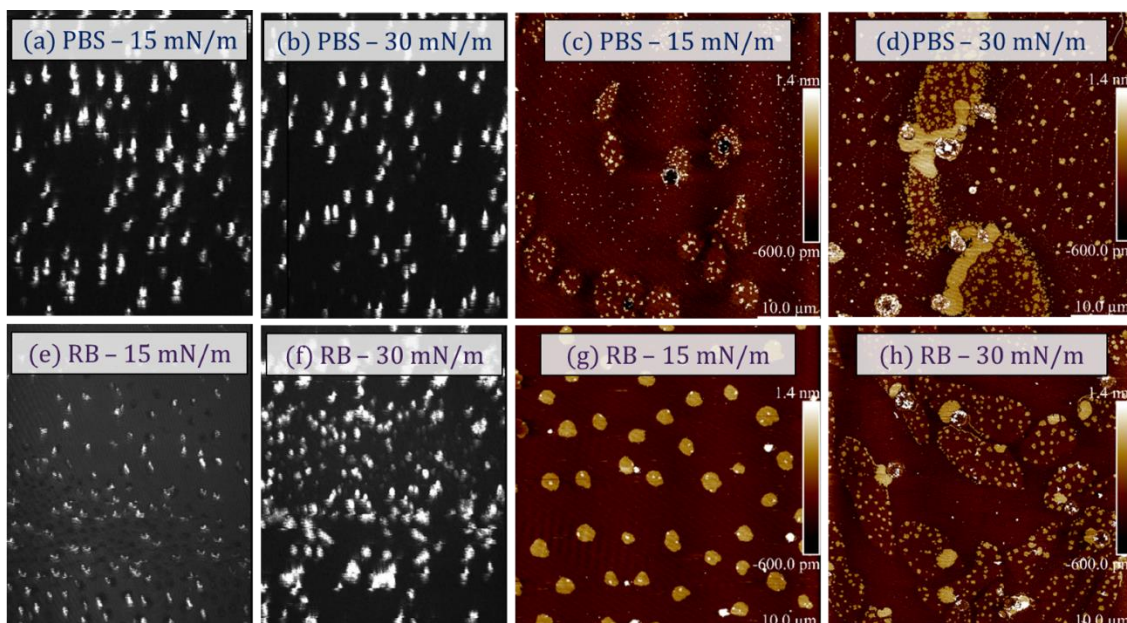


Figura 24. Imagens de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) de monocamadas de Caco-2 em PBS (a-b) e em 25×10^{-6} mol/L de RB (e-f). Imagens de AFM de filmes LB depositados a partir de monocamadas de Caco-2 em PBS (c-d) e de monocamadas de Caco-2 em 25×10^{-6} mol/L de RB (g-h).

Tabela 4. Altura e diâmetro médios dos domínios mais brilhantes e rugosidade dos filmes LB produzidos com uma monocamada de Caco-2 em PBS e com uma monocamada de Caco-2 em RB de 25×10^{-6} mol/L. Os dados são mostrados para filmes LB fabricados a 15 e 30 mN/m, sendo obtidos usando o *software Nanoscope 2.0 Particle Analysis*.

| Média | 15 mN/m | | 30 mN/m | |
|----------------------------|---------|------|---------|-----|
| | PBS | RB | PBS | RB |
| Altura (nm) | 4,4 | 10,6 | 2,6 | 5,4 |
| Diâmetro (μm) | 1,0 | 2,4 | 0,9 | 0,9 |
| Rugosidade (nm) | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 |

5.5. Fotoativação do RB nas monocamadas de extrato de Caco-2

O impacto da fotoativação do RB em monocamadas de Caco-2 foi investigado sob uma pressão de superfície constante de 30 mN/m durante um período de 2 h. A Figura 25 mostra a evolução da área de superfície relativa (A/A_0) para monocamadas em PBS, e monocamadas irradiadas e não irradiadas em 25×10^{-6} mol/L RB. Experimentos subsidiários indicaram que a irradiação das monocamadas em PBS não levou a mudanças significativas, conforme indicado na Figura 26. A diminuição na área relativa em todas

as monocamadas não irradiadas pode ser devido à oxidação lipídica descontrolada, resultando na perda de material na subfase.^{121,122}

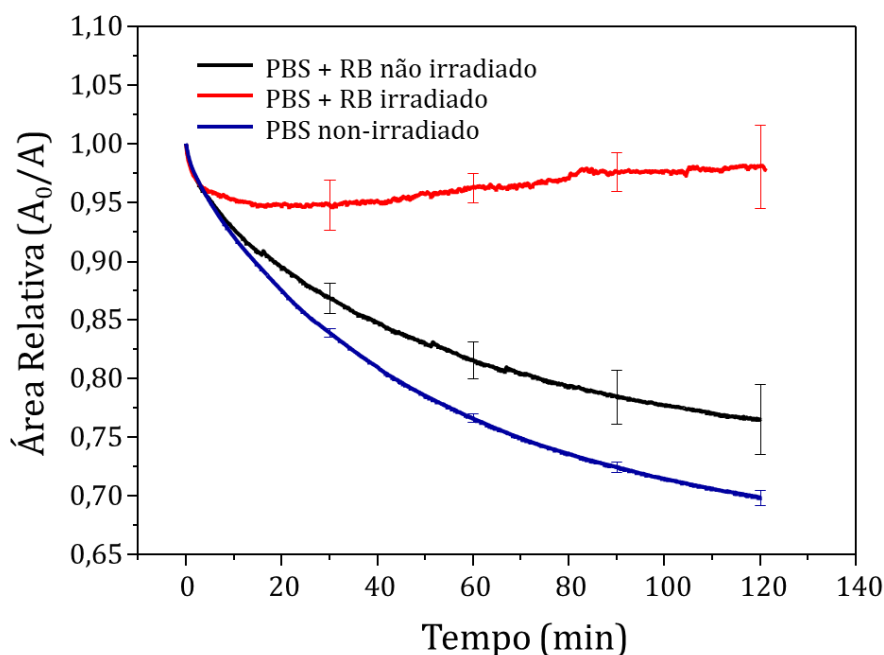


Figura 25. Evolução da área relativa (A/A_0) da monocamada do extrato celular Caco-2 em PBS não irradiado (azul) e solução PBS + RB (25×10^{-6} mol/L) não irradiada (preto) e irradiada (vermelho).

A incorporação do RB resultou em uma estabilidade melhorada, evidente pela menor diminuição na área de superfície relativa de monocamadas contendo 25×10^{-6} mol/L de RB ($0,77 \pm 0,03$) ao longo de 120 min, em comparação com aquelas em PBS ($0,70 \pm 0,01$). Além disso, com a presença de RB, os filmes irradiados apresentaram áreas de superfície relativas maiores que os não irradiados, aumentando para $0,95 \pm 0,02$, $0,96 \pm 0,01$ e $0,98 \pm 0,04$ após 30, 60 e 120 min, respectivamente. A diferença na área entre os filmes irradiados e não irradiados, atingindo aproximadamente $22\% \pm 7\%$ após 120 min, supera o pequeno aumento de 3,5% observado com EB em monocamadas de extrato celular de MCF7.⁹⁸ Essa diferença pode ser atribuída à eficiência aprimorada do RB na geração de ROS, o que deve afetar a estrutura das monocamadas.⁴⁸ De fato, o RB excitado interage com o O_2 circundante produzindo oxigênio singlete (1O_2), uma espécie altamente reativa capaz de oxidar cadeias lipídicas insaturadas.¹²³ A formação de hidroperóxidos é o resultado mais provável das reações oxidativas, interrompendo o equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico da membrana e expandindo a área de superfície da monocamada.¹²⁴

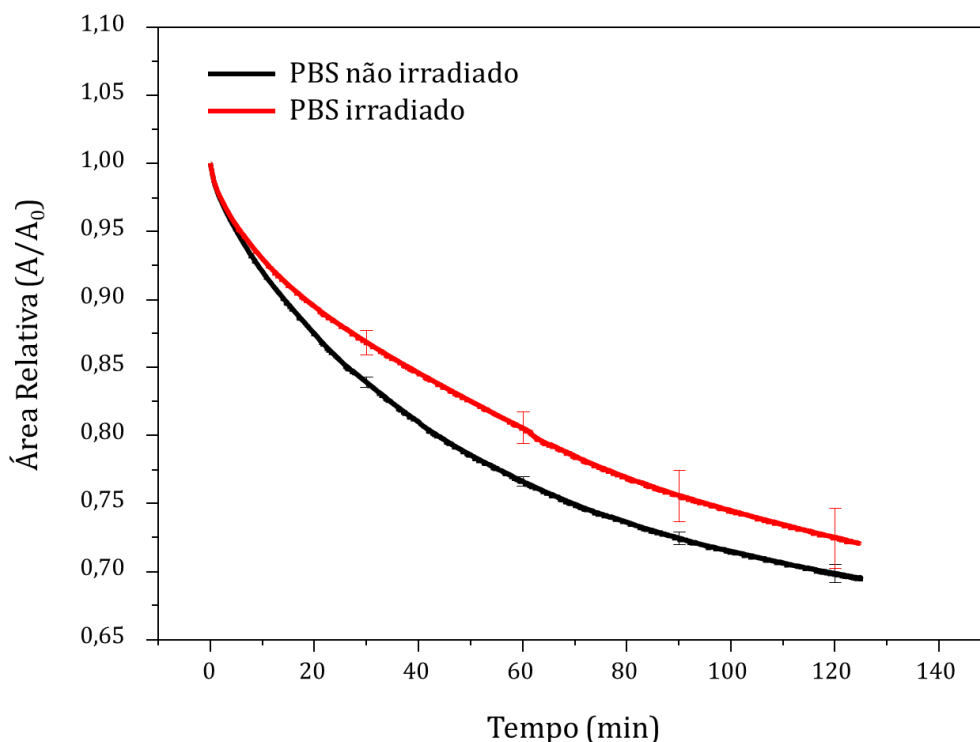


Figura 26. Evolução da área relativa (A/A_0) da monocamada do extrato celular de Caco-2 em solução PBS não irradiada (preto) e irradiada (vermelho).

Os dados de PM-IRRAS (Figura 22) mostram que a irradiação de monocamadas de Caco-2 na presença de RB induz modificações consideráveis nos espectros de PM-IRRAS para grupos polares. Por exemplo, o $\gamma_r(\text{CH}_2)$ em 821 cm^{-1} se divide em duas bandas em 821 cm^{-1} e 841 cm^{-1} , acompanhadas por uma diminuição na intensidade relativa. O deslocamento do $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ de 1226 cm^{-1} para 1203 cm^{-1} sugere modificações na ligação de hidrogênio entre grupos fosfato e moléculas de água circundantes,¹²⁵ o que é consistente com a presença de hidroperóxidos na interface monocamada-subfase.⁵⁷ Na região não polar, o $\nu_s(\text{CH}_2)$ e $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ não foram afetados durante a fotoativação. A razão $I_{\nu_s(\text{CH}_2)} / I_{\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)}$ mudou ligeiramente de $0,60 \pm 0,05$ para $0,55 \pm 0,05$, sugerindo que a fotoativação de RB não afeta a conformação das caudas alifáticas.¹²⁶ Uma conclusão semelhante foi alcançada para EosDec, da mesma família de RB. A EosDec teve impacto mínimo em grupos alifáticos em monocamadas de DOPE irradiadas, mas reduziu ligeiramente a desordem da cadeia em monocamadas de DOPG.¹²⁰ Além disso, o modo vibracional HC=CH mudou de 3020 cm^{-1} para 3005 cm^{-1} no filme irradiado, o que é consistente com a geração de hidroperóxidos no local de insaturação.¹²⁰ A clivagem da cadeia poderia potencialmente resultar da propagação das reações de hidroperoxidação,

levando a subprodutos truncados, como cetonas, aldeídos ou ácidos carboxílicos.¹²⁷ Portanto, pode-se questionar se a banda (HC=CH) no espectro irradiado indica quebra da cadeia lipídica e permeabilização da membrana. No entanto, é provável que os subprodutos da clivagem da cadeia sejam expelidos para a subfase aquosa, deixando principalmente lipídios hidroperoxidados na monocamada.¹²⁰

CAPÍTULO 4

6. Conclusão

Este projeto de mestrado teve como objetivo elucidar os mecanismos pelos quais o Rosa de Bengala (RB) atua como fotossensibilizador (FS) na terapia fotodinâmica (TFD) direcionada ao câncer colorretal. Ensaios de MTT indicaram toxicidade mínima contra linhas celulares Caco-2 do RB sem irradiação, mesmo em altas concentrações e exposição prolongada. No entanto, com a irradiação de luz, houve uma redução significativa na viabilidade celular, acima de 80% em concentrações superiores a 5×10^{-6} mol/L. A microscopia confocal revelou mudanças na morfologia celular e nuclear indicativas de apoptose tardia, com incorporação eficaz de RB a 10×10^{-6} mol/L, que foi confirmada pelos dados obtidos via citometria de fluxo. A importância da ação do RB nas membranas celulares foi confirmada simulando a membrana Caco-2 usando monocamadas de Langmuir feitas com extrato celular de Caco-2. O RB foi incorporado nas monocamadas do extrato, indicado por um deslocamento na isoterma π -A de até 140% em uma concentração de 25×10^{-6} mol/L. A espectroscopia de absorção-reflexão infravermelha modulada por polarização (PM-IRRAS) forneceu evidências da interação do RB com as membranas celulares, impulsionada pela atração eletrostática com grupos polares dos fosfolípidios. Na escala micrométrica, a microscopia de ângulo de Brewster (BAM) mostrou mudanças mínimas na morfologia após a incorporação do RB. Mudanças detalhadas na estrutura da monocamada, determinadas pela microscopia de força atômica (AFM), mostraram um aumento na altura média dos domínios de 2,63 nm em PBS para 4,37 nm em RB, mas morfologias semelhantes em pressões biologicamente relevantes. Isso destaca que é apenas a irradiação, não a incorporação do RB, que causa danos à membrana celular, em concordância com os ensaios de toxicidade. Testes de estabilidade indicaram que a irradiação de RB leva a reações de hidroxidação, mostrando uma diferença significativa de $22\% \pm 7\%$ na área entre monocamadas irradiadas e não irradiadas. Em resumo, os mecanismos de ação do RB puderam ser correlacionados com sua interação com as membranas celulares Caco-2, ao mesmo tempo que confirmaram sua viabilidade como FS na TFD para o tratamento do câncer colorretal.

Referências

1. Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E. & Soerjomataram, I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer* **127**, 3029–3030 (2021).
2. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209–249 (2021).
3. Xi, Y. & Xu, P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol* **14**, 1–7 (2021).
4. Williams Nkune, N., Kruger, C. A. & Abrahamse, H. *Synthesis of a Novel Nanobioconjugate for Targeted Photodynamic Therapy of Colon Cancer Enhanced with Cannabidiol*. *Oncotarget* vol. 13 www.oncotarget.com (2022).
5. Nompumelelo Simelane, N. W., Kruger, C. A. & Abrahamse, H. Photodynamic diagnosis and photodynamic therapy of colorectal cancer: In vitro and in vivo. *RSC Adv* **10**, 41560–41576 (2020).
6. Falconer, H., Yin, L., Grönberg, H. & Altman, D. Ovarian cancer risk after salpingectomy: A nationwide population-based study. *J Natl Cancer Inst* **107**, 1–6 (2015).
7. Lee, D. *et al.* Overcoming the obstacles of current photodynamic therapy in tumors using nanoparticles. *Bioactive Materials* vol. 8 20–34 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.019> (2022).
8. Khilov, A. V., Shishkova, V. A., Sergeeva, E. A., Kurakina, D. A. & Kirillin, M. Yu. Agar phantoms of biological tissue for fluorescence monitoring of photodynamic therapy. *Quantum Elec (Woodbury)* **52**, 63–68 (2022).
9. Cramer, G. M., Cengel, K. A. & Busch, T. M. Forging Forward in Photodynamic Therapy. *Cancer Res* **82**, 534–536 (2022).
10. Niculescu, A. G. & Grumezescu, A. M. Photodynamic therapy—an up-to-date review. *Applied Sciences (Switzerland)* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/app11083626> (2021).
11. Li, Y. *et al.* Peptide-based supramolecular photodynamic therapy systems: From rational molecular design to effective cancer treatment. *Chemical Engineering Journal* **436**, 135240 (2022).
12. Chen, X. *et al.* Study of copper-cysteamine based X-ray induced photodynamic therapy and its effects on cancer cell proliferation and migration in a clinical mimic setting. *Bioact Mater* **7**, 504–514 (2022).
13. Yang, Y. *et al.* Core-shell structured nanoparticles for photodynamic therapy-based cancer treatment and related imaging. *Coord Chem Rev* **458**, 214427 (2022).
14. Zhang, Y. *et al.* Cyclodextrin single isomer-based vesicle for chlorin e6 delivery and enhanced efficiency of photodynamic therapy for cancer treatment. *J Mol Liq* **352**, 118683 (2022).
15. Plekhova, N. *et al.* Development of Novel Tetrapyrrole Structure Photosensitizers for Cancer Photodynamic Therapy. *Bioengineering* **9**, 82 (2022).

16. He, X. *et al.* AIE-based theranostic systems for detection and killing of pathogens. *Theranostics* vol. 9 3223–3248 Preprint at <https://doi.org/10.7150/thno.31844> (2019).
17. Dong, S. *et al.* Difunctional bacteriophage conjugated with photosensitizers for *Candida albicans*-targeting photodynamic inactivation. *Int J Nanomedicine* **13**, 2199–2216 (2018).
18. de Oliveira-Silva, T. *et al.* Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Candida albicans* in the presence of glucose. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **27**, 54–58 (2019).
19. Alonso, G. C., Klein, M. I., Jordão, C. C., Carmello, J. C. & Pavarina, A. C. Gene expression of *Candida albicans* strains isolates from patients with denture stomatitis submitted to treatments with photodynamic therapy and nystatin. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **35**, 102292 (2021).
20. Stájer, A., Kajári, S., Gajdács, M., Musah-Eroje, A. & Baráth, Z. Utility of photodynamic therapy in dentistry: Current concepts. *Dentistry Journal* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3390/dj8020043> (2020).
21. Dougherty, T. J. *et al.* *Photodynamic Therapy*. <https://academic.oup.com/jnci/article/90/12/889/960771> (1998).
22. Patra, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8> (2018).
23. Rodríguez-Cerdeira, C. *et al.* New applications of photodynamic therapy in the management of candidiasis. *Journal of Fungi* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.3390/jof7121025> (2021).
24. Song, C. *et al.* Photodynamic therapy induces autophagy-mediated cell death in human colorectal cancer cells via activation of the ROS/JNK signaling pathway. *Cell Death Dis* **11**, 1–14 (2020).
25. Bistaffa, M. J. *et al.* Photo-Induced Necrosis on Oropharyngeal Carcinoma (HEp-2) Cells Mediated by the Xanthene Erythrosine. *J Nanosci Nanotechnol* **20**, 6180–6190 (2020).
26. Chizenga, E. P. & Abrahamse, H. Nanotechnology in modern photodynamic therapy of cancer: A review of cellular resistance patterns affecting the therapeutic response. *Pharmaceutics* **12**, 1–21 (2020).
27. Ding, H. *et al.* Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia. *Journal of Controlled Release* **156**, 276–280 (2011).
28. Bacellar, I. O. L., Tsubone, T. M., Pavani, C. & Baptista, M. S. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci* **16**, 20523–20559 (2015).
29. Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D. & Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Perspectives (Montclair)* **3**, 380–387 (2003).
30. Juarranz, Á., Jaén, P., Sanz-Rodríguez, F., Cuevas, J. & González, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology* **10**, 148–154 (2008).
31. Lee, C. N., Hsu, R., Chen, H. & Wong, T. W. Daylight Photodynamic Therapy: An Update. *Molecules* **25**, (2020).

32. Dos Santos, A. F., De Almeida, D. R. Q., Terra, L. F., Baptista, M. S. & Labriola, L. Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *J Cancer Metastasis Treat* **25**, 1–20 (2019).
33. Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T. & Yang, Z. Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics* **13**, (2021).
34. Escudero, A. *et al.* Photodynamic therapy: Photosensitizers and nanostructures. *Materials Chemistry Frontiers* vol. 5 3788–3812 Preprint at <https://doi.org/10.1039/d0qm00922a> (2021).
35. Yang, W., Liang, H., Ma, S., Wang, D. & Huang, J. Gold nanoparticle based photothermal therapy: Development and application for effective cancer treatment. *Sustainable Materials and Technologies* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2019.e00109> (2019).
36. Mustafa, F. H. & Jaafar, M. S. Comparison of wavelength-dependent penetration depths of lasers in different types of skin in photodynamic therapy. *Indian Journal of Physics* **87**, 203–209 (2013).
37. Weissleder, R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 316–317 (2001).
38. Tavakkoli Yaraki, M., Liu, B. & Tan, Y. N. Emerging Strategies in Enhancing Singlet Oxygen Generation of Nano-Photosensitizers Toward Advanced Phototherapy. *Nano-Micro Letters* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s40820-022-00856-y> (2022).
39. Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T. & Yang, Z. Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics* **13**, (2021).
40. 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* vol. 34 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102091> (2021).
41. Wang, T. *et al.* Light-Enhanced O₂-Evolving Nanoparticles Boost Photodynamic Therapy to Elicit Antitumor Immunity. *ACS Appl Mater Interfaces* **11**, 16367–16379 (2019).
42. Park, H. J., Shin, D. J. & Yu, J. Categorization of Quantum Dots, Clusters, Nanoclusters, and Nanodots. *J Chem Educ* **98**, 703–709 (2021).
43. Qin, X. *et al.* Synthesis of Yellow-Fluorescent Carbon Nano-dots by Microplasma for Imaging and Photocatalytic Inactivation of Cancer Cells. *Nanoscale Res Lett* **16**, (2021).
44. Zhang, Y. *et al.* Carbon dots nanophotosensitizers with tunable reactive oxygen species generation for mitochondrion-targeted type I/II photodynamic therapy. *Biomaterials* **293**, (2023).
45. Hu, X. *et al.* Synthesis of Sn nanocluster@carbon dots for photodynamic therapy application. *Chinese Chemical Letters* **32**, 2287–2291 (2021).
46. Ullah, S. *et al.* Near-infrared laser 808-nm excitable palladium nano-dots loaded on graphene oxide hybrid for the antibacterial activity. *Appl Organomet Chem* **35**, (2021).

47. Murube, J. Rose bengal: The second most commonly used surfocular vital stain. *Ocular Surface* vol. 12 14–22 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2013.10.003> (2014).
48. Demartis, S., Obinu, A., Gavini, E., Giunchedi, P. & Rassu, G. Nanotechnology-based rose Bengal: A broad-spectrum biomedical tool. *Dyes and Pigments* **188**, 109236 (2021).
49. Vanerio, N., Stijnen, M., De Mol, B. A. J. M. & Kock, L. M. Biomedical Applications of Photo- and Sono-Activated Rose Bengal: A Review. *Photobiomodul Photomed Laser Surg* **37**, 383–394 (2019).
50. Srivastav, A. K. *et al.* Photosensitized rose Bengal-induced phototoxicity on human melanoma cell line under natural sunlight exposure. *J Photochem Photobiol B* **156**, 87–99 (2016).
51. Buck, S. T. G. *et al.* Photodynamic Efficiency of Xanthene Dyes and Their Phototoxicity against a Carcinoma Cell Line: A Computational and Experimental Study. *J Chem* **2017**, (2017).
52. Pereira, P. C. de S. *et al.* Photophysical properties and interaction studies of Rose Bengal derivatives with biomimetic systems based in micellar aqueous solutions. *J Mol Liq* **230**, 674–685 (2017).
53. Calori, I. R. *et al.* Distribution of xanthene dyes in DPPC vesicles: Rationally accounting for drug partitioning using a membrane model. *J Braz Chem Soc* **27**, 1938–1948 (2016).
54. Estevão, B. M. *et al.* Interaction of eosin and its ester derivatives with aqueous biomimetic micelles: Evaluation of photodynamic potentialities. *J Photochem Photobiol A Chem* **287**, 30–39 (2014).
55. Buck, S. T. G. *et al.* Photodynamic Efficiency of Xanthene Dyes and Their Phototoxicity against a Carcinoma Cell Line: A Computational and Experimental Study. *J Chem* **2017**, (2017).
56. Pellosi, D. S. *et al.* Photophysical properties and interactions of xanthene dyes in aqueous micelles. *J Photochem Photobiol A Chem* **247**, 8–15 (2012).
57. Aoki, P. H. B. *et al.* Molecular-Level Modifications Induced by Photo-Oxidation of Lipid Monolayers Interacting with Erythrosin. *Langmuir* **32**, 3766–3773 (2016).
58. Pereira, L. S. A. *et al.* Evidence of photoinduced lipid hydroperoxidation in Langmuir monolayers containing Eosin Y. *Colloids Surf B Biointerfaces* **171**, 682–689 (2018).
59. 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* **218**, 1–8 (2021).
60. Aoki, P. H. B. Sistemas Bioinspirados Aplicados no Estudo de Interação e Sensoriamento de Derivados Xantênicos. (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2014).
61. Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence*. (Wiley, 2012). doi:10.1002/9783527650002.
62. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer US, Boston, MA, 2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4.

63. Alberts, B. *et al.* *FUNDAMENTOS DA BIOLOGIA CELULAR 4ª Edição*.
64. Alberts, B. *Biologia Molecular Da Célula*.
65. Yuan, J. & Ofengeim, D. A guide to cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 25 379–395 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00689-6> (2024).
66. Shen, S., Shao, Y. & Li, C. Different types of cell death and their shift in shaping disease. *Cell Death Discovery* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01581-0> (2023).
67. Lee, E., Song, C. H., Bae, S. J., Ha, K. T. & Karki, R. Regulated cell death pathways and their roles in homeostasis, infection, inflammation, and tumorigenesis. *Experimental and Molecular Medicine* vol. 55 1632–1643 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01069-y> (2023).
68. Oliveira Junior, O. N. de & Taylor, D. M. Largo potencial dos filmes ultrafinos. *Ciencia Hoje* **12**, 19–23 (1990).
69. Oliveira, O. N., Caseli, L. & Ariga, K. The Past and the Future of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films. *Chemical Reviews* vol. 122 6459–6513 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00754> (2022).
70. Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *J Am Chem Soc* **39**, 1848–1906 (1917).
71. Petty, M. C. Langmuir-Blodgett Films: An Introduction. (1996) doi:10.1017/CBO9780511622519.
72. Oliveira, O. N., Caseli, L. & Ariga, K. The Past and the Future of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films. *Chem Rev* **122**, 6459–6513 (2022).
73. Volpati, D. *et al.* Vibrational spectroscopy for probing molecular-level interactions in organic films mimicking biointerfaces. *Adv Colloid Interface Sci* **207**, 199–215 (2014).
74. Dynarowicz-Łątka, P., Dhanabalan, A. & Oliveira, O. N. *Modern Physicochemical Research on Langmuir Monolayers*. (2001).
75. Blaudez, D. *et al.* Polarization-Modulated FT-IR Spectroscopy of a Spread Monolayer at the Air/Water Interface. (1993).
76. Blaudez, D. *et al.* Polarization Modulation FTIR Spectroscopy at the Air-Water Interface. vol. 242 (1994).
77. Binnig, G., Quate, C. F., Gi, E. L. & Gerber, C. *Atomic Force Microscope*.
78. McClelland, G. M., Erlandsson, R. & Chiang, S. *ATOMIC FORCE MICROSCOPY: GENERAL PRINCIPLES AND A NEW IMPLEMENTATION*. (1987).
79. Sun, W. Principles of Atomic Force Microscopy. in *Atomic Force Microscopy in Molecular and Cell Biology* 1–28 (Springer Singapore, 2018). doi:10.1007/978-981-13-1510-7_1.
80. Gupta, V. *et al.* *ATOMIC FORCE – IMAGING, MEASURING AND MANIPULATING SURFACES AT THE ATOMIC SCALE*. (INTECH Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, 2012).

81. Mosmann, T. *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*. *Journal of Immunological Methods* vol. 65 (1983).
82. Gutiérrez, L. *et al.* Nanotechnology in Drug Discovery and Development. in *Comprehensive Medicinal Chemistry III* vols 1–8 264–295 (Elsevier Inc., 2017).
83. Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P. D. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harb Protoc* **2018**, 465–468 (2018).
84. Elliott, A. D. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom* **92**, (2020).
85. Caspersson, T. Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. *Protoplasma* **27**, 463–467 (1937).
86. Robinson, J. P. Wallace H. Coulter: Decades of invention and discovery. *Cytometry Part A* **83A**, 424–438 (2013).
87. Graham, M. D. The Coulter Principle: A history. *Cytometry Part A* **101**, 8–11 (2022).
88. Robinson, J. P., Ostafe, R., Iyengar, S. N., Rajwa, B. & Fischer, R. Flow Cytometry: The Next Revolution. *Cells* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells12141875> (2023).
89. Bigos, M. *et al.* Nine Color Eleven Parameter Immunophenotyping Using Three Laser Flow Cytometry. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19990501)36:1.
90. Vembadi, A., Menachery, A. & Qasaimeh, M. A. Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Front Bioeng Biotechnol* **7**, 462391 (2019).
91. Manohar, S. M., Shah, P. & Nair, A. Flow cytometry: principles, applications and recent advances. <https://doi.org/10.4155/bio-2020-0267> **13**, 185–202 (2021).
92. Chattopadhyay, P. K., Perfetto, S. P. & Roederer, M. The Colorful Future of Cell Analysis by Flow Cytometry. *Discov Med* **4**, 255–262 (2009).
93. Brummelman, J. *et al.* Development, application and computational analysis of high-dimensional fluorescent antibody panels for single-cell flow cytometry. *Nature Protocols* **2019 14:7 14**, 1946–1969 (2019).
94. McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* **120**, 5.1.1 (2018).
95. Vitale, C. & Strati, P. CAR T-Cell Therapy for B-Cell non-Hodgkin Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical Trials and Real-World Experiences. *Front Oncol* **10**, 532324 (2020).
96. Blache, U. *et al.* Advanced Flow Cytometry Assays for Immune Monitoring of CAR-T Cell Applications. *Front Immunol* **12**, 658314 (2021).
97. N.I. O que é citometria de fluxo e qual sua aplicação para a saúde. *Bio em foco* **4** <https://bioemfoco.com.br/noticia/o-que-e-citometria-de-fluxo-e-qual-sua-aplicacao-para-a-saude/> (2020).
98. Bistaffa, M. J. *et al.* Plasma membrane permeabilization to explain erythrosine B phototoxicity on in vitro breast cancer cell models. *J Photochem Photobiol B* **223**, (2021).

99. Kopal, M. B. *et al.* Unveiling the mechanisms underlying photothermal efficiency of gold shell-isolated nanoparticles (AuSHINs) on ductal mammary carcinoma cells (BT-474). *Biophys Chem* **300**, (2023).
100. 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* **29**, 15022–15031 (2013).
101. Villalpando-Rodriguez, G. E. & Gibson, S. B. Reactive Oxygen Species (ROS) Regulates Different Types of Cell Death by Acting as a Rheostat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* vol. 2021 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2021/9912436> (2021).
102. Sztandera, K. *et al.* Cellular uptake of rose bengal is mediated by OATP1B1/1B3 transporters. *Bioelectrochemistry* **152**, (2023).
103. McEwan, C. *et al.* Comparing the efficacy of photodynamic and sonodynamic therapy in non-melanoma and melanoma skin cancer. *Bioorg Med Chem* **24**, 3023–3028 (2016).
104. Dhillon, S. K. *et al.* Rose Bengal-Amphiphilic Peptide Conjugate for Enhanced Photodynamic Therapy of Malignant Melanoma. *J Med Chem* **63**, 1328–1336 (2020).
105. Uppal, A., Jain, B., Gupta, P. K. & Das, K. Photodynamic action of rose bengal silica nanoparticle complex on breast and oral cancer cell lines. *Photochem Photobiol* **87**, 1146–1151 (2011).
106. Şueki, F., Ruhi, M. K. & Gülsoy, M. The effect of curcumin in antitumor photodynamic therapy: In vitro experiments with Caco-2 and PC-3 cancer lines. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **27**, 95–99 (2019).
107. Obeng, E. Apoptosis (Programmed cell death) and its signals-a review. *Brazilian Journal of Biology* vol. 81 1133–1143 Preprint at <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437> (2021).
108. Tonnus, W. *et al.* The pathological features of regulated necrosis. *Journal of Pathology* vol. 247 697–707 Preprint at <https://doi.org/10.1002/path.5248> (2019).
109. Vermes, I., Haanen, C. & Reutelingsperger, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* **243**, 167–190 (2000).
110. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. *J Immunol Methods* **184**, 39–51 (1995).
111. 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* **29**, 15022–15031 (2013).
112. Kalra, V. K., Gupta, C. M., Zachowski, A. & Pomorski, T. Lipid Asymmetry of Membranes. in *Manual on Membrane Lipids* 112–143 (1996). doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-79837-5_6.
113. Zalba, S. & ten Hagen, T. L. M. Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treat Rev* **52**, 48–57 (2017).
114. Preta, G. New Insights Into Targeting Membrane Lipids for Cancer Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.571237> (2020).

115. Nel, A. E. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials* vol. 8 543–557 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nmat2442> (2009).
116. Camacho, S. A. *et al.* Molecular-level effects on cell membrane models to explain the phototoxicity of gold shell-isolated nanoparticles to cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* **194**, (2020).
117. Dluhy, R. A., Cameron, D. G., Mantsch, H. H. & Mendelsohn, R. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Studies of the Effect of Calcium Ions on Phosphatidylserine¹. *Biochemistry* **22**, 6318–6325 (1983).
118. Camacho, S. A. *et al.* The efficiency of photothermal action of gold shell-isolated nanoparticles against tumor cells depends on membrane interactions. *Colloids Surf B Biointerfaces* **211**, (2022).
119. Pereira, L. S. A. *et al.* Evidence of photoinduced lipid hydroperoxidation in Langmuir monolayers containing Eosin Y. *Colloids Surf B Biointerfaces* **171**, 682–689 (2018).
120. Moreira, L. G. *et al.* Chain Cleavage of Bioinspired Bacterial Membranes Photoinduced by Eosin Decyl Ester. *Langmuir* **36**, 9578–9585 (2020).
121. Rodrigues, R. T. *et al.* Carbon Nanotubes and Algal Polysaccharides to Enhance the Enzymatic Properties of Urease in Lipid Langmuir-Blodgett Films. *Langmuir* **34**, 3082–3093 (2018).
122. González-Labrada, E., Schmidt, R. & DeWolf, C. E. Kinetic analysis of the ozone processing of an unsaturated organic monolayer as a model of an aerosol surface. *Physical Chemistry Chemical Physics* **9**, 5814–5821 (2007).
123. Trachootham, D., Alexandre, J. & Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 8 579–591 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrd2803> (2009).
124. Dix, T. A. & Aikens, J. *Mechanisms and Biological Relevance of Lipid Peroxidation Initiation*. *Chem. Res. Toxicol* vol. 6 (1993).
125. Zawisza, I. *et al.* Electrochemical and Photon Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy Study of the Electric Field Driven Transformations of a Phospholipid Bilayer Supported at a Gold Electrode Surface. *Biophys J* **85**, 4055–4075 (2003).
126. Mendelsohn, R., Mao, G. & Flach, C. R. Infrared reflection-absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* vol. 1798 788–800 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.11.024> (2010).
127. Itri, R., Junqueira, H. C., Mertins, O. & Baptista, M. S. Membrane changes under oxidative stress: The impact of oxidized lipids. *Biophysical Reviews* vol. 6 47–61 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0128-9> (2014).