

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

ALEXANDRE MENDES DE ALMEIDA JUNIOR

Fotossensibilização de sistemas miméticos de membrana celular induzida pelo
fenotiazínico azul de toluidina

Botucatu

2020

ALEXANDRE MENDES DE ALMEIDA JUNIOR

Fotossensibilização de sistemas miméticos de membrana celular induzida pelo
fenotiazínico azul de toluidina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Benites Aoki

Botucatu

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Almeida Junior, Alexandre Mendes de

Fotossensibilização de sistemas miméticos de membrana celular induzida pelo fenotiazínico azul de toluidina / Alexandre Mendes de Almeida Junior. -- Botucatu, 2020.

49 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Pedro Henrique Benites Aoki

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Filmes de Langmuir. 3. Azul de Toluidina. 4. Foto-oxidação. 5. Membrana bacteriana. I. Título.

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

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à minha família, meu pai Alexandre, minha mãe Edmeire, meu irmão Gabriel e meus avós Maria e Manoel, por todo o amor, carinho e incentivo aos objetivos que almejei ao longo de todos esses anos. Sem o apoio de vocês nada seria possível. Mesmo distante, sinto vocês próximos a mim todos os dias.

Agradeço ao meu orientador Pedro por toda ajuda, conselhos e ensinamentos durante todo o mestrado, que certamente contribuíram não só para o desenvolvimento deste projeto como também para meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço também por todo companheirismo e pela amizade.

Ao prof. Osvaldo (Chu) pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pela disponibilidade em ajudar na discussão dos resultados deste projeto. Também, agradeço à Debora por toda a ajuda com os equipamentos e sala-limpa.

Aos amigos e amigas, Lucas, Bryan, Bina, Maju e Mirella, por todo apoio no desenvolvimento da pesquisa, pela amizade que desenvolvemos durante esses anos em que trabalhamos juntos e pelos momentos de descontração, que sempre trouxeram alegria e motivação para seguir em frente.

Especialmente, agradeço à minha amiga e namorada, Amanda (Bud), por todo amor, compreensão e incentivo durante os momentos mais difíceis e, também, durante os momentos de grande alegria. Por toda a vibração nas minhas conquistas e pelo carinho e atenção nos momentos que mais precisei. Devo muito a você por ser a pessoa que sou hoje.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Resumo

O aumento alarmante da resistência bacteriana aos antibióticos exige novas estratégias para inativação microbiana, como a terapia fotodinâmica (TFD), cuja atividade depende dos danos fotodinâmicos induzidos à membrana do microrganismo. Neste trabalho, os mecanismos de adsorção do fotossensibilizador azul de toluidina-O (ATO) em modelos simplificados de membrana bacteriana baseados em filmes de Langmuir de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo(1'-rac-glicerol) (DOPG) foram correlacionados com os efeitos da oxidação lipídica fotoinduzida. A escolha destes fosfolipídios ocorreu por análise da composição lipídica das membranas celulares de bactérias Gram-negativas, onde há maior abundância de fosfatidiletanolaminas e fosfatidilglicerol. Monocamadas de Langmuir de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) foram utilizadas como referência as membranas de células mamíferas. As moléculas de ATO foram diluídas em água ultrapura e concentradas em soluções distintas de 10^{-4} e 10^{-5} mol/L. As isotermas de pressão superficial indicaram que o ATO expande as monocamadas de DOPC, DOPE e DOPG e as tornam mais estáveis sobre a superfície da subfase devido às interações eletrostáticas com os grupos carregados negativamente nos fosfolipídios, com uma adsorção mais forte no DOPG, que possui carga superficial líquida. Os espectros de espectroscopia vibracional de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS) corroboram essa hipótese ao apontar que os grupos fosfato aniônicos são os mais afetados ao interagir com o ATO catiônico. A irradiação tornou as monocamadas de DOPC e DOPE associadas ao ATO menos instáveis como resultado da reação de oxigênios singletos ($^1\text{O}_2$) com as insaturações das cadeias e a formação de hidroperóxidos. Por outro lado, a estabilidade reduzida na monocamada de DOPG irradiada em solução de ATO sugere a clivagem das cadeias alifáticas. A natureza aniônica do DOPG permitiu uma penetração do ATO na região das cadeias, favorecendo as reações dependentes de contato entre o estado tripleto excitado do ATO e as insaturações lipídicas ou grupos hidroperóxidos, que é a chave para as reações de clivagem e permeabilização da membrana.

Abstract

The alarming increase in bacterial resistance to antibiotics demand new strategies for microbial inactivation, which include photodynamic therapy (PDT) whose activity relies on the photoreaction damage to the microorganism membrane. In this work, the binding mechanisms of the photosensitizer toluidine blue-O (TBO) on simplified models of bacterial membrane with Langmuir monolayers of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DOPG) were correlated to the effects of the photoinduced lipid oxidation. These phospholipids were chosen analyzing the lipid composition of the cell membranes of Gram-negative bacteria, which has greater abundance of phosphatidylethanolamines and phosphatidylglycerol. Langmuir monolayers of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) were also used as a reference of mammalian membranes. The TBO molecules were diluted in ultrapure water and concentrated in different solutions of 10^{-4} and 10^{-5} mol/L. The surface pressure isotherms indicated that TBO expands DOPC, DOPE and DOPG monolayers and makes them more stable on the subphase surface owing to electrostatic interactions with the negatively charged groups in the phospholipids, with a stronger adsorption on DOPG, which has a net surface charge. Polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS) spectra corroborate this hypothesis by pointing out that anionic phosphate groups are the most affected when interacting with cationic TBO. Light irradiation made the TBO-containing DOPC and DOPE monolayers less unstable as a result of the singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) reaction with the chain unsaturation and hydroperoxide formation. In contrast, the decreased stability of the irradiated TBO-containing DOPG monolayers suggests the cleavage of carbon chains. The anionic nature of DOPG allowed a deeper penetration of TBO into the chain region, favoring contact-dependent reactions between the excited triplet state of TBO and lipid unsaturations or/and hydroperoxide groups, which is the key for the cleavage reactions and further membrane permeabilization.

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema representativo das moléculas e estruturas que compõem os compartimentos celulares de bactérias (a) Gram-positivas e (b) Gram-negativas	18
Figura 2. Representação dos mecanismos de ação da terapia fotodinâmica tipos I e II..	19
Figura 3. Esquema do sensor de Wilhelmy parcialmente imerso na subfase da cuba de Langmuir.	21
Figura 4. Representação gráfica das isotermas (π -A).....	23
Figura 5. (a) Fotografia retirada durante um experimento e (b) ilustração do sistema para espectroscopia PM-IRRAS sobre a cuba de Langmuir.	24
Figura 6. (a) Fotografia do equipamento durante microscopia de ângulo de Brewster. (b) Esquema da refração de uma luz não polarizada no ângulo de Brewster e (c) representação da refração e reflexão da luz polarizada sobre o ângulo de Brewster.....	25
Figura 7. Representação das estruturas moleculares do 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG) e azul de toluidina (ATO).	27
Figura 8. (a) Fotografia e (b) esquema do sistema experimental adotado para a irradiação das monocamadas lipídicas.	28
Figura 9. Isotermas π -A dos filmes de Langmuir de (a) DOPC, (b) DOPE e (c) DOPG em água ultrapura e soluções de ATO à 10^{-5} e 10^{-4} mol/L.	30
Figura 10. Dados coletados dos 3 ciclos de compressão (curva a direita – seta vermelha) e descompressão (curva a esquerda – seta verde) dos filmes de Langmuir de (a) DOPC, (b) DOPE e (c) DOPG em água ultrapura e solução de ATO à 10^{-5} mol/L.	31
Figura 11. Espectros PM-IRRAS das (a) cabeças hidrofílicas e das (b) cadeias hidrofóbicas de monocamadas de DOPE adquiridas à pressão constante de 30 mN/m em subfases de água ultrapura (preto) e solução de ATO a 10^{-5} mol/L, antes (azul) e após irradiação (vermelho). As inserções mostram a microscopias de ângulo de Brewster (BAM) adquiridas a 30 mN/m em água ultrapura e solução de ATO a 10^{-5} mol/L.	32

- Figura 12. Espectros PM-IRRAS das (a) cabeças hidrofílicas e das (b) cadeias hidrofóbicas de monocamadas de DOPC adquiridas à pressão constante de 30 mN/m em subfases de água ultrapura (preto) e solução de ATO a 10^{-5} mol/L, antes (azul) e após irradiação (vermelho). As inserções mostram microscopias de ângulo de Brewster (BAM) adquiridas a 30 mN/m em água ultrapura e solução de ATO a 10^{-5} mol/L. 34
- Figura 13. Espectros PM-IRRAS das (a) cabeças hidrofílicas e das (b) cadeias hidrofóbicas de monocamadas de DOPG adquiridas à pressão constante de 30 mN/m em subfases de água ultrapura (preto) e solução de ATO a 10^{-5} mol/L, antes (azul) e após irradiação (vermelho). As inserções mostram microscopias de ângulo de Brewster (BAM) adquiridas a 30 mN/m em água ultrapura e solução de ATO a 10^{-5} mol/L. 35
- Figura 14. Evolução da área relativa (A/A_o) de monocamadas irradiadas e não irradiadas de (a) DOPC, (b) DOPE e (c) DOPG em solução de ATO (10^{-5} mol/L), registrada a uma pressão de superfície constante de 30 mN/m. A_o é a área molecular média extrapolada em 30 mN/m. 36
- Figura 15. Representação esquemática da clivagem fotoinduzida das cadeias do DOPG, que leva à permeabilização da membrana. A inserção à direita fornece os detalhes de hidroperoxidação, clivagem de cadeia e dissolução de lipídios na subfase. 38
- Figura 16. Dados complementares das (a) isotermas π -A de monocamadas de CL em água ultrapura e soluções de ATO à 10^{-5} e 10^{-4} mol/L e da (b) evolução da área relativa (A/A_o) de monocamadas irradiadas e não irradiadas de CL em solução de ATO (10^{-5} mol/L), registrada a uma pressão de superfície constante de 30 mN/m. 42

Lista de Tabelas

- Tabela 1. Deslocamento relativo na área por lipídio $[(A_o-A)/A_o]$, onde A_o e A são a área extrapolada para pressão zero a partir de 30mN/m em água ultrapura e em soluções de ATO, respectivamente..... 30
- Tabela 2. Atribuições dos principais modos vibracionais dos espectros de DOPC, DOPE e DOPG, incluindo com as alterações induzidas pela adsorção de ATO e posterior irradiação. 33

Sumário

1. Introdução	13
2. Revisão Bibliográfica	16
2.1. Classificação das bactérias	16
2.1.1. Gram-positivas	16
2.1.2. Gram-negativas	17
2.2. Terapia Fotodinâmica (TFD)	18
2.3. Filmes de Langmuir	19
2.4. Espectroscopia vibracional de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS)	23
2.5. Microscopia de ângulo de Brewster (BAM)	24
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Reagentes	27
3.2. Filmes de Langmuir	27
4. Resultados e Discussões	29
4.1. Interação do ATO com filmes de Langmuir de DOPC, DOPE e DOPG	29
4.2. Fotoativação do ATO	35
5. Conclusão	39
6. Considerações finais e perspectivas	40
7. Apêndice	42
8. Referências	43

Siglas

ATO	azul de toluidina
BAM	microscopia de ângulo de Brewster
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOPG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)
EROs	espécies reativas de oxigênio
FS	fotossensibilizador
LPS	lipopolissacarídeos
ME	membrana externa
PM-IRRAS	espectroscopia vibracional de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada
TFD	terapia fotodinâmica

1. Introdução

O crescente número de casos de doenças causadas por bactérias resistentes a antibióticos é alarmante na área da saúde pública¹, uma vez que a velocidade de surgimento destes organismos é maior que o tempo estimado para o desenvolvimento de novos fármacos². O uso indiscriminado de antibióticos é um dos principais fatores que proporcionam o surgimento da resistência, não se restringindo apenas a automedicação, mas também na utilização indisciplinada de antibióticos na agricultura e pecuária^{3,4}. Além disso, outros fatores como o ambiente, o hospedeiro, as propriedades intrínsecas, as mutações espontâneas e a transferência de genes e fagos também são responsáveis pelo aprimoramento bacteriano a resistir à ação farmacológica⁵.

As diferenças morfológicas entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são suficientes para que certos antibióticos possuam ação bactericida restrita a microrganismos específicos⁶. Devido à presença de uma membrana externa (ME) à estrutura da parede celular, as bactérias Gram-negativas são, no geral, menos susceptíveis à ação antibiótica do que as Gram-positivas^{7,8}. Essa ME é composta majoritariamente por lipopolissacarídeos (LPS), cuja função biológica é de servir como uma barreira física auxiliar, capaz de proporcionar maior seletividade às moléculas externas que efetivamente alcançarão a porção intracelular. Esta propriedade associada com os genes de resistência adquirida pode proporcionar o surgimento de super resistência⁹ as Gram-negativas, o que implica na necessidade de métodos alternativos de tratamento capazes de promover a inativação bacteriana¹⁰⁻¹².

Neste cenário, a terapia fotodinâmica (TFD) tem demonstrado ser uma modalidade terapêutica promissora, uma vez que sua eficiência não depende dos mecanismos de internalização via proteínas porinas, agindo preferencialmente através de danos fotoinduzidos nas estruturas biológicas¹³. De fato, a TFD tem se provado eficiente na inativação de diversos tipos de bactérias, além de outros organismos, como fungos¹⁴ e protozoários¹⁵. A TFD consiste na administração controlada de fotossensibilizadores (FS) em ambiente rico em oxigênio, os quais são posteriormente fotoativados por meio de uma fonte de luz apropriada. O FS excitado no estágio de tripleto reage com as moléculas de oxigênio circulantes e formam oxigênios singletos ($^1\text{O}_2$), um agente citotóxico capaz de oxidar estruturas biológicas como proteínas, organelas, ácidos

nucleicos e fosfolipídios¹⁶⁻²⁰. O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ é relativamente curto ($\sim 10^{-6}$ s), permitindo que os processos oxidativos ocorram em uma área localizada, já que a capacidade de difusão dessas moléculas é limitada a uma distância média de 1×10^{-7} m²¹. Assim, o controle sobre a localização do FS é fator determinante para a eficiência da TFD, culminando na constante busca por FS capazes de interagir especificamente com um alvo definido.

O FS azul de toluidina-o (ATO) é uma molécula catiônica pertencente ao grupo dos fenotiazínicos e empregada em diversas aplicações, como corante para coloração metacromática²², para a conversão e estocagem de energia²³ e em terapias clínicas²⁴. Além disso, possui propriedades desejáveis para sua implementação na terapia fotodinâmica, como o baixo custo, hidrofiliabilidade, baixa toxicidade a células mamíferas²⁵, alto rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi^1\text{O}_2\Delta = 0,86$)²⁶, baixa energia de excitação ($\lambda = 630$ nm) e afinidade a ácidos nucleicos nas estruturas de DNA²⁷ e nas membranas de lipopolissacarídeos²⁸. Estudos anteriores demonstraram a eficiência do ATO na inativação de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como *Escherichia coli*²⁹ e *Staphylococcus aureus*²⁶, respectivamente. Como mecanismo de ação, espera-se que as moléculas de ATO se associem as membranas plasmáticas das bactérias e produza $^1\text{O}_2$ como produto da fotoativação, resultando em modificações estruturais nos fosfolipídios que promoverão alterações na permeabilidade citoplasmática e desencadearão a morte celular³⁰. Entretanto, a falta de informação sobre os mecanismos de interação do ATO e, conseqüentemente, os efeitos da fotoativação sobre as estruturas biológicas destes microrganismos ainda são fatores limitantes para a TFD, restringindo o aprimoramento da técnica na inativação bacteriana.

Neste trabalho, monocamadas de Langmuir de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo- (1'-rac-glicerol) (DOPG) foram empregadas como modelos simplificados de membrana bacteriana para desvendar o mecanismo de interação com o ATO e os efeitos da oxidação lipídica fotoinduzida. O fosfolipídio 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) foi empregado como referência de membrana celular de mamíferos. As isotermas de pressão de superfície (π -A) permitiram avaliar a adsorção do ATO nas monocamadas e efeitos posteriores da foto-oxidação. A morfologia dos filmes foi analisada por microscopia de ângulo de Brewster (BAM), e a interação em nível molecular entre o

ATO e os fosfolipídios foi identificada pela espectroscopia vibracional de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS). Como demonstraremos, as interações em nível molecular entre os fosfolipídios ATO modulam o resultado das reações fotoquímicas sobre as membranas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Classificação das bactérias

As bactérias são microrganismos unicelulares, procariontes e podem ser classificadas quanto ao formato que assumem, como os cocos (oval), bacilos (bastão), vibrões (bastões curvos) e espiraladas (espiral). Além disso, também podem ser classificadas quanto à complexidade de suas estruturas morfológicas, que influenciam na capacidade de sobrevivência destes organismos em ambientes diversos (Figura 1). Gram-positivas e Gram-negativas são as denominações dadas em razão dos experimentos de coloração bacteriana realizada por Hans Christian Gram, em 1884³¹. As diferenças estruturais entre estes microrganismos são responsáveis por permitir uma maior absorção e aderência do cristal de violeta na parede celular em alguns grupos de bactérias (Gram-positivas) enquanto outras não são coradas (Gram-negativas), pois não retém o corante após o processo de lavagem. Somente na etapa de recoloração, as Gram-negativas passam a ser coradas devido a adição de safranina, o que dá a característica avermelhada para a cultura celular enquanto as Gram-positivas permanecem na coloração roxa.

2.1.1. Gram-positivas

As bactérias Gram-positivas são microrganismos formados basicamente por 3 principais compartimentos celulares: o citosol, a membrana citoplasmática e a parede celular³². O citosol é a região que preenche a porção intracelular das bactérias, local onde se encontra o material genético e onde ocorrem diversas reações metabólicas para a manutenção e sobrevivência celular. Envolto ao citosol está a membrana citoplasmática, formada majoritariamente por fosfolipídios estruturais, proteínas e oligossacarídeos, que delimita e protege a porção intracelular do meio extracelular, promovendo a permeabilidade seletiva³³. Por último, a parede celular recobre a membrana plasmática, promovendo a formação de um exoesqueleto rígido e espesso, cuja função é proteger a célula contra choques mecânicos e lise osmótica³⁴. Essa estrutura é formada majoritariamente por moléculas de peptidoglicanos associadas a estruturas acessórias diversas, como ácidos teicóicos, que auxiliam e impedem a adsorção de determinadas moléculas em direção ao meio intracelular³⁵. Ambas as

estruturas da parede celular e membrana plasmática compõem o envelope celular das bactérias. Um esquema representativo das estruturas que compõem os compartimentos celulares de bactérias Gram-positivas é mostrado na Figura 1a.

Ainda que a parede celular funcione como uma barreira física entre o meio intra e extracelular, a sua capacidade seletiva de adsorções molecular é facilmente vencida por moléculas de até 50 kDa³⁶. Isso porque a estrutura possui pequenos poros, de tamanhos e formas diversas, capazes de conduzir moléculas e íons para o interior da bactéria. Por essa razão, as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a ação farmacológica de antibióticos, uma vez que grande parte destes medicamentos consegue vencer as barreiras intrínsecas destes microrganismos e efetivamente alcançarem o sítio de ligação que promove a inativação bacteriana⁶.

2.1.2. Gram-negativas

As bactérias Gram-negativas são formadas pelos mesmos 3 compartimentos presentes nas Gram-positivas com a adição de uma membrana externa (ME), que engloba as demais estruturas³⁷, conforme exibido na Figura 1b. A ME é uma bicamada heterogênea assimétrica, onde a região externa é composta majoritariamente por lipopolissacarídeos (LPS) enquanto a região interna é formada por fosfolipídios de membrana³⁸. A composição dos fosfolipídios presentes na ME é semelhante a membrana plasmática interna, sendo composta majoritariamente por fosfatidiletanolaminas, seguida por fosfatidilglicerol e, em menor quantidade, cardiolipina^{39,40}. A estrutura está ligada covalentemente à parede celular bacteriana por meio de lipoproteínas. A parede celular nas Gram-negativas é menos espessa e mais complexa que nas bactérias Gram-positivas³⁷, sendo formada por moléculas de peptidoglicano, associadas a vários polissacarídeos, proteínas e lipídios.

A presença da ME como parte do envelope celular é o que garante uma maior resistência destes microrganismos a ação dos antibióticos. Os LPS ancorados na estrutura define um fator de resistência intrínseca para estes microrganismos, responsáveis por impedir a adsorção de antibióticos e outras moléculas lipofílicas em direção ao interior da célula⁹. Sendo assim, o transporte de substâncias do meio extracelular para o intracelular é restrito a ação de proteínas transmembranas associadas

a ME, denominadas porinas. A molécula de LPS convencional pode ser dividida em 3 compartimentos distintos, sendo estes polissacarídeos, oligossacarídeos e lipídios A. Os polissacarídeos e oligossacarídeos formam cadeias laterais repetidas e estão voltadas para a porção mais externa da célula. Por outro lado, os lipídeos A são responsáveis pelas propriedades tóxicas das bactérias, uma vez que auxiliam no processo de infecção de Gram-negativas em mamíferos⁴¹.

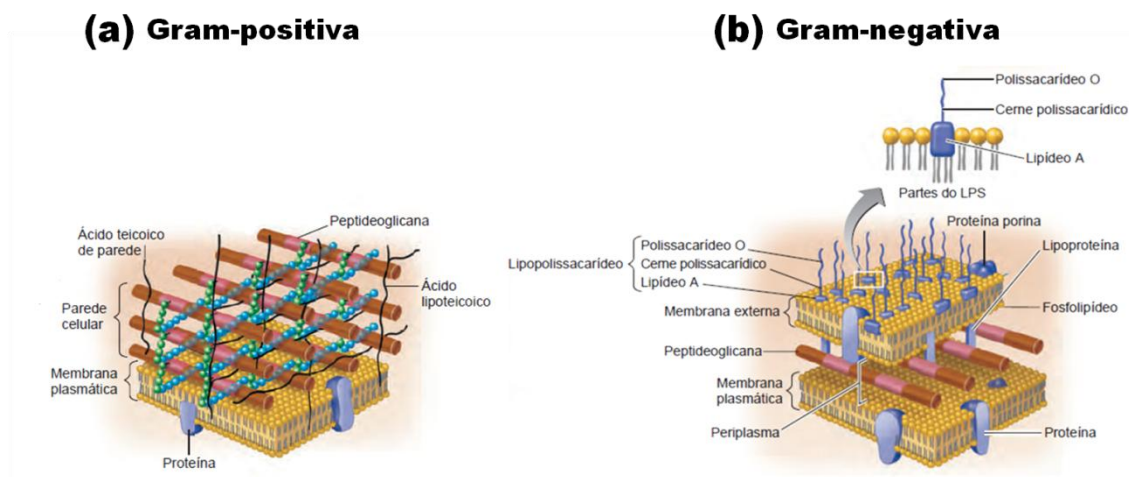


Figura 1. Esquema representativo das moléculas e estruturas que compõem os compartimentos celulares de bactérias (a) Gram-positivas e (b) Gram-negativas. Fonte: Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE⁴²

2.2. Terapia Fotodinâmica (TFD)

A TFD emerge como um método promissor na inativação microbiana, tendo em vista o atual cenário de resistência destes microrganismos aos antibióticos. Relatos históricos apontam que civilizações antigas, como gregas e egípcias, já empregavam a técnica para tratamentos de doenças tóxicas⁴³. A partir do século XIX, a fototerapia conquistou maior notoriedade através dos estudos de Arnold Rikli, sobre os benefícios terapêuticos da luz solar⁴⁴. O progresso obtido nos anos seguintes permitiu que a TFD fosse aplicada no tratamento de células tumorais e de infecções microbianas⁴⁵⁻⁴⁷. A TFD consiste na indução de estresse oxidativo sobre estruturas biológicas a partir de espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas pela fotoativação de um FS. Basicamente, a absorção da radiação pelo FS elevam os elétrons da nuvem eletrônica a orbitais mais energéticos, atingindo assim o estágio singlete de excitação, como esquematizado no diagrama da Figura 2¹⁹. O FS excitado é bastante instável, retornando

ao seu nível fundamental pela emissão de fluorescência. Eventualmente, as moléculas excitadas podem sofrer a inversão do spin de um elétron em seu orbital mais energético, permitindo o cruzamento intersistema para o estágio tripleto de excitação. O tempo de vida neste estágio é maior, favorecendo a interação com o oxigênio molecular (O_2), gerando as EROs⁴⁸. Esse processo pode ocorrer pelos mecanismos do tipo I e II, onde no primeiro a excitação se dá pela transferência de elétrons do FS para o O_2 , enquanto no segundo apenas a energia de excitação é transferida para o oxigênio molecular¹⁶. Como produtos, as reações de tipo I produzem radicais livres, tais como hidroxilas (OH^-), superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) enquanto as reações de tipo II geram oxigênio singlete (1O_2). As moléculas de 1O_2 são mais citotóxicas e reativas, sendo assim o principal produto para a TFD⁴⁹. Recentemente, foi demonstrado que a hidroperoxidação em modelos de membranas de mamíferos é o resultado mais provável das reações de foto-oxidação na região das insaturações da cauda alifática de fosfolípidios^{50,51}. No entanto, a falta de informação em nível molecular sobre os mecanismos de adsorção do ATO e os efeitos subsequentes da hidroperoxidação lipídica sobre membranas bacterianas ainda são limitações a serem superadas para que se possa explorar todo potencial da TFD para inativação de microrganismos.

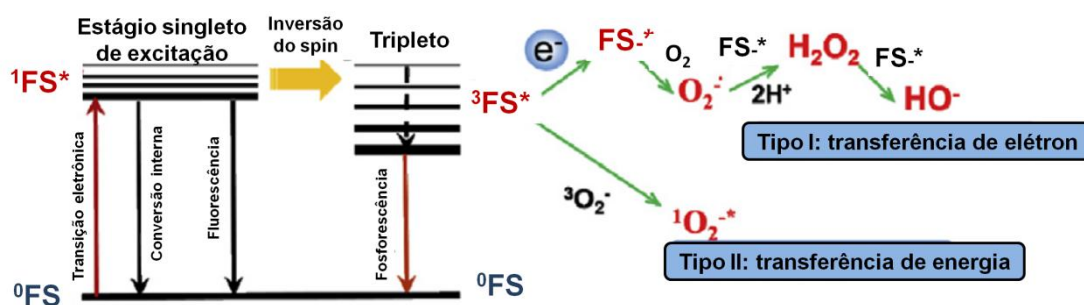


Figura 2. Representação dos mecanismos de ação da terapia fotodinâmica tipos I e II.
 Fonte: Adaptada de GAIA et al.⁴⁹

2.3. Filmes de Langmuir

Diante da complexidade das membranas celulares das bactérias, os estudos de interação e foto-oxidação da TFD são dificultados em modelos *in vitro*, tendo em vista a heterogeneidade, as dimensões e a anisotropia dessas estruturas. Portanto, são necessários métodos adequados não apenas para mimetizar a membrana lipídica

bacteriana, mas também para fornecer informações em nível molecular. Nesse contexto, os filmes de Langmuir têm se mostrado modelos eficientes de membranas de bactérias Gram-positivas⁵² e Gram-negativas⁵³ devido ao controle do empacotamento lateral e da composição lipídica⁵⁴⁻⁵⁹. Por exemplo, os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos foram acessados com sucesso em modelos de Langmuir de *Staphylococcus aureus*⁵², *Streptococcus mutan*^{60,61}, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*⁵³ e *Escherichia coli*.⁶²

A fabricação de filmes ultrafinos exige a utilização de moléculas que apresentem um equilíbrio entre os grupos hidrofílico e hidrofóbico, para que estes filmes sejam formados sobre a interface ar/água. Os grupos hidrofílicos permitem o espalhamento das moléculas na superfície da água, enquanto os grupos hidrofóbicos não permitem que as moléculas submerjam. Basicamente, uma solução contendo o material em solvente orgânico altamente volátil é espalhada sobre a subfase de água ultrapura e, após a evaporação do solvente, as moléculas do material são comprimidas por barreiras móveis formando a estrutura 2D da monocamada de Langmuir. A caracterização dos filmes é realizada por meio de isotermas de pressão de superfície (π) pela área molecular média (A), por meio das quais é possível obter informações importantes quanto a reorientação molecular e transições de fases do filme durante a compressão das barreiras. O cálculo da tensão superficial é dado pela tensão superficial da subfase (γ_0), no geral água ultrapura, e a tensão superficial da subfase acrescida com as moléculas (γ) que irão compor o filme, conforme mostra a fórmula:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

Especificamente, a pressão de superfície (π) é medida através do método de Wilhelmy, onde o sensor é imerso parcialmente na subfase, conforme mostrado na Figura 3. A tensão de superfície é responsável por manter o sensor imerso e sobre ele atuam as forças peso (P) e tensão de superfície (T) no sentido para baixo e empuxo (ξ) no sentido para cima. A força resultante (F_r) é equivalente a tração sobre o fio ligado a eletrobalança, conforme mostra a equação 1. Tais forças podem ser decompostas em função dos parâmetros do sensor, como densidade (ρ), comprimento (l), largura (w) e espessura (t). Além destes parâmetros, outras condições medidas experimentalmente compõem a medida das forças que atuam sobre o sensor, tais como o comprimento da

porção imersa na subfase (h), a aceleração da gravidade (g), a tensão superficial (γ_a) e a densidade (ρ_a) da água, como mostram as equações 2, 3 e 4^{63,64,65}.

$$Fr = P + T - \xi \quad \text{Eq. (1)}$$

$$P = \rho g l w t \quad \text{Eq. (2)}$$

$$T = 2 (w + t) \cos \theta \gamma_a \quad \text{Eq. (3)}$$

$$\xi = \rho_a g h w t \quad \text{Eq. (4)}$$

$$Fr = \rho g l w t + 2 (w + t) \cos \theta \gamma_a - \rho_a g h w t \quad \text{Eq. (5)}$$

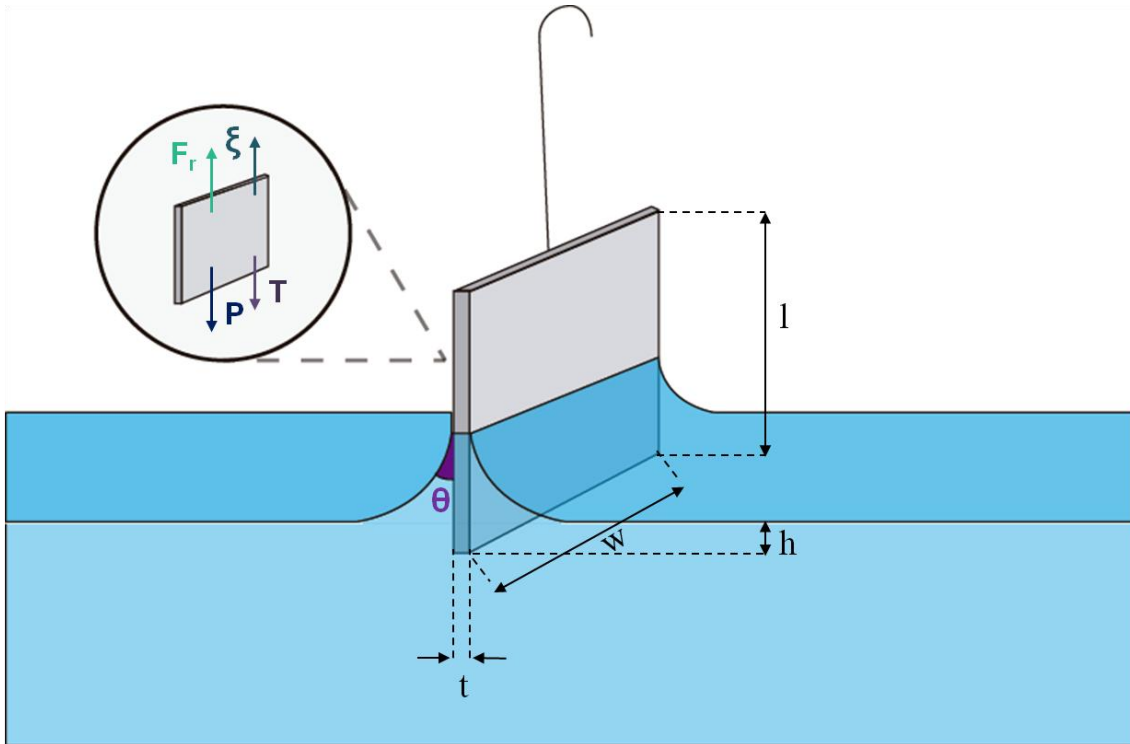


Figura 3. Esquema do sensor de Wilhelmy parcialmente imerso na subfase da cuba de Langmuir.

A força resultante (F_r) que atua sobre o sensor pode ser calculada a partir dos termos indicados pela equação 5. O ângulo de contato formado entre a placa e a subfase é muito pequeno⁶⁵, assim o valor de $\cos \theta$ na fórmula é substituída por 1. Esta condição é obedecida devido à alta energia superficial livre característica da placa de platina e, por isso, é importante mantê-la suficientemente limpa durante a execução dos experimentos. Outro fator que contribui para a diminuição do ângulo formado entre a placa e a subfase é o sensor estar completamente molhado⁶³.

As forças empuxo (ξ) e peso (P) são constantes que dependem da dimensão da placa, volume de água deslocado sobre o sensor, aceleração da gravidade e das densidades da placa e da água. Sendo assim, a força resultante (F_r) pode ser simplificada às variações da tensão superficial sobre o sensor parcialmente imerso em subfase de água ultrapura (T_a) e em subfase acrescida com a monocamada (T_m).

$$Fr = T_a - T_m \quad \text{Eq. (6)}$$

$$Fr = 2(w + t)\gamma_a - 2(w + t)\gamma \quad \text{Eq. (7)}$$

Finalmente, a equação pode ser simplificada da seguinte forma:

$$\pi = -\Delta\gamma = -\frac{Fr}{2(w+t)} = -\frac{Fr}{2w}, \text{ se } w \gg t \quad \text{Eq (8)}$$

No caso do sensor de platina, a espessura (t) é muito menor que a largura da placa (w), o que permite simplificar a equação. As monocamadas também podem ser mantidas a uma pressão constante, funcionando como um controle para que o sistema estabeleça uma relação entre as medidas do sensor e a área molecular ocupada pelos lipídios entre as barreiras. Essa função também é importante os experimentos de estabilidade dos filmes.

A fluidez das monocamadas pode variar em função da temperatura, por isso são produzidas em ambiente controlado para que os resultados obtidos sejam precisos. A Figura 4 apresenta alguns exemplos de isotermas de pressão de superfície em função das áreas ocupadas por diferentes moléculas, onde é possível identificar as transições de fases durante a compressão das barreiras. Em maiores áreas, verifica-se a fase gasosa (G) do filme, onde as moléculas estão dispersas e distantes entre si sobre a superfície da subfase e, conseqüentemente, a pressão de superfície é próxima a zero⁵⁵. Com a compressão das barreiras dá se início a fase líquida expandida (LE), indicando o inicio das interações intermoleculares que aumentam a pressão de superfície, ainda que haja grande desordem e fluidez da monocamada⁶⁶. Em alguns casos, as isotermas podem apresentar um platô logo no início da inclinação da curva, indicando o momento de transição entre as fases LE e líquida condensada (LC)⁶³. No caso de filmes de fosfolipídios insaturados, essa transição não é evidente, sendo assim comumente indicada apenas como fase líquida (L). Ao longo da compressão, moléculas tornam-se mais compactadas e ordenadas, alcançando as fases LC e sólida (S)⁶⁷. Por fim, o limite de interação suportado pela monocamada é vencido com a continuidade da compressão

e, dependendo da estrutura molecular sobre a subfase, pode ocorrer a perda da conformação 2D para a forma 3D, onde as moléculas passam a sobrepor umas as outras, ou até causar a desordem completa das moléculas sobre a superfície da água. Este é o ponto ou pressão de colapso (π_c).

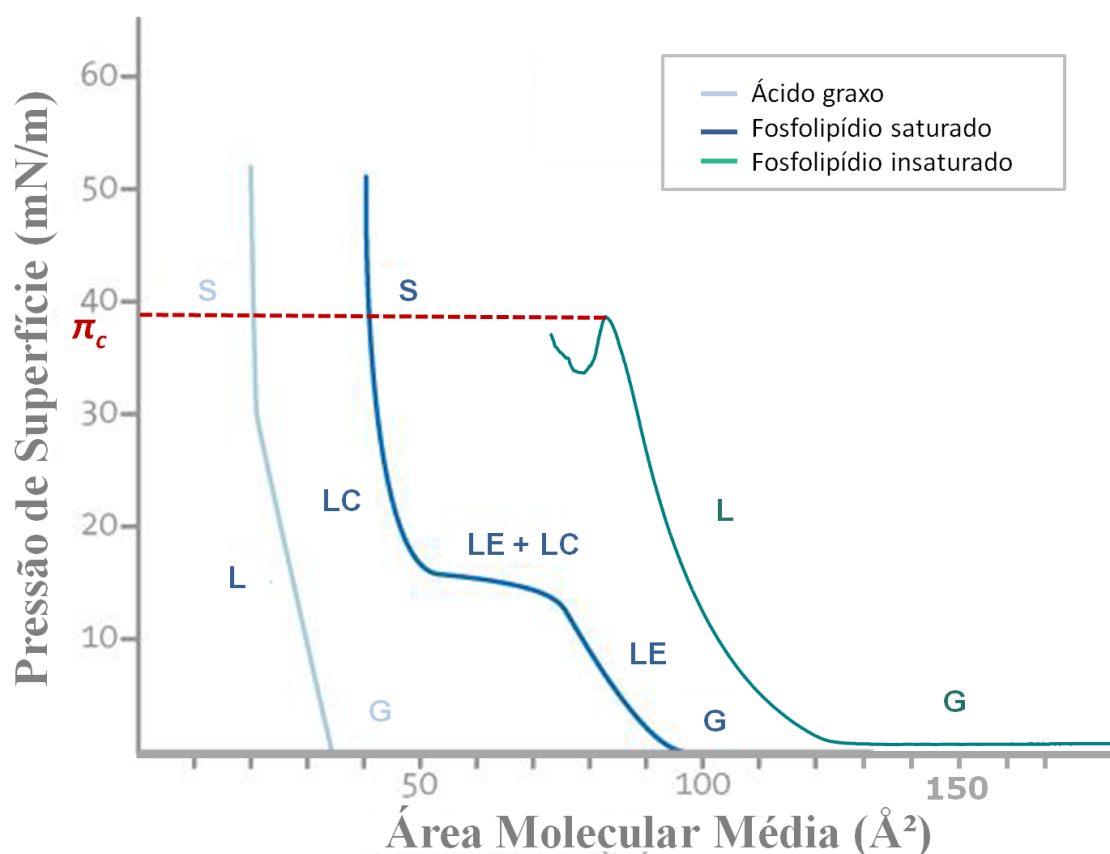


Figura 4. Representação gráfica das isotermas (π -A). Fonte: adaptada de BIOLIN SCIENTIFIC⁶³.

2.4. Espectroscopia vibracional de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS)

A espectroscopia vibracional PM-IRRAS é específica para interfaces e comumente empregada para avaliar modificações nas ligações interatômicas dos fosfolípídios que compõem uma monocamada sobre a interface ar/água. O comprimento de onda utilizado está na faixa do infravermelho (IR), entre 2,5 μm e 25 μm . A absorção desta radiação equivale as frequências específicas das vibrações de estiramento e dobramento

das ligações da molécula, onde a energia absorvida é responsável pelo aumento da amplitude da vibração da ligação⁶⁸. Quando o feixe de luz no IR incide em ângulos rasantes (por volta de 80°), o campo elétrico da luz é polarizado na superfície refletora, permitindo a realização de medidas mesmo para filmes muito finos. Além disso, a polarização da luz incidente é alternada nas direções perpendicular (p) e paralela (s) à superfície, com frequência da ordem de dezenas de kHz, a fim de diminuir a ocorrência da interferência de outras moléculas adjacentes à amostra, como os gases circulantes e as moléculas presentes em subfase aquosa⁶⁹. O espectro resultante é a medida da refletividade (R) de ambas as polarizações R_p e R_s , resultando na refletividade diferencial (D) que pode ser calculada por $D=(R_p-R_s)/(R_p+R_s)$. Uma fotografia retirada durante um experimento e um esquema do sistema utilizado na espectroscopia PM-IRRAS são mostrados nas Figuras 5a e 5b, respectivamente.

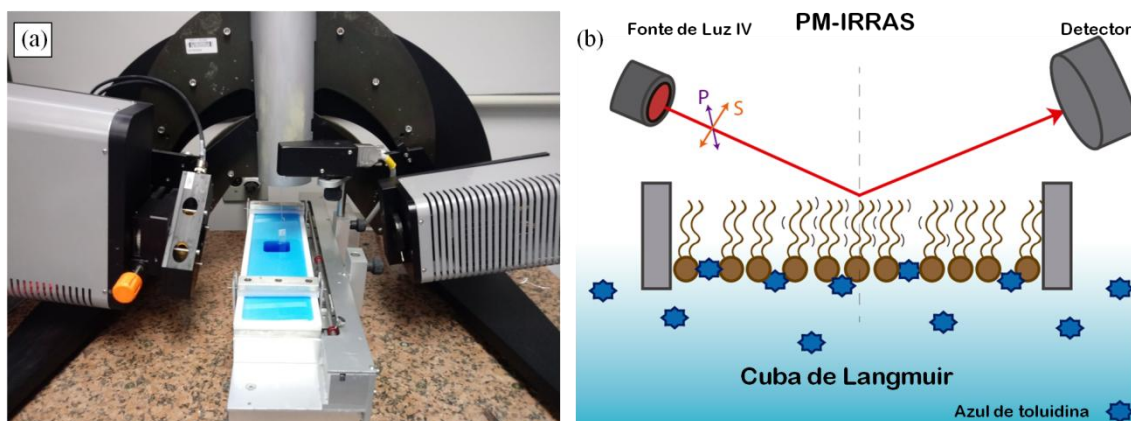


Figura 5. (a) Fotografia retirada durante um experimento e (b) ilustração do sistema para espectroscopia PM-IRRAS sobre a cuba de Langmuir.

2.5. Microscopia de ângulo de Brewster (BAM)

A microscopia de ângulo de Brewster é uma técnica utilizada para o estudo de filmes ultrafinos em subfase líquida para observações de homogeneidade do filme, de mudanças e separação de fases⁷⁰, da existência e do tamanho dos domínios⁷¹, além da forma e empacotamento das estruturas analisadas. A técnica se baseia na refletividade da luz polarizada incidida sobre a amostra, correlacionando à fração da intensidade da luz refletida pela intensidade da luz incidente sobre a interface. A refletividade vai depender da polarização da luz incidente e do ângulo de incidência do feixe de luz, este

denominado ângulo de Brewster. Para a realização do experimento, o equipamento está acoplado a uma cuba de Langmuir, conforme ilustra a Figura 6a.

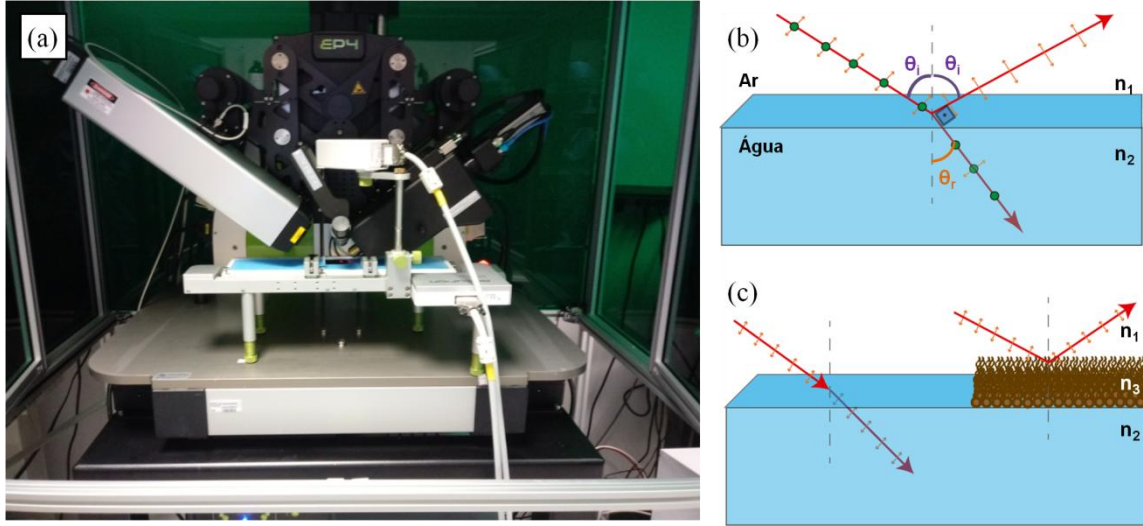


Figura 6. (a) Fotografia do equipamento durante microscopia de ângulo de Brewster. (b) Esquema da refração de uma luz não polarizada no ângulo de Brewster e (c) representação da refração e reflexão da luz polarizada sobre o ângulo de Brewster.

O ângulo de Brewster é a condição para que uma luz não polarizada incida sobre dois meios de diferentes índices de refração (n_1 e n_2) e o ângulo de incidência seja ideal para que o feixe de luz refletido se torne polarizado e perpendicular aos raios refratados, conforme esquema da Figura 6b. Sobre essa condição, é possível correlacionar os ângulos formados pela incidência e reflexão da luz (Eq.9) com a equação da refração da luz proposta por Snell (Eq. 10), conforme equação 11. De maneira mais simplificada, o ângulo de Brewster pode ser calculado através da equação 12.

$$\theta_r = 90^\circ - \theta_i \quad \text{Eq.9}$$

$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_r \quad \text{Eq.10}$$

$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin (90^\circ - \theta_i) = n_2 \cos \theta_i \quad \text{Eq.11}$$

$$\tan \theta_i = \frac{n_2}{n_1} \quad \text{Eq.12}$$

O ângulo de Brewster foi definido em aproximadamente 52° , considerando os valores do índice de refração do ar ($n=1$), da água ($n=1,33$) e irradiação com comprimento de onda de 658 nm ⁷². Nenhuma reflexão ocorrerá quando a luz polarizada

perpendicularmente a interface incidir no ângulo de Brewster sobre a superfície da água pura, como mostrado na Figura 6c. Somente a presença de um filme ultrafino sobre a interface ar-água permitirá a refletividade da luz, pois neste caso o índice de refração da monocamada é diferente da água⁷³. Assim, a luz refletida captada pela lente do microscópio irá visualizar apenas aquilo que estiver sobre a superfície da subfase, o que permitirá uma análise morfologia da monocamada lipídica.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Os fosfolipídios 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-fosfoetanolamina (DOPE) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG) foram comprados da Avanti Polar Lipids Inc. A escolha dos fosfolipídios DOPE e DOPG seguiram a composição lipídica encontrada nas membranas celulares de bactérias Gram-negativas, enquanto o DOPC foi empregado como referência as células mamíferas. A preferência por trabalhar com fosfolipídios insaturados se deu pela influência das reações de foto-oxidação na região das duplas ligações entre carbonos. Todos os lipídios adquiridos possuíam pureza acima de 99%, portanto, não houve necessidade de purificação prévia para realização dos experimentos. Soluções estoque foram preparadas com a dissolução dos fosfolipídios em clorofórmio (Sigma-Aldrich) na concentração de 10^{-3} mol/L. O fotossensibilizador azul de toluidina-o (ATO) foi adquirido da Sigma-Aldrich Inc e também foi utilizado sem purificação prévia. Para a realização do experimento, o FS puro foi diluído em água ultrapura com resistividade de $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ obtida em purificador Milli-Q (Direct-Q 3UV) nas concentrações de 10^{-5} e 10^{-4} mol/L. Todas as estruturas moleculares estão representadas na Figura 7.

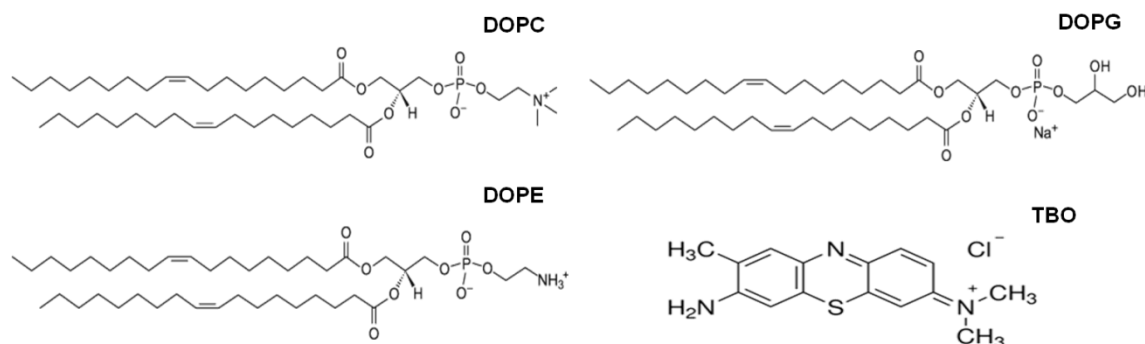


Figura 7. Representação das estruturas moleculares do 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG) e azul de toluidina (ATO).

3.2. Filmes de Langmuir

Os filmes foram produzidos em cuba de Langmuir do modelo KSV-NIMA/ KN 2002 da KSV Instruments (Finlândia). Com o auxílio de uma microsseringa, a solução lipídica foi espalhada em volumes de 20 a 50 μL sobre a superfície da subfase de água

ultrapura (pH 5.8) e em subfase de ATO à 10^{-5} e 10^{-4} mol/L. Deixou-se o solvente evaporar durante 15 minutos antes da compressão simétrica (5 mm/min) das barreiras. A pressão superficial (π) foi obtida pelo método de Wilhelmy. Todas as medidas foram realizadas em ambiente controlado de temperatura, mantida em $23 \pm 1^\circ \text{C}$. Foram realizadas pelo menos três experimentos e a dispersão nas pressões superficiais foi de no máximo $\pm 2 \text{ mN/m}$ para uma determinada área por molécula. Para os experimentos de irradiação, uma fonte de LED (KLight IP66-50W / multicolor) foi posicionada 20 cm acima da monocamada, mantida a uma pressão superficial constante de 30 mN/m, em subfase de água ultrapura e ATO a 10^{-5} mol/L. Uma fotografia e um esquema do sistema experimental são mostrados nas Figuras 8a e 8b, respectivamente.

Os experimentos de espectroscopia vibracional de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS) foram realizados (KSV PMI550) com um ângulo de incidência de 81° e 8 cm^{-1} de resolução. Os espectros foram obtidos na pressão de 30 mN/m em água ultrapura e solução de ATO a 10^{-5} mol/L, antes e após a irradiação. A reprodutibilidade dos espectros foi checada para assegurar que as mudanças nas bandas observadas estão relacionadas à adsorção do ATO e posterior foto-oxidação. As imagens de microscopia do ângulo de Brewster foram retiradas em microscópio modelo Accurion (Nanofilm EP4) acoplado a cuba de Langmuir, possibilitando análises em tempo real dos domínios lipídios em água ultrapura e solução de ATO. As condições experimentais, tais como as soluções dos fosfolipídios em clorofórmio, taxa de compressão das barreiras e temperatura ambiente, foram as mesmas descritas para as isotermas de pressão de superfície.

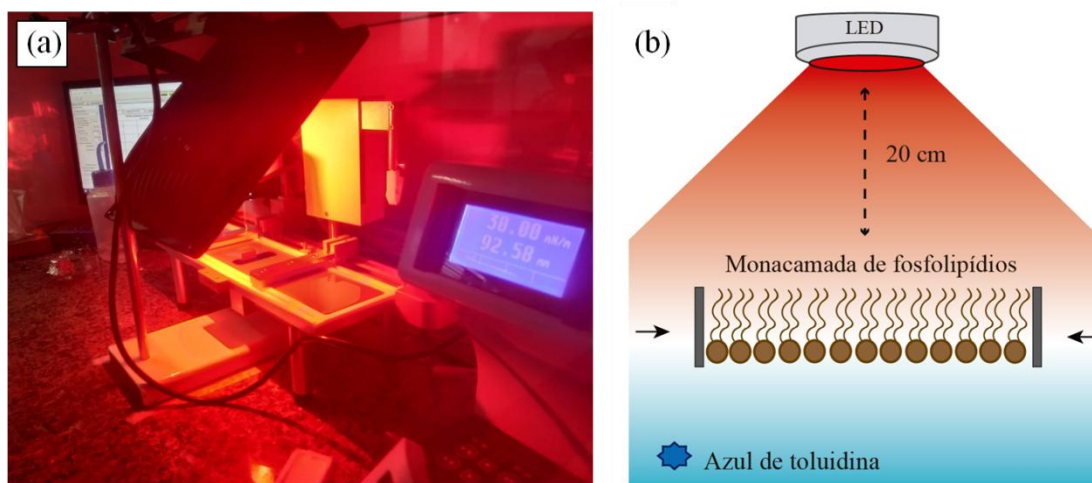


Figura 8. (a) Fotografia e (b) esquema do sistema experimental adotado para a irradiação das monocamadas lipídicas.

4. Resultados e Discussões

4.1. Interação do ATO com filmes de Langmuir de DOPC, DOPE e DOPG

As isotermas obtidas para monocamadas de DOPC, DOPE e DOPG em subfase de água ultrapura e diferentes soluções de ATO (10^{-5} e 10^{-4} mol/L) são mostradas nas Figuras 9a, 9b e 9c, respectivamente. As moléculas de ATO não possuem atividade superficial e não formam filmes de Langmuir. O aumento na concentração de ATO de 10^{-5} para 10^{-4} mol/L causa um deslocamento nas isotermas de π -A em direção a maiores áreas moleculares. Na concentração de 10^{-5} mol/L, os deslocamentos em área relativa por lipídio [$(\frac{A_o - A}{A_o})$] mostrados na Tabela 1 aumentam das monocamadas de DOPC para DOPE e DOPG, o que pode indicar um número crescente de moléculas de ATO adsorvidas nas monocamadas. Enquanto deslocamentos semelhantes na Tabela 1 podem sugerir uma saturação do número de moléculas de ATO que realmente interagem com as monocamadas de DOPC e DOPE em 10^{-4} mol/L, o maior deslocamento do DOPG indica que maiores quantidades de ATO foram adsorvidas na monocamada, impulsionadas por interações moleculares mais fortes. Os fosfolipídios DOPC ($T_f = -17^\circ\text{C}$), DOPE ($T_f = -16^\circ\text{C}$) e DOPG ($T_f = -18^\circ\text{C}$) estão na fase fluida à temperatura ambiente (23°C) e, portanto, deve-se esperar uma maior dificuldade em se alcançar cadeias fortemente empacotadas nos filmes de Langmuir produzidos⁷⁴. A incorporação do ATO seria então facilitada, como observado em experimentos com derivados xantênicos^{50,51}. Como as cadeias insaturadas dos fosfolipídios são similares, os diferentes mecanismos de interação com as moléculas de ATO devem estar associados às cabeças polares. De fato, o ATO catiônico⁷⁵ deve estabelecer uma interação eletrostática atrativa mais forte com o fosfatidilglicerol aniônico do DOPG do que com os zwitteriônicos fosfatidiletanolamina do DOPE e da fosfatidilcolina do DOPC. Um comportamento similar foi observado para o fotossensibilizador catiônico do azul de metileno, que também teve um efeito maior na monocamada aniônica de DPPG^{76,77}.

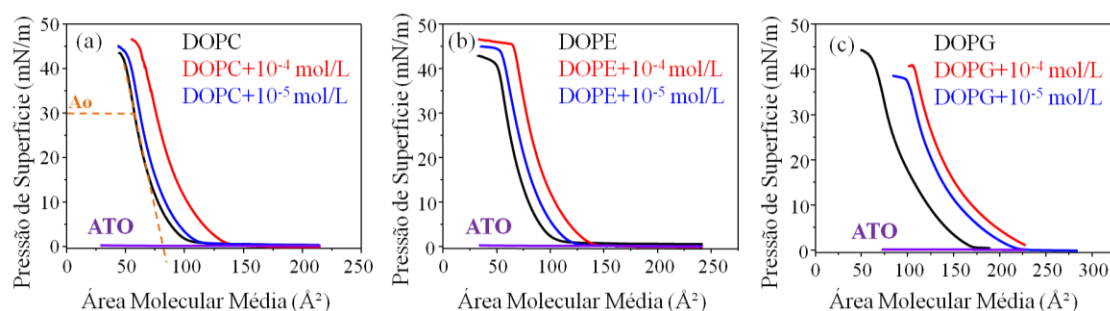


Figura 9. Isotermas π – A dos filmes de Langmuir de (a) DOPC, (b) DOPE e (c) DOPG em água ultrapura e soluções de ATO à 10^{-5} e 10^{-4} mol/L.

Tabela 1. Deslocamento relativo na área por lipídio $[(A_o - A)/A_o]$. A_o e A são a área extrapolada para pressão zero a partir de 30 mN/m em água ultrapura e em soluções de ATO, respectivamente.

Deslocamento relativo $[(A - A_o)/A_o]$			
Concentração de ATO	DOPC	DOPE	DOPG
10^{-5} mol/L	$0,05 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,01$
10^{-4} mol/L	$0,25 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,01$

A Figura 10 apresenta os ciclos de compressão e expansão das monocamadas de DOPC, DOPE e DOPG em subfase de água ultrapura e em solução de ATO a 10^{-5} mol/L. Os experimentos serão agora limitados à 10^{-5} mol/L, uma vez que está no intervalo de concentrações geralmente utilizadas para a inativação microbiana²⁶. Nesse experimento, as monocamadas foram comprimidas até a pressão superficial de 30 mN/m e então descomprimidas até a abertura total das barreiras. Essa pressão foi adotada em função da proximidade deste valor com a pressão lateral das membranas celulares⁷⁸. O fenômeno de histerese é observado em filmes de Langmuir cujas moléculas apresentam elevada afinidade entre si⁷⁹. Durante a expansão das monocamadas, as moléculas formam agregados que alteram a isoterma, o que pode indicar perfis de interação molécula-molécula e molécula-subfase. Desta forma é possível verificar como a alteração da subfase influencia na agregação das moléculas, sendo esses estudos pertinentes para áreas que dependem de estabilidade coloidal e propriedades reológicas de membranas.^{79,80}

A dupla ligação nas cadeias carbônicas aumenta a repulsão entre as moléculas de lipídios insaturados, diminuindo o efeito de histerese nos primeiros ciclos. De fato,

Niño et al. demonstram que as insaturações presentes da cauda hidrofóbica dos fosfolipídios dificulta o empacotamento das cadeias de hidrocarbonetos⁸¹. Desta maneira, após a descompressão, as moléculas dos fosfolipídios retomam uma organização semelhante à do início da compressão. Nos ciclos subjacentes, nota-se um deslocamento das isotermas em direção a menores áreas, relacionado a perda de material para a subfase, oriunda da oxidação por espécies reativas presentes no ar⁸². A adição de 10^{-5} mol/L de ATO não só desloca as isotermas para maiores áreas como estabiliza as monocamadas, que não perde material para subfase nos três ciclos realizados. Embora os dados da pressão superficial e histerese forneçam evidências da interação entre ATO e monocamadas lipídicas, a natureza exata dessa interação ainda é desconhecida, o que nos faz recorrer a métodos espectroscópicos.

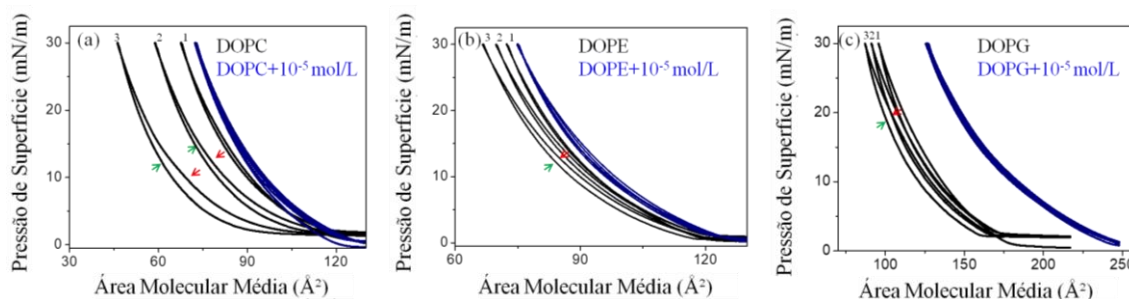


Figura 10. Dados coletados dos 3 ciclos de compressão (curva a direita – seta vermelha) e descompressão (curva a esquerda – seta verde) dos filmes de Langmuir de (a) DOPC, (b) DOPE e (c) DOPG em água ultrapura e solução de ATO à 10^{-5} mol/L.

Os mecanismos de interação em nível molecular entre as monocamadas lipídicas e ATO foram provados através de medidas de PM-IRRAS⁸³, específica para interfaces. As atribuições dos principais modos vibracionais são fornecidas na Tabela 2, juntamente com as modificações promovidas pela interação com ATO e irradiação. As cabeças polares e cadeias alifáticas das monocamadas de DOPE foram afetadas pela interação com ATO. Na Figura 11a, as três principais bandas em 1111, 1219 e 1736 cm^{-1} correspondem ao estiramento simétrico $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ e antissimétrico $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ do grupo fosfato e estiramento do grupo da carbonila $\nu(\text{C=O})$, respectivamente. As bandas observadas entre 1600-1700 cm^{-1} correspondem à diferença de refletividade da interface de água recoberta e não recoberta com a monocamada. O $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ foi deslocado para 1095 cm^{-1} , como esperado da natureza eletrostática da adsorção do ATO. O estiramento $\nu(\text{C-O-C})$ em 1141 cm^{-1} é deslocado para 1165 cm^{-1} e as bandas relacionadas ao grupo fenotiazínico⁸⁴ apareceram em 1466 e 1573 cm^{-1} . Em membranas de

fosfatidiletanolaminas (PE), os grupos fosfatos estão ligados aos grupos amins de moléculas adjacentes por meio de ligações de hidrogênio, gerando uma rede inter-fosfolipídica⁸⁵ que favorece a curvatura negativa na região das cabeças polares⁸⁶. É provável que a inserção do ATO pode ter perturbado a organização da monocamada de DOPE, semelhante ao observado em experimentos envolvendo a adição de proteínas apoptóticas⁸⁷ e peptídeos⁸⁸. A Figura 11b mostra que também foram encontradas modificações nas bandas das cadeias alifáticas após a incorporação do ATO, que incluem os deslocamentos (i) $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ de 2932 para 2924 cm^{-1} , (ii) $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ de 2962 para 2955 cm^{-1} e (iii) $\nu(\text{CH}=\text{CH})$ de 3016 para 3009 cm^{-1} . A razão entre a intensidade das bandas $\nu_s(\text{CH}_2)$ e $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ (I_s/I_{as}) aumentou de 0,92 para 1,33, o que indica uma diminuição de ordem das cadeias alifáticas⁸⁹. Ainda assim, essas interações moleculares têm pouca influência sobre a morfologia do filme, que foi apenas ligeiramente afetada com o aparecimento de pequenos domínios, como mostrado nas imagens de BAM da Figura 11b (inserção).

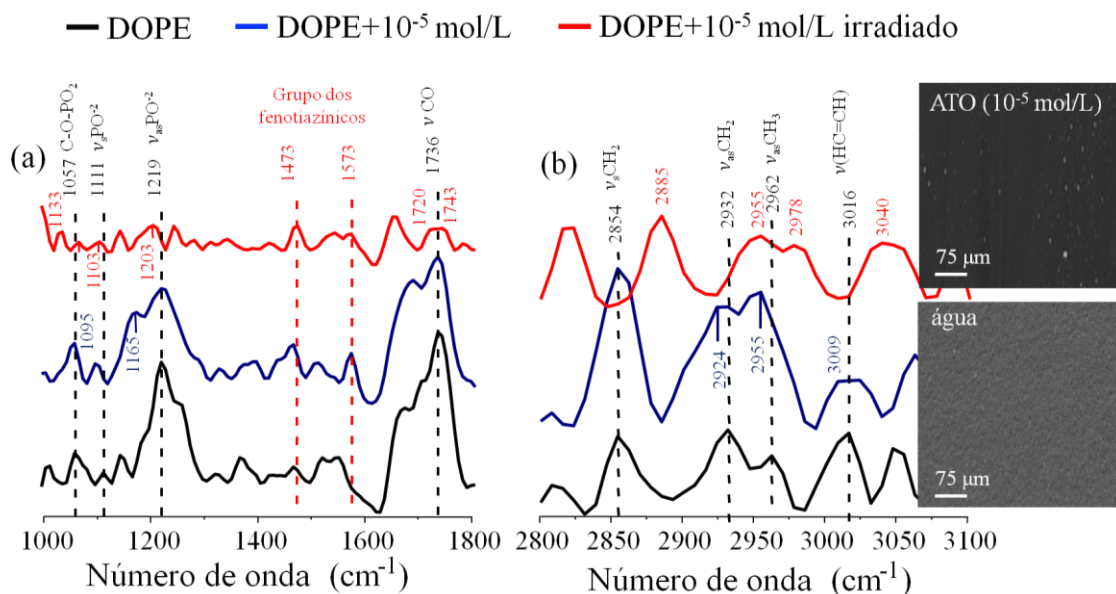


Figura 11. Espectros PM-IRRAS das (a) cabeças hidrofílicas e das (b) cadeias hidrofóbicas de monocamadas de DOPE adquiridas à pressão constante de 30 mN/m em subfases de água ultrapura (preto) e solução de ATO a 10^{-5} mol/L, antes (azul) e após irradiação (vermelho). As inserções mostram a microscopias de ângulo de Brewster (BAM) adquiridas a 30 mN/m em água ultrapura e solução de ATO a 10^{-5} mol/L.

Tabela 2. Atribuições dos principais modos vibracionais dos espectros de DOPC, DOPE e DOPG, incluindo com as alterações induzidas pela adsorção de ATO e posterior irradiação.

Atribuições	DOPC (cm ⁻¹)			DOPE (cm ⁻¹)			DOPG (cm ⁻¹)		
	DOPC	DOPC + ATO	DOPC + luz	DOPE	DOPE + ATO	DOPE + luz	DOPG	DOPG + ATO	DOPG + luz
ν (HC=CH)	3009	3016	3016	3016	3009	3040	3016	3024	3016
ν_{as} (CH ₃)	2962	2970	2978	2962	2955	2978	2962	2978	2970
ν_{as} (CH ₂)	2932	2932	2947	2932	2924	2955	2932	2932	2932
ν_a (CH ₃)	2893	--	2901	--	--	2885	2893	--	2885
ν_s (CH ₂)	2854	2854	2862	2854	2854	--	2854	2862	--
ν (C=O)	1743	1736	1720	1736	1736	1720 1743	1736	1736	1751
ν_{as} (PO ₂ ⁻)	1226	1211	1180	1219	1226	1203	1219	1209	1226
ν (C-O-C)	1141	1141	1149	1141	1165	1141	1141	--	1172
ν_{as} (PO ₂ ⁻)	1087	1087	1087	1111	1095	1103	1103	1111	1103
ν (C-O-PO ₂)	1049	1033	1049	1057	1057	1033	1057	1049	1064
grupo fenotiazínico			1442 1566		1466 1573	1473 1573		- 1574	1458 1566

Os efeitos do ATO nos espectros PM-IRRAS de DOPC são semelhantes aos das monocamadas de DOPE, como mostrado na Figura 12. A principal diferença está na ausência das bandas dos fenotiazínicos no espectro de DOPC, o que pode indicar uma menor adsorção de ATO. As posições dos estiramentos simétrico e antissimétrico do CH₂ se mantêm inalteradas e a razão I_s/I_{as} diminui de 2,1 para 0,8, indicando assim um aumento na ordem das cadeias devido à presença do ATO. Isso contrasta com os resultados de DOPE e com as descobertas anteriores em monocamadas de DOPC interagindo com o fotossensibilizador eosina Y⁵¹. É provável que uma interação mais fraca possa ter limitado a adsorção de ATO aos arredores do grupo fosfato, formando uma subcamada na região dos grupos polares que induziria ordem nas caudas hidrofóbicas. De fato, o ATO a 10⁻⁵ mol/L quase não causa alteração na isoterma de DOPC e a ordenação das caudas lipídicas contrabalancearia o aumento esperado na área ocupada por molécula com a adsorção de ATO.

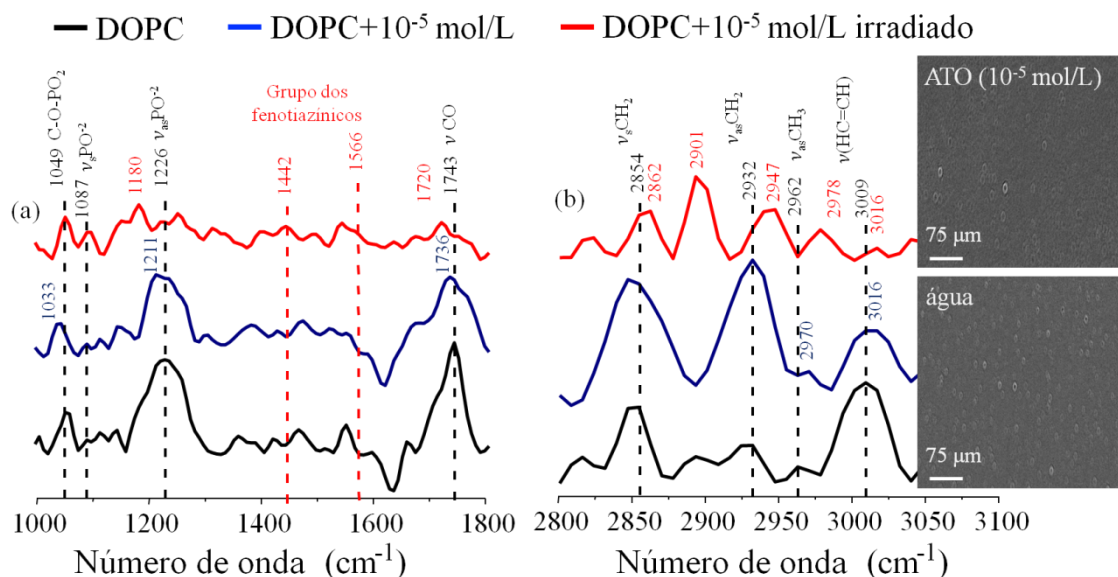


Figura 12. Espectros PM-IRRAS das (a) cabeças hidrofílicas e das (b) cadeias hidrofóbicas de monocamadas de DOPC adquiridas à pressão constante de 30 mN/m em subfases de água ultrapura (preto) e solução de ATO a 10⁻⁵ mol/L, antes (azul) e após irradiação (vermelho). As inserções mostram microscopias de ângulo de Brewster (BAM) adquiridas a 30 mN/m em água ultrapura e solução de ATO a 10⁻⁵ mol/L.

Os modos vibracionais dos grupos fosfato são significativamente mais afetados nas monocamadas aniônicas de DOPG como resultado da forte atração eletrostática com o ATO catiônico. Por exemplo, a Figura 13a mostra deslocamentos nos estiramentos $\nu(\text{C-O-PO}_2)$ de 1057 para 1049 cm⁻¹, $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ de 1103 para 1111 cm⁻¹ e $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ de 1219 para 1209 cm⁻¹. Sabe-se que os grupos fosfato são passíveis de ligação de hidrogênio com as moléculas de água e a forte adsorção das moléculas de ATO as podem ter afetado³⁶. A banda dos fenotiazínicos em 1574 cm⁻¹ também é evidência da incorporação do ATO pela monocamada lipídica. As modificações induzidas nas cadeias alifáticas podem ser inferidas na Figura 13b a partir das mudanças nos estiramentos: (i) $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ de 2854 para 2862 cm⁻¹, (ii) $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ de 2962 para 2978 cm⁻¹ e (iii) $\nu(\text{CH=CH})$ de 3016 para 3024 cm⁻¹. Curiosamente, a relação entre o estiramento simétrico e assimétrico ($I_{\text{s}}/I_{\text{as}}$) do CH₂ diminui de 0,87 para 0,79, sugerindo uma ordenação das cadeias de hidrocarbonetos. Diferente das monocamadas de DOPC, o maior deslocamento em área das isotermas π -A (Tabela 1) e as fortes modificações nos modos vibracionais dos grupos fosfatos e cadeias alifáticas indicam uma grande incorporação de ATO nas membranas de DOPG. Portanto, as moléculas catiônicas de ATO podem ter reduzido a repulsão eletrostática entre as cabeças aniônicas do DOPG,

favorecendo o empacotamento da monocamada e ordenação das caudas. A morfologia das monocamadas de DOPG também foi afetada com o surgimento de domínios após a adsorção de ATO, como mostrado nas imagens de BAM da Figura 13b (inserção).

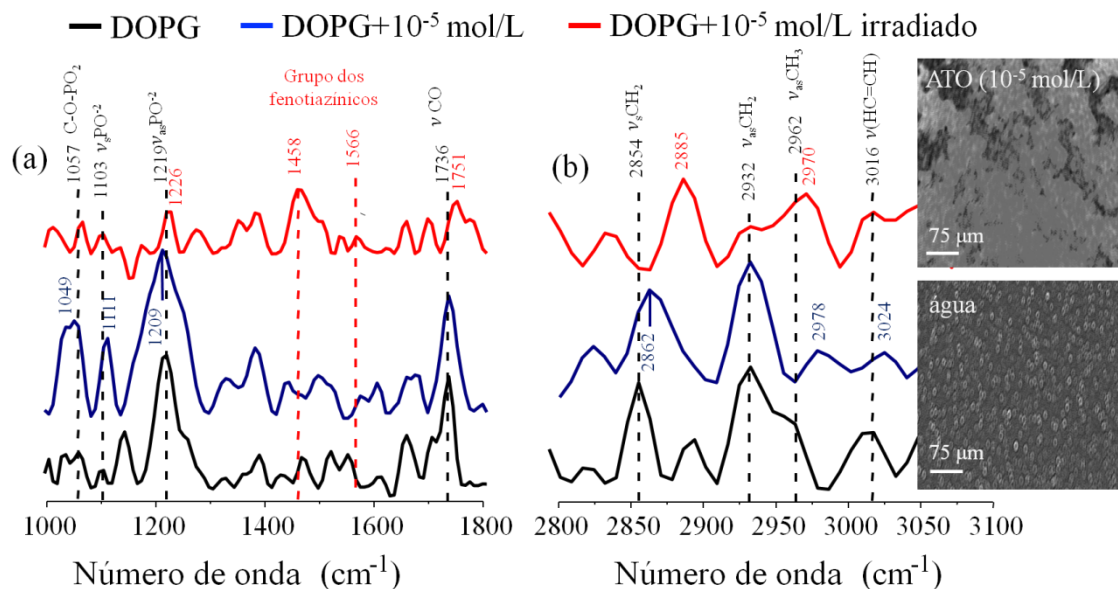


Figura 13. Espectros PM-IRRAS das (a) cabeças hidrofílicas e das (b) cadeias hidrofóbicas de monocamadas de DOPG adquiridas à pressão constante de 30 mN/m em subfases de água ultrapura (preto) e solução de ATO a 10^{-5} mol/L, antes (azul) e após irradiação (vermelho). As inserções mostram microscopias de ângulo de Brewster (BAM) adquiridas a 30 mN/m em água ultrapura e solução de ATO a 10^{-5} mol/L.

4.2. Fotoativação do ATO

Os efeitos fotoinduzidos foram explorados em monocamadas de DOPC, DOPE e DOPG mantidas a pressão de 30 mN/m em solução de ATO a 10^{-5} mol/L, como mostrado nas Figura 14a, 14b e 14c, respectivamente. A área superficial das monocamadas lipídicas irradiadas (630 nm) e não irradiadas foi acompanhada ao longo do tempo. Em experimentos de controle, foi observado que monocamadas de DOPC, DOPE e DOPG em água ultrapura não são afetadas pela irradiação. Os filmes não irradiados apresentam comportamento semelhante de diminuição da área superficial devido à perda de material para subfase oriunda da oxidação não controlada gerada por espécies reativas de oxigênio (EROs) presentes no ambiente⁹⁰. A inclinação do decaimento em área é significativamente diminuída nas monocamadas irradiadas de DOPC (Figura 14a) e DOPE (Figura 14b), o que sugere um aumento da estabilidade dos filmes. O efeito líquido da irradiação [Δ = (monocamada irradiada) - (monocamada não

irradiada)] sugere um aumento geral na área ocupada pelas monocamadas. Sob irradiação, estados excitados do ATO podem sofrer reações de tipo II e gerar oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), uma espécie muito reativa que reage com as insaturações lipídicas para formar hidroperóxidos ($-\text{OOH}$)^{91,92}. Os hidroperóxidos hidrofílicos são criados nas proximidades das cadeias hidrofóbicas e tendem a migrar em direção às cabeças polares lipídicas. Um comportamento semelhante foi observado para derivados xantênicos em monocamadas de Langmuir^{50,51} e vesículas unilamelares gigantes⁹². O aumento em área de aproximadamente 35% para monocamadas de DOPE é maior que os 15% do DOPC, o que pode estar associado com a maior quantidade de ATO inserido na monocamada de DOPE. Dessa forma, uma maior taxa na formação de hidroperóxidos seria gerada, levando à maior área superficial ocupada pelas monocamadas de DOPE.

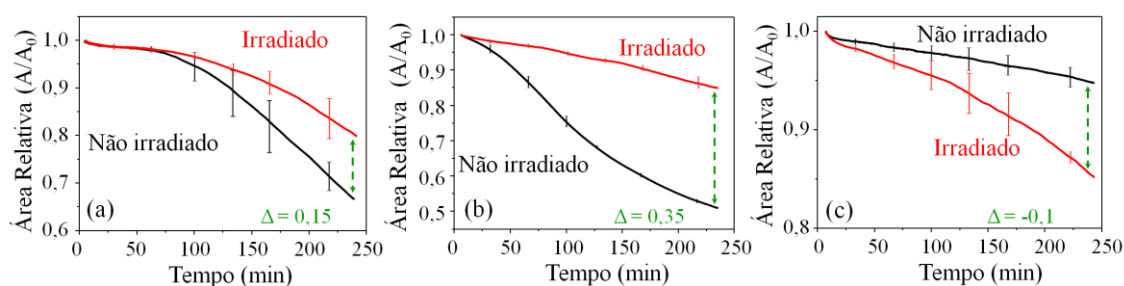


Figura 14. Evolução da área relativa (A/A_0) de monocamadas irradiadas e não irradiadas de (a) DOPC, (b) DOPE e (c) DOPG em solução de ATO (10^{-5} mol/L), registrada a uma pressão de superfície constante de 30 mN/m. A_0 é a área molecular média extrapolada em 30 mN/m.

O espectro de PM-IRRAS na Figura 11 mostra que ambos os grupos das cabeças polares e cadeias alifáticas foram afetados pela irradiação das monocamadas de DOPE em solução de ATO (10^{-5} mol/L). Por exemplo, as intensidades das bandas na região das cabeças polares são levemente diminuídas, o que pode ser indicativo da perda de ordenação no filme⁹³. A intensidade do estiramento $\nu(\text{C-O-PO}_2)$ em 1057 cm^{-1} está menor em relação ao $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ em 1111 cm^{-1} e a banda do $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ deslocou de 1219 para 1203 cm^{-1} , sugerindo que as ligações de hidrogênio entre os grupos fosfato e moléculas de água foram afetadas pelos grupos de hidroperóxidos nos arredores das cabeças polares. As bandas do anel fenotiazínico em 1473 e 1573 cm^{-1} indicam que o ATO continua na monocamada após a hidroperoxidação. A banda da carbonila em 1736 cm^{-1} é dividida em 1720 e 1743 cm^{-1} , correspondendo ao estiramento C=O hidratado e não hidratado, respectivamente⁹⁴. Quanto às caudas, o estiramento $\nu_s(\text{CH}_2)$ em 2854 cm^{-1}

¹ não é mais observado, razão pela qual a relação I_s/I_{as} não pode ser determinada para avaliar a ordem das cadeias. Por outro lado, o $\nu_s(\text{CH}_3)$ aparece com elevada intensidade em 2885 cm^{-1} , o que significa que ambos $\nu_s(\text{CH}_2)$ e $\nu_s(\text{CH}_3)$ tiveram sua orientação alteradas. Além disso, a irradiação deslocou o $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ de 2924 para 2955 cm^{-1} , o $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ de 2955 para 2978 cm^{-1} e o $\nu(\text{HC}=\text{CH})$ de 3009 para 3040 cm^{-1} . Todas as modificações são consistentes com a migração dos grupos de hidroperóxidos em direção à interface monocamada/água. Resultados semelhantes foram obtidos nas monocamadas de DOPC, cujos espectros de PM-IRRAS são mostrados na Figura 12.

Em contraste aos resultados de DOPC e DOPE, a inclinação do decaimento em área é aumentada para as monocamadas irradiadas de DOPG (Figura 14c), sugerindo uma maior perda de material para a subfase, semelhante ao que foi observado nos experimentos de oxidação por ozônio^{95, 96} e nos danos causados pelos raios UV⁹⁷. Bacellar et al.¹⁹ mostraram que a permeabilização da membrana está associada com a geração de aldeídos, que pode ocorrer somente via reações dependentes de contato entre estados excitados do fotossensibilizador e insaturações lipídicas ou grupos hidroperóxidos previamente formados. Portanto, a penetração do ATO na monocamada de DOPG não se limita à cabeça polar e também deve alcançar as cadeias alifáticas. Consequentemente, não apenas o $^1\text{O}_2$ seria gerado próximo às insaturações, favorecendo a hidroperoxidação lipídica, mas também a proximidade com o fotossensibilizador pode permitir a formação de aldeídos através das reações dependentes de contato, como esquematizado na Figura 15. Essa reação induz a clivagem das cadeias lipídicas, que pode ser a origem da perda atenuada de material das monocamadas de DOPG.

Os espectros de PM-IRRAS para o DOPG na Figura 13 mostram que as intensidades das bandas na região das cabeças foram levemente diminuídas pela irradiação, com os estiramentos $\nu(\text{C-O-PO}_2)$, $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ e $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ em 1049 , 1111 e 1209 cm^{-1} sendo deslocados para 1064 , 1103 e 1226 cm^{-1} , respectivamente. Este último é consistente com os grupos hidroperóxidos na vizinhança das cabeças polares, semelhantemente às monocamadas de DOPE. A hidratação do grupo carbonílico também foi afetada, como sugerido pelo deslocamento da banda em 1736 para 1751 cm^{-1} . As bandas dos anéis fenotiazínicos em 1458 e 1566 cm^{-1} tiveram suas intensidades aumentadas de maneira significativa, sugerindo que as moléculas de ATO provenientes da subfase penetram na monocamada irradiada de DOPG. A reorientação dos grupos CH_3 e CH_2 levou a intensificação do estiramento $\nu_s(\text{CH}_3)$ em 2885 cm^{-1} e

desaparecimento do $\nu_s(\text{CH}_2)$ em 2862 cm^{-1} , impedindo a avaliação do ordenamento das cadeias. O $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ foi deslocado de 2978 para 2970 cm^{-1} e o $\nu_s(\text{HC=CH})$ mudou de 3024 para 3016 cm^{-1} . Embora as modificações sejam consistentes com a migração dos grupos de hidroperóxidos em direção a interface monocamada/água, a presença do $\nu_s(\text{HC=CH})$ no espectro irradiado não sugere a clivagem das cadeias lipídicas e a permeabilização da membrana anteriormente mencionado. Entretanto, é provável que os subprodutos da clivagem da cadeia sejam expelidos da interface para a subfase aquosa, deixando na monocamada apenas lipídios hidroperoxidados, como no esquema da Figura 15.

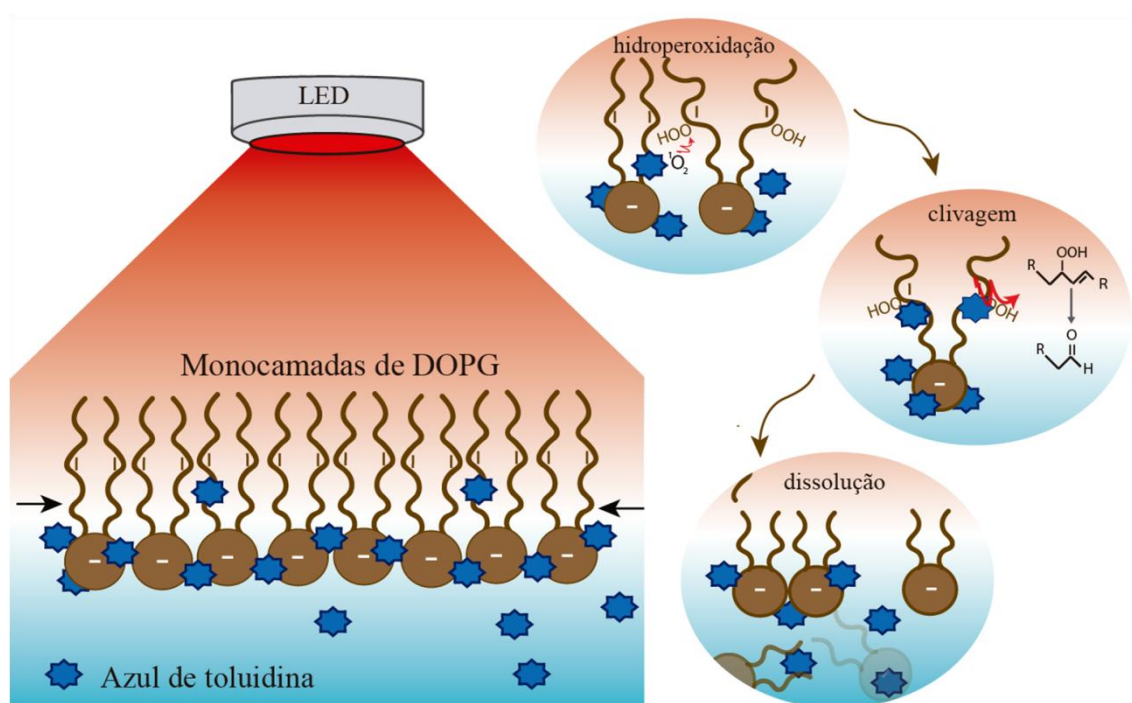


Figura 15. Representação esquemática da clivagem fotoinduzida das cadeias do DOPG, que leva à permeabilização da membrana. A inserção à direita fornece os detalhes de hidroperoxidação, clivagem de cadeia e dissolução de lipídios na subfase.

5. Conclusão

Monocamadas de DOPC, DOPE e DOPG foram aplicadas aqui como sistemas miméticos de biomembranas para desvendar interações em nível molecular com o fenotiazínico azul de toluidina. As isotermas de pressão de superfície combinadas com PM-IRRAS indicaram que as moléculas catiônicas de ATO adsorvem nas monocamadas lipídicas via atrações eletrostáticas com os grupos fosfatos. Sob irradiação, a hidroperoxidação foi o resultado mais provável da reação entre $^1\text{O}_2$ e insaturações do DOPC e DOPE, sendo a origem do aumento da área superficial nas isotermas de pressão de superfície e das alterações nos grupos polares e alifáticos dos espectros de PM-IRRAS. Por outro lado, a irradiação induziu uma diminuição na estabilidade da monocamada de DOPG, sugerindo a clivagem das cadeias carbônicas no local de insaturação. Nesse caso, a natureza aniônica do DOPG permitiu maior penetração das moléculas de ATO na monocamada, favorecendo reações dependentes de contato entre o estado tripleto do ATO e insaturações lipídicas ou grupos hidroperóxido, fundamentais para a permeabilização da membrana. Tomados em conjunto, esses resultados podem ajudar a entender o mecanismo em nível molecular da fotossensibilização induzida pelo ATO em membranas de fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerol, que compõem a maior parte do envelope celular de bactérias Gram-negativas.

6. Considerações finais e perspectivas

Esta dissertação reúne os resultados obtidos a partir das atividades realizadas no período de março/2018 a fevereiro/2020 referentes ao projeto de mestrado proposto à pós-graduação de Farmacologia e Biotecnologia e financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O projeto previa o estudo dos mecanismos de interação do fotossensibilizador ATO e dos efeitos da foto-oxidação em sistemas modelo de membranas de filmes de Langmuir dos fosfolipídios insaturados DOPC, DOPE e DOPG. Os resultados obtidos proporcionaram a elaboração de um artigo científico, o qual foi submetido e aceito para a publicação na revista *Langmuir* com o título “*Role of Toluidine Blue-O Binding Mechanism for Photooxidation in Bioinspired Bacterial Membranes*”. Além disso, tais resultados permitiram a participação em congressos nacionais e internacionais. Abaixo é apresentada a produção científica realizada durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Artigo:

Almeida Jr, A. M.; Oliveira Jr, O. N.; Aoki, P. H. B. Role of Toluidine Blue-O Binding Mechanism for Photooxidation in Bioinspired Bacterial Membranes. *Langmuir* **2019**, 35 (51), 16745-16751. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03045>.

Congressos:

- Almeida Jr, A. M.; Aoki, P. H. B.. Photosensitization of cellular membrane mimetic systems induced by toluidine blue phenothiazinic. (Apresentação de Trabalho/Congresso internacional XVII Brazil MRS Meeting – Brazilian Materials Research Society – Natal, RN, 2018).
- Almeida Jr, A. M.; Aoki, P. H. B.. Photosensitization of cellular membrane mimetic systems induced by toluidine blue phenothiazinic. (Apresentação de Trabalho/Congresso nacional AutoOrg – São Pedro, SP, 2018).
- Almeida Jr, A. M.; Oliveira Jr, O. N.; Aoki, P. H.. Fotossensibilização de sistemas miméticos de membrana celular induzido pelo fenotiazinico azul de toluidina-o. (Apresentação de Trabalho/Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia – UNESP, IBB, Botucatu, SP, 2019).

- Almeida Jr, A. M.; Oliveira Jr, O. N.; Aoki, P. H. B.. The role of toluidine blue binding mechanisms on the photo-induced permeability of lipid monolayers. (Apresentação de Trabalho/Congresso internacional XVII Brazil MRS Meeting – Brazilian Materials Research Society – Balneário Camboriú, SC, 2019).

- Moreira, L. G.; Almeida Jr, A. M.; Caetano, W.; Aoki, P. H. B. Effects of the photosensitizer Eosin decyl ester on photo-oxidation of unsaturated lipid monolayers as mimetic systems of bacteria membranes. (Apresentação de Trabalho/Congresso internacional XVII Brazil MRS Meeting – Brazilian Materials Research Society – Balneário Camboriú, SC, 2019).

- Moreira, L. G.; Bistaffa, M. J.; Almeida Jr, A. M.; Borges, B. A., Toledo, K. A.; Aoki, P. H. B. Photodynamic therapy: from molecular effects in model systems toward photodynamic efficiency in cell culture. (Apresentação de Trabalho/Congresso internacional XVII Brazil MRS Meeting – Brazilian Materials Research Society – Balneário Camboriú, SC, 2019).

Ao longo do desenvolvimento do projeto, tive oportunidade de colaborar com o prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr. (USP/São Carlos), responsável pelo laboratório onde os experimentos de PM-IRRAS e BAM foram realizados. Também foi possível colaborar com os demais projetos conduzidos pelos colegas do laboratório Dra. Sabrina Aléssio Camargo Aoki, Lucas Gontijo Moreira e Tyler Nield, sendo este último responsável por ampliar o estudo de interação de ATO às monocamadas de misturas lipídicas (DOPE+DOPG+CL). Como perspectiva futura, pretende-se avançar nos efeitos da fotoativação do ATO em modelos complexos de membrana de bactérias, a fim de compreender os mecanismos que levam a inibição bacteriana. Para isso, ampliaremos os experimentos com monocamadas por cardiolipida (CL) e extrato da membrana de *E.coli*. Os experimentos com CL já estão em andamento, como mostram os dados de pressão de superfície, disponibilizados como apêndice. As informações a serem obtidas contribuirão para elaboração de um segundo artigo científico e para continuidade dos estudos no doutorado.

7. Apêndice

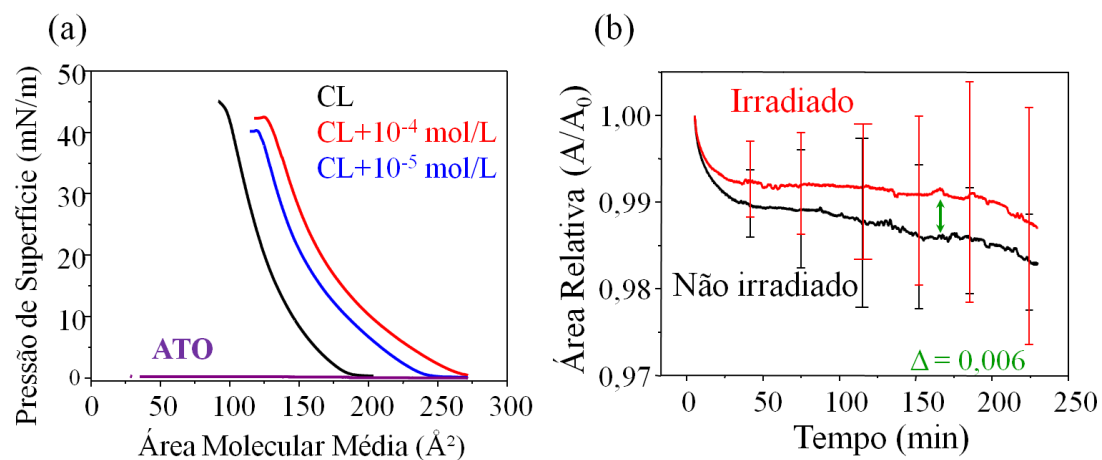


Figura 16. Dados complementares das (a) isothermas π -A de monocamadas de CL em água ultrapura e soluções de ATO à 10^{-5} e 10^{-4} mol/L e da (b) evolução da área relativa (A/A_0) de monocamadas irradiadas e não irradiadas de CL em solução de ATO (10^{-5} mol/L), registrada a uma pressão de superfície constante de 30 mN/m.

8. Referências

- (1) WORLD HEALTH ORGANIZATION. No Time to Wait: Securing the Future from Drug-Resistant Infections. **2019**.
- (2) Brown, E. D.; Wright, G. D. Antibacterial Drug Discovery in the Resistance Era. *Nature* **2016**, 529 (1), 336–343. <https://doi.org/10.1038/nature17042>.
- (3) Andersson, D. I. Persistence of Antibiotic Resistant Bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, 6, 452–456. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.001>.
- (4) Sharma, V. K.; Johnson, N.; Cizmas, L.; McDonald, T. J.; Kim, H. A Review of the Influence of Treatment Strategies on Antibiotic Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes. *Chemosphere* **2016**, 150, 702–714. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.084>.
- (5) Tenover, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am. J. Infect. Control* **2006**, 34, S3–S10. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>.
- (6) Cox, G.; Wright, G. D. Intrinsic Antibiotic Resistance: Mechanisms, Origins, Challenges and Solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* **2013**, 303 (6–7), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>.
- (7) Bennett, P. M. Plasmid Encoded Antibiotic Resistance: Acquisition and Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Bacteria. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, 153, 347–357. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607>.
- (8) Neu, H. C. The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science* (80-.). **1992**, 257 (5073), 1064–1073. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.257.5073.1064>.
- (9) Delcour, A. H. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2009**, 1794 (5), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>.
- (10) Simões, M.; Bennett, R. N.; Rosa, E. A. S. Understanding Antimicrobial Activities of Phytochemicals against Multidrug Resistant Bacteria and Biofilms. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26 (6), 746–757. <https://doi.org/10.1039/b821648g>.
- (11) Chan, B. K.; Abedon, S. T.; Loc-carrillo, C. Phage Cocktails and the Future of Phage Therapy. *Future Microbiol.* **2013**, 8 (6), 769–783. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.47>.
- (12) Michael R. Hamblin, T. H. Photodynamic Therapy: A New Antimicrobial Approach to Infectious Disease. *Photochem. Photobiol.* **2004**, 3 (5), 436–450. <https://doi.org/10.1039/b311900a.Photodynamic>.
- (13) Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy Targeted to Pathogens. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2004**, 17 (3), 245–254. <https://doi.org/10.1177/039463200401700304>.
- (14) Calzavara-Pinton, P. G.; Venturini, M.; Sala, R. A Comprehensive Overview of Photodynamic Therapy in the Treatment of Superficial Fungal Infections of the Skin. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2005**, 78 (1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.06.006>.
- (15) Jori, G.; Fabris, C.; Soncin, M.; Ferro, S.; Coppelotti, O.; Dei, D.; Fantetti, L.; Chiti, G.; Roncucci, G. Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial

- Infections: Basic Principles and Perspective Applications. *Lasers Surg. Med.* **2006**, 38 (5), 468–481. <https://doi.org/10.1002/lsm.20361>.
- (16) Itri, R.; Junqueira, H. C.; Mertins, O.; Baptista, M. S. Membrane Changes under Oxidative Stress: The Impact of Oxidized Lipids. *Biophys. Rev.* **2014**, 6 (1), 47–61. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0128-9>.
 - (17) Sharma, S. K.; Mroz, P.; Dai, T.; Huang, Y. Y.; Denis, T. G. S.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference? *Isr. J. Chem.* **2012**, 52 (8–9), 691–705. <https://doi.org/10.1002/ijch.201100062>.
 - (18) Kochevar, I. E.; Lambert, C. R.; Lynch, M. C.; Tedesco, A. C. Comparison of Photosensitized Plasma Membrane Damage Caused by Singlet Oxygen and Free Radicals. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1996**, 1280 (2), 223–230. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00297-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00297-9).
 - (19) Bacellar, I. O. L.; Tsubone, T. M.; Pavani, C.; Baptista, M. S. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16 (9), 20523–20559. <https://doi.org/10.3390/ijms160920523>.
 - (20) Gabrielli, D.; Belisle, E.; Severino, D.; Kowaltowski, A. J.; Baptista, M. S. Binding, Aggregation and Photochemical Properties of Methylene Blue in Mitochondrial Suspensions. *Photochem. Photobiol.* **2004**, 79 (3), 227–232. <https://doi.org/10.1562/be-03-27.1>.
 - (21) Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B.; Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution . An Expanded and Revised Compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, 24 (2), 663–1021. <https://doi.org/10.1063/1.555965>.
 - (22) Mashberg, A. Reevaluation of Toluidine Blue Application as a Diagnostic Adjunct in the Detection of Asymptomatic Oral Squamous Carcinoma: A Continuing Prospective Study of Oral Cancer III. *Cancer* **1980**, 46 (4), 758–763. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19800815\)46:4<758::AID-CNCR2820460420>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19800815)46:4<758::AID-CNCR2820460420>3.0.CO;2-8).
 - (23) Jana, A. K. Solar Cells Based on Dyes. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2000**, 132 (1–2), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(99\)00251-8](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(99)00251-8).
 - (24) Moslemi, N.; Rouzmeh, N.; Shakerinia, F.; Bahador, A.; Azar, P. S.; Kharazifard, M. J.; Paknejad, M.; Fekrazad, R. Photodynamic Inactivation of Porphyromonas Gingivalis Utilizing Radachlorin and Toluidine Blue O as Photosensitizers: An in Vitro Study. *J. Lasers Med. Sci.* **2018**, 9 (2), 107–112. <https://doi.org/10.15171/jlms.2018.21>.
 - (25) Carrera, E. T.; Dias, H. B.; Corbi, S. C. T.; Marcantonio, R. A. C.; Bernardi, A. C. A.; Bagnato, V. S.; Hamblin, M. R.; Rastelli, A. N. S. The Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) in Dentistry: A Critical Review. *Laser Phys.* **2016**, 26 (12), 1–23. <https://doi.org/10.1088/1054-660X/26/12/123001>.
 - (26) Phoenix, D. A.; Sayed, Z.; Hussain, S.; Harris, F.; Wainwright, M. The Phototoxicity of Phenothiazinium Derivatives against Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2003**, 39 (1), 17–22. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00173-1](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00173-1).

- (27) Ilanchelian, M.; Ramaraj, R. Binding Interactions of Toluidine Blue O with Escherichia Coli DNA: Formation of Bridged Structure. *J. Fluoresc.* **2011**, 21 (4), 1439–1453. <https://doi.org/10.1007/s10895-010-0829-4>.
- (28) Usacheva, M. N.; Teichert, M. C.; Sievert, C. E.; Biel, M. A. Effect of Ca²⁺ on the Photobactericidal Efficacy of Methylene Blue and Toluidine Blue against Gram-Negative Bacteria and the Dye Affinity for Lipopolysaccharides. *Lasers Surg. Med.* **2006**, 38 (10), 946–954. <https://doi.org/10.1002/lsm.20400>.
- (29) Wakayama, Y.; Takagi, M.; Yano, K. Photosensitized Inactivation of E. Coli Cells in Toluidine Blue-Light System. *Photochem. Photobiol.* **1980**, 32 (5), 601–605. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1980.tb04028.x>.
- (30) Wozniak, A.; Grinholc, M. Combined Antimicrobial Activity of Photodynamic Inactivation and Antimicrobials-State of the Art. *Front. Microbiol.* **2018**, 9 (MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00930>.
- (31) Gram, H. C. Ueber Die Isolirte Färbung Der Schizomyceten in Schnitt-Und Trockenpreparaten. *Fortschritte der Med.* **1884**, 2 (1), 185–189.
- (32) Robinow, C. F.; Murray, R. G. E. The Differentiation and Cytoplasm of Gram Positive. *Exp. Cell Res.* **1952**, 4 (2), 390–407.
- (33) Mitchell, P.; Moyle, J. Permeation Mechanisms in Bacterial Membranes. *Discuss. Faraday Soc.* **1956**, 21, 258–265. <https://doi.org/10.1039/DF9562100258>.
- (34) Mitchell, P.; Moyle, J. Permeability of the Envelopes of Staphylococcus Aureus to Some Salts, Amino Acids, and Non-Electrolytes. *J. Gen. Microbiol.* **1959**, 20, 434–441.
- (35) Navarre, W. W.; Schneewind, O. Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, 63 (1), 174–229.
- (36) J. Arrondo, F. Goñi, J. Macarulla,. Infrared Spectroscopy of Phosphatidylcholines in Aqueous Suspension a Study of the Phosphate Group Vibrations. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1984**, 794 (1), 165–168.
- (37) Glauert, A. M.; Thornley, M. J. The Topography of the Bacterial Cell Wall. *Annu. Rev. Microbiol.* **1969**, 23 (1), 159–198. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.23.100169.001111>.
- (38) Epand, R. M.; Epand, R. F. Domains in Bacterial Membranes and the Action of Antimicrobial Agents. *Mol. Biosyst.* **2009**, 5 (6), 580–587. <https://doi.org/10.1039/b900278m>.
- (39) Osborn, M. J.; Gander, J. E.; Parisi, E.; Carson, J. Mechanism of Assembly of the Outer Membrane of Salmonella Typhimurium. *J. Biol. Chem.* **1972**, 247 (12), 3962–3972.
- (40) Epand, R. M.; Epand, R. F. Lipid Domains in Bacterial Membranes and the Action of Antimicrobial Agents. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2009, pp 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.023>.
- (41) BLACK, J. G. Característica Das Células Procarióticas e Eucarióticas. In *Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas*; 2002; pp 69–85.

- (42) Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. Anatomia Funcional de Células Procarióticas e Eucarióticas. In *Microbiologia*. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 4, p. 76-112.
- (43) Chilakamarthi, U.; Giribabu, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem. Rec.* **2017**, *17* (8), 775–802. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600121>.
- (44) Abdel-kader, M. H. The Journey of PDT Throughout History: PDT from Pharos to Present. In *Photodynamic Medicine: From Bench to Clinic*; The Royal Society of Chemistry, 2016; pp 1–21. <https://doi.org/10.1039/9781782626824-00001>.
- (45) Kharkwal, G. B.; Sharma, S. K.; Huang, Y.; Dai, T. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers Surg Med.* **2012**, *43* (7), 755–767. <https://doi.org/10.1002/lsm.21080>. Photodynamic.
- (46) Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. Photodynamic Therapy (PDT) of Cancer: From a Local to a Systemic Treatment. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *1*, 1–14. <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>.
- (47) Zou, Z.; Chang, H.; Li, H.; Wang, S. Induction of Reactive Oxygen Species: An Emerging Approach for Cancer Therapy. *Apoptosis* **2017**, *22* (11), 1321–1335. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1424-9>.
- (48) Agostinis P, Berg K, Cengel K., et al. Republic of Yemen Ministry of Public Health and Population Nutrition and Mortality Survey Report Ibb Governorate , Yemen. *Ca Cancer J Clin* **2017**, *61* (April), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>. Available.
- (49) Gaia, S.; Yanga, G.; Yanga, P.; Hea, F.; Linb, J.; C, D. J.; Xingd, B. Recent Advances in Functional Nanomaterials for Light Triggered Cancer Therapy. *Nano Today* **2018**, *19*, 146–187.
- (50) Aoki, P. H. B.; Morato, L. F. C.; Pavinatto, F. J.; Nobre, T. M.; Constantino, C. J. L.; Oliveira, O. N. Molecular-Level Modifications Induced by Photo-Oxidation of Lipid Monolayers Interacting with Erythrosin. *Langmuir* **2016**, *32* (15), 3766–3773. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00693>.
- (51) Pereira, L. S. A.; Camacho, S. A.; Malfatti-Gasperini, A. A.; Jochelavicius, K.; Nobre, T. M.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. Evidence of Photoinduced Lipid Hydroperoxidation in Langmuir Monolayers Containing Eosin Y. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *171*, 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.002>.
- (52) Barbosa, S. C.; Nobre, T. M.; Volpati, D.; Ciancaglini, P.; Cilli, E. M.; Lorenzón, E. N.; Oliveira, O. N. The Importance of Cyclic Structure for Labaditin on Its Antimicrobial Activity against Staphylococcus Aureus. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *148*, 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.09.017>.
- (53) Barbosa, S. C.; Nobre, T. M.; Volpati, D.; Cilli, E. M.; Correa, D. S.; Oliveira, O. N. The Cyclic Peptide Labaditin Does Not Alter the Outer Membrane Integrity of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 1993. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38551-5>.
- (54) Brockman, H. Lipid Monolayers : Why Use Half a Membrane Interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9* (4), 438–443.

- (55) Borrell, J. H.; Domènech, Ò.; Keough, K. M. W. Physicochemical Properties of Lipids and Macromolecules in Higher Level Organization. In *Membrane Protein – Lipid Interactions: Physics and Chemistry in the Bilayer*; 2016; pp 31–61. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30277-5>.
- (56) Elderdfi, M.; Sikorski, A. F. Langmuir-Monolayer Methodologies for Characterizing Protein-Lipid Interactions. *Chem. Phys. Lipids* **2018**, 212 (1), 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.01.008>.
- (57) Ariga, K.; Mori, T.; Li, J. Langmuir Nanoarchitectonics from Basic to Frontier. *Langmuir* **2019**, 35 (10), 3585–3599. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01434>.
- (58) Seki, T. A Wide Array of Photoinduced Motions in Molecular and Macromolecular Assemblies at Interfaces. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2018**, 91 (7), 1026–1057. <https://doi.org/10.1246/bcsj.20180076>.
- (59) Liu, X.; Riess, J. G.; Krafft, M. P. Self-Organization of Semifluorinated Alkanes and Related Compounds at Interfaces: Thin Films, Surface Domains and Two-Dimensional Spherulites. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2018**, 91 (5), 846–857. <https://doi.org/10.1246/bcsj.20170431>.
- (60) Barbosa, S. C.; Cilli, E. M.; Dias, L. G.; Fuzo, C. A.; Degreève, L.; Stabeli, R. G.; Itri, R.; Ciancaglini, P. Interaction of Cyclic and Linear Labaditin Peptides with Anionic and Zwitterionic Micelles. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, 438, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.09.059>.
- (61) Barbosa, S. C.; Cilli, E. M.; Dias, L. G.; Stabeli, R. G.; Ciancaglini, P. Labaditin, a Cyclic Peptide with Rich Biotechnological Potential: Preliminary Toxicological Studies and Structural Changes in Water and Lipid Membrane Environment. *Amino Acids* **2011**, 40 (1), 135–144. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0648-6>.
- (62) Lorenzón, E. N.; Nobre, T. M.; Caseli, L.; Cilli, E. M.; da Hora, G. C. A.; Soares, T. A.; Oliveira, O. N. The “Pre-Assembled State” of Magainin 2 Lysine-Linked Dimer Determines Its Enhanced Antimicrobial Activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, 167, 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.04.034>.
- (63) Biolin Scientific. Langmuir and Langmuir-Blodgett devices - KSV Nima Software Manual https://www.ccmr.cornell.edu/wp-content/uploads/sites/2/2015/11/KSV-NIMA-LB-Software-Manual_v1.4.pdf (accessed Sep 4, 2019).
- (64) Jochelavicius, K. Efeito Da Foto-Ativação Da Curcumina e Do Azul de Metileno Em Monocamadas de Lipídios Bacterianos, Universidade de São Paulo, 2018.
- (65) Rapp, B. E. Measuring Surface Tension and Free Surface Energy. In *Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics*; Oxford, 2017; Vol. 0, pp 453–465. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-3141-1.50022-8>.
- (66) Lee, K. Y. C. Collapse Mechanisms of Langmuir Monolayers. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2008**, 59 (1), 771–791. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104619>.
- (67) Ma, G.; Allen, H. C. DPPC Langmuir Monolayer at the Air-Water Interface: Probing the Tail and Head Groups by Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Langmuir* **2006**, 22 (12), 5341–5349.

- <https://doi.org/10.1021/la0535227>.
- (68) Pavia, D.; Lampman, G.; Kriz, G.; Vyvyan, J. Espectroscopia No Infravermelho. In *Introdução à Espectroscopia*; 2015; pp 16–59.
 - (69) Blaudez, D.; Turlet, J. M.; Dufourcq, J.; Bard, D.; Buffeteau, T.; Desbat, B. Investigations at the Air/Water Interface Using Polarization Modulation IR Spectroscopy. *J. Chem. Soc. - Faraday Trans.* **1996**, 92 (4), 525–530. <https://doi.org/10.1039/ft9969200525>.
 - (70) Kaercher, T.; Hönig, D.; Möbius, D. Brewster Angle Microscopy - A New Method of Visualizing the Spreading of Meibomian Lipids. *Int. Ophthalmol.* **1993**, 17 (6), 341–348. <https://doi.org/10.1007/BF00915741>.
 - (71) Hönig, D.; Möbius, D. Reflectometry at the Brewster Angle and Brewster Angle Microscopy at the Air-Water Interface. *Thin Solid Films* **1992**, 210–211 (1), 64–68. [https://doi.org/10.1016/0040-6090\(92\)90169-C](https://doi.org/10.1016/0040-6090(92)90169-C).
 - (72) Accurion. Brewster angle microscope nanofilm ultrabam Brewster angle microscope nanofilm ultrabam http://accurion.com/imaging-ellipsometry/products/nanofim_ultrabam/flyer_ultrabam.pdf.
 - (73) Hönig, D.; Möbius, D. Reflectometry at the Brewster Angle and Brewster Angle Microscopy at the Air-Water Interface. *Thin Solid Films* **1992**, 210–211 (PART 1), 64–68. [https://doi.org/10.1016/0040-6090\(92\)90169-C](https://doi.org/10.1016/0040-6090(92)90169-C).
 - (74) Sennato, S.; Bordi, F.; Cametti, C.; Coluzza, C.; Desideri, A.; Rufini, S. Evidence of Domain Formation in Cardiolipin - Glycerophospholipid Mixed Monolayers . A Thermodynamic and AFM Study. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109 (33), 15950–15957.
 - (75) Hidalgo, A. A.; Caetano, W.; Tabak, M.; Jr, O. N. O. Interaction of Two Phenothiazine Derivatives with Phospholipid Monolayers. *Biophys. Chem.* **2004**, 109 (1), 85–104. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2003.10.020>.
 - (76) Aoki, P. H. B.; Alessio, P.; Riul, A.; De Saja Saez, J. A.; Constantino, C. J. L. Coupling Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering and Electronic Tongue as Characterization Tools to Investigate Biological Membrane Mimetic Systems. *Anal. Chem.* **2010**, 82 (9), 3537–3546. <https://doi.org/10.1021/ac902585a>.
 - (77) Aoki, P. H. B.; Caetano, W.; Volpati, D.; Riul, A.; Constantino, C. J. L. Sensor Array Made with Nanostructured Films to Detect a Phenothiazine Compound. *Am. Sci. Publ.* **2008**, 8 (9), 4341–4348. <https://doi.org/10.1166/jnn.2008.297>.
 - (78) Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-Bio Interface. *Nat. Mater.* **2009**, 8 (7), 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>.
 - (79) Notter, R. H.; Taubold, R.; Mavis, R. D. Hysteresis in Saturated Phospholipid Films and Its Potential Relevance for Lung Surfactant Function in Vivo. *Exp. Lung Res.* **1982**, 3 (2), 109–127. <https://doi.org/10.3109/01902148209063286>.
 - (80) Pichot, R.; Watson, R. L.; Norton, I. T. Phospholipids at the Interface: Current Trends and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14 (6), 11767–11794. <https://doi.org/10.3390/ijms130611767>.
 - (81) Rodríguez Niño, M. R.; Lucero, A.; Rodríguez Patino, J. M. Relaxation

- Phenomena in Phospholipid Monolayers at the Air-Water Interface. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, 320 (1–3), 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.02.008>.
- (82) Sudheesh, S.; Ahmad, J.; Singh, G. S. Hysteresis of Isotherms of Mixed Monolayers of N -Octadecyl- N '-Phenylthiourea and Stearic Acid at Air/Water Interface . *ISRN Phys. Chem.* **2012**, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.5402/2012/835397>.
- (83) Frey, B. L.; Corn, R. M.; Weibel, S. C.; Madison, W. *Polarization-Modulation Approaches to Reflection – Absorption Spectroscopy*; 2006. <https://doi.org/10.1002/9780470027325.s2206>.
- (84) Liu, J.; Zou, A.; Mu, B. Toluidine Blue : Aggregation Properties and Distribution Behavior in Surfactin Micelle Solution. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, 75 (1), 496–500. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.025>.
- (85) Iraolagoitia, X. L. R.; Martini, M. F. M. Ca ²⁺ Adsorption to Lipid Membranes and the Effect of Cholesterol in Their Composition. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, 76 (1), 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.037>.
- (86) Chen, Y. F.; Tsang, K. Y.; Chang, W. F.; Fan, Z. A. Differential Dependencies on [Ca²⁺] and Temperature of the Monolayer Spontaneous Curvatures of DOPE , DOPA and Cardiolipin : Effects of Modulating the Strength of the Inter-Headgroup Repulsion †. *Soft Matter* **2015**, 11 (1), 4041–4053. <https://doi.org/10.1039/C5SM00577A>.
- (87) Mau, N. Van; Kajava, A. V; Bonfils, C.; Martinou, J. C.; Harricane, M. C. Interactions of Bax and TBid with Lipid Monolayers. *J. Membr. Biol.* **2006**, 207 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0799-7>.
- (88) Koller, D.; Lohner, K. The Role of Spontaneous Lipid Curvature in the Interaction of Interfacially Active Peptides with Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **2014**, 1838 (9), 2250–2259. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.05.013>.
- (89) Levin, I. W. Two Types of Hydrocarbon Chain Interdigitation in Sphingomyelin Bilayers. *Biochemistry* **1985**, 24 (22), 6282–6286. <https://doi.org/10.1021/bi00343a036>.
- (90) Liljeblad, J. F. D.; Bulone, V.; Tyrode, E.; Rutland, M. W.; Johnson, C. M. Phospholipid Monolayers Probed by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy : Instability of Unsaturated Phospholipids. *Biophys. J.* **2010**, 98 (10), L50–L52. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.009>.
- (91) Allison, R. R.; Sibata, C. H.; Brody, T.; Medicine, R.; Jenkins, L. W. Oncologic Photodynamic Therapy Photosensitizers : A Clinical Review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2010**, 7 (2), 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>.
- (92) P. H. B. Aoki, A. P. S.; Constantino, C. J. L., and C. M. M. Bioadhesive Giant Vesicles for Monitoring Hydroperoxidation in Lipid Membranes. *Soft Matter* **2015**, 11 (30), 5995–5998. <https://doi.org/10.1039/C5SM01019E>.
- (93) Goto, T. E.; Caseli, L. Understanding the Collapse Mechanism in Langmuir Monolayers through Polarization Modulation-Infrared Reflection Absorption Spectroscopy. *Langmuir* **2013**, 29, 9063–9071.

<https://doi.org/10.1021/la402044c>.

- (94) Zawisza, I.; Lachenwitzer, A.; Zamlynny, V.; Horswell, S. L.; Goddard, J. D.; Lipkowski, J. Electrochemical and Photon Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy Study of the Electric Field Driven Transformations of a Phospholipid Bilayer Supported at a Gold Electrode Surface. *Biophys. J.* **2003**, *85* (6), 4055–4075.
- (95) 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. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9* (43), 5814–5821. <https://doi.org/10.1039/b707890k>.
- (96) Qiao, L.; Ge, A.; Osawa, M.; Ye, S. Structure and Stability Studies of Mixed Monolayers of Saturated and Unsaturated Phospholipids under Low-Level Ozone. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (41), 17775. <https://doi.org/10.1039/c3cp52484a>.
- (97) Gomes, P. J.; Gonçalves Da Silva, A. M. P. S.; Ribeiro, P. A.; Oliveira, O. N.; Raposo, M. Radiation Damage on Langmuir Monolayers of the Anionic 1,2-Dipalmitoyl-Sn-Glycero-3-[Phospho-Rac-(1-Glycerol)] (Sodium Salt)(DPPG) Phospholipid at the Air-DNA Solution Interface. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *58*, 576–579. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.017>.