

Universidade Estadual Paulista – UNESP  
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências e Letras - Campus de Assis  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais  
POSMAT

Lucas Gontijo Moreira

**MODULANDO REAÇÕES FOTOQUÍMICAS EM MONOCAMADAS LIPÍDICAS  
DE *ESCHERICHIA COLI* COM MECANISMOS DE INSERÇÃO DOS  
FOTOSENSIBILIZADORES EOSINA DECIL ÉSTER E AZUL DE TOLUIDINA-O**



**ASSIS  
2023**

Lucas Gontijo Moreira

MODULANDO REAÇÕES FOTOQUÍMICAS EM MONOCAMADAS LIPÍDICAS  
DE *ESCHERICHIA COLI* COM MECANISMOS DE INSERÇÃO DOS  
FOTOSENSIBILIZADORES EOSINA DECIL ÉSTER E AZUL DE TOLUIDINA-O

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração Ciência de Materiais, sob orientação do Prof. Dr. Pedro Henrique Benites Aoki.

Assis

2023

M838m

Moreira, Lucas Gontijo

Modulando reações fotoquímicas em monocamadas lipídicas de Escherichia coli com mecanismos de inserção dos fotossensibilizadores eosina decil éster e azul de toluidina-O / Lucas Gontijo Moreira. -- Assis, 2023

83 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Letras, Assis

Orientador: Pedro Henrique Benites Aoki

1. Terapia fotodinâmica. 2. Filmes de Langmuir. 3. Membranas celulares. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências e Letras, Assis. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUCAS GONTIJO MOREIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.**

Aos 31 dias do mês de outubro do ano de 2023, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LUCAS GONTIJO MOREIRA, intitulada **Modulando reações fotoquímicas em monocamadas lipídicas de Escherichia coli com mecanismos de inserção dos fotossensibilizadores eosina decil éster e azul de toluidina-O**. 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, Professora Doutora DAYANE BATISTA TADA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciência e Tecnologia / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, Prof. Dr. WALLANCE MOREIRA PAZIN (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru. 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

Documento assinado digitalmente



PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI

Data: 31/10/2023 15:23:38-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

## AGRADECIMENTOS

A primeiro momento, gostaria de agradecer a você, caro leitor, pelo interesse em se aventurar no que é este trabalho, o qual foi feito com muito suor, carinho e de muita história por debaixo dos panos, com o objetivo de alguma forma agregar o nosso vasto conhecimento.

Aos meus eternos pais, Fábio e Madilde por todo o suporte na vida e constante aprendizado, se não fosse por eles eu não chegaria aonde estou.

Aos meus irmãos, por toda a força nesses últimos anos que me propiciaram a evoluir e estabelecer importantes laços.

Aos meu amigo e orientador Pedro, não há palavras pelo imenso aprendizado que transpassou de você para mim. Só posso agradecer por todo o futuro que nós construímos e por todas as oportunidades a mim, confiadas. Sou eternamente grato.

À Bina, praticamente a minha irmã desde quando ingressei ao grupo, e se manteve em todos os trabalhos de qual participei. Muito do que eu aprendi no ambiente de trabalho e como lidar e levar com leveza o nosso dia a dia foi contigo. Você é uma pessoa única.

À professora Karina e seu grupo, onde consegui amizades especiais e um imenso novo mundo em técnicas laboratoriais e de experiência para a vida. Conhecer esse lugar mudou a minha forma de pensar de muitos jeitos o qual levarei por toda a minha existência.

Ao grupo Nanotec, meu primeiro e único lugar para exercer a ciência, desde a graduação. Não há palavras para expressar o conhecimento, evolução e carinho existentes ali. Eu sou quem sou por causa de um lugar cheio de pessoas queridas que juntos, passamos por inúmeras situações a qual nos permitiu ser uma grande família e trazer relevância a nanociência!

A todos os meus amigos e amigas durante essa época da faculdade, aqueles que vieram, ficaram e se foram. Cada um de vocês contribuíram e muito para a execução desse trabalho, ainda mais em momentos tão duros como a fatível Covid-19.

Aos professores e funcionários da pós-graduação POSMAT, agradeço o incrível trabalho e assistência durante esse mestrado.

Ao Lucas do passado, você foi forte e paciente. E eu sei que você pensou no Lucas do futuro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2018/22214-6; 2020/15854-9; 2022/01971-9) pelo suporte financeiro.

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

MOREIRA, L. G. **Modulando reações fotoquímicas em monocamadas lipídicas de *Escherichia coli* com mecanismos de inserção dos fotossensibilizadores eosina decil éster e azul de toluidina-O.** 2023. 83f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia dos Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2023.

## RESUMO

Danos fotodinâmicos ao envelope celular podem inativar microrganismos, o que deve auxiliar no combate ao fenômeno de super-resistência, atualmente potencializado pelo uso indiscriminado de antibióticos. A inativação microbiana depende da incorporação efetiva de fotossensibilizadores (FSs) nas membranas bacterianas, de forma a desencadear reações oxidativas sob iluminação controlada. Nesta dissertação, modelos miméticos da membrana bacteriana de *Escherichia coli* (*E. coli*) foram construídos via filmes de Langmuir para desvendar os mecanismos de ligação e os resultados de oxidação fotoinduzidos pelos FSs eosina decil éster (EosDEC) e o azul de toluidina-O (ATO). As isotermas de pressão de superfície indicaram a adsorção de ambos FSs nas membranas, obtendo expansões na área das isotermas de até 34% e 12%, para a EosDEC e o ATO, respectivamente. A espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos filmes de Langmuir-Schaefer (LS) revelaram que os mecanismos de ligação da EosDEC e do ATO são dominados por interações eletrostáticas com os grupos fosfatos e da carbonila, com inserções limitadas nas cadeias alifáticas dos lipídios. A irradiação nas membranas de *E. coli* com ATO reduziu a sua área em 2,5%, indicando a perda de material para a subfase, devido à clivagem das cadeias lipídicas gerada por reações dependentes de contato com estados excitados de ATO. Em contraste, um aumento de 3,9% na área das membranas irradiadas de *E. coli* com EosDEC foi detectado, sugerindo hidroperoxidação lipídica, proveniente de reações que independem do contato do FS. Mesmo considerando uma pequena inserção nas cadeias, a EosDEC saturada pode ter particionado para domínios predominantemente saturados, evitando o contato direto com as insaturações presentes nas membranas. Dessa forma, tais resultados indicam importantes

efeitos na busca da inativação bacteriana, através do uso de modelos biológicos complexos de membranas bacterianas.

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica; Filmes de Langmuir; Membranas celulares.

## ABSTRACT

Photodynamic damage to the cell envelope can deactivate microorganisms, which should assist in combating the phenomenon of super-resistance, currently exacerbated by the indiscriminate use of antibiotics. Microbial inactivation depends on the effective incorporation of photosensitizers (PSs) into bacterial membranes, to trigger oxidative reactions under controlled illumination. In this work, mimetic models of the *Escherichia coli* (*E. coli*) bacterial membrane were constructed using Langmuir films to unravel the binding mechanisms and the results of photoinduced oxidation by the FSs eosin decyl ester (EosDEC) and toluidine blue-O (TBO). Surface pressure isotherms indicated the adsorption of both FSs on the membranes, resulting in expansions of the isotherm area up to 34% and 12% for EosDEC and TBO, respectively. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) of Langmuir-Schaefer (LS) films revealed that the binding mechanisms of EosDEC and TBO are dominated by electrostatic interactions with phosphate and carbonyl groups, with limited insertions into the aliphatic lipid chains. Irradiation of *E. coli* membranes with TBO reduced their area by 2.5%, indicating material loss to the subphase, due to cleavage of lipid chains generated by contact-dependent reactions with excited states of TBO. In contrast, a 3.9% increase in the area of *E. coli* membranes irradiated with EosDEC was detected, suggesting lipid hydroperoxidation resulting from reactions independent of PS contact. Even with limited insertion into the chains, saturated EosDEC may have partitioned into predominantly saturated domains, avoiding direct contact with the unsaturations present in the membranes. In that matter, these results indicate significant effects in the pursuit of bacterial inactivation, which were reached using complex biological models of bacterial membranes.

**Keywords:** photodynamic therapy; Langmuir films; cell membranes.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Protocolo de marcação de Gram realizado em uma cocultura de *Staphylococcus epidermidis* (Gram-positiva, colorida em vermelho escuro e roxo) e *Escherichia coli* (Gram-negativa, coloridas em vermelho claro e tons de rosa). Enquanto a primeira apresenta formato circular, e muitas vezes agrupadas em várias unidades, a segunda possui formato em bastonetes, encontrando-se mais separada e pouco aglomerada .....16
- Figura 2.** Esquema molecular de um fosfolipídio da membrana bacteriana. A porção polar é representada em verde, trazendo alguns exemplos existentes em bactérias: fosfatidiletanolaminas (PE); fosfatidilglicerol (PG); fosfatidilserinas (PS) e cardiolipina (CL). A porção apolar é representada em azul, mostrando exemplos base de cadeias alifáticas saturadas e insaturadas. A quantidade de cadeias, número de carbonos, elementos existentes e quantidade de insaturações podem variar entre os lipídios .....18
- Figura 3.** Estruturas moleculares basais do (a) peptideoglicano e do (b) ácido teicóico .....19
- Figura 4.** Estrutura molecular de um lipopolissacarídeo (LPS), onde a porção mais basal é onde se encontra o lipídio A (LA), enquanto a sua porção exterior possui o antígeno-O. Sua estrutura contém diversos açúcares diferentes, sendo eles: ácido cetodesoxioctônico (KDO), heptose (HEP), glicose (GLU), galactose (GAL), n-acetilglucosamina (GLUNAC), ramnose (RHA), manose (MAN) e abequose (ABE). Algumas variações a respeito da quantidade e posições dos açúcares, assim como a repetição de unidades podem ser encontradas .....21
- Figura 5.** Representação esquemática do envelope celular. Do lado esquerdo têm-se a estrutura de uma Gram-positiva, enquanto do lado direito da Gram-negativa. Descrição das estruturas abreviadas: PI, proteína integral; PTS, proteína superficial ligada de forma covalente; PMI, proteína da membrana interna; PME, proteína da membrana externa; LP, lipoproteína; LPS, lipopolissacarídeos .....23
- Figura 6.** Mecanismos de ação comuns aos antibióticos. Alguns dos exemplos indicados são: (i) ligação a sítios moleculares específicos, presentes no envoltório celular; (ii) permeação do antibacteriano ao envelope celular; (iii) interação seletiva com a membrana celular, (iv) o material genético e (v) estruturas proteicas, (vi) além de outras formas de inibição no meio citoplasmático .....24
- Figura 7.** Mecanismos de resistência comuns as bactérias. (i) Modificações nos sítios alvos presentes na superfície do envoltório bacteriano, não permitem o contato com antibióticos, os quais não desencadeiam o seu tratamento. (ii) Mudanças no envoltório dificultam a permeação dos fármacos, (iii) enquanto poucos conseguem adentrar no meio intracelular. (iv) No meio citoplasmático, mudanças nas estruturas celulares alvos podem invalidar a ligação junto ao antibiótico. Por outro lado, (v) bombas de efluxo ajudam no transporte dos agentes indesejados pela bactéria para o meio extracelular. Ainda, mecanismos enzimáticos e mudanças genéticas auxiliam tanto na (vi) inibição quanto na (vii) destruição dos agentes antibacterianos .....29

**Figura 8.** Diagrama de Jablonsk, indicando as transições radiativas (fluorescência e fosforescência) e não radiativas (conversões internas, conversão entre sistemas e relaxação vibracional) em diferentes camadas energéticas, com cada uma delas contendo 4 níveis vibracionais. O estado fundamental é denominado  $S_0$ , onde a molécula se encontra em seu estado neutro e não ativado. Enquanto isso, o estado singlete é determinado por  $S_1$  e  $S_2$ . O estado tripleto excitado é indicado na porção da direita por  $T_1$ . Em  $T_1$  a molécula pode desencadear reações fotoquímicas, como as reações do tipo 1 e tipo 2 .....31

**Figura 9.** Estruturas moleculares de diferentes fotossensibilizadores (FSs) da família dos fenotiazínicos (porção superior) e dos xantênicos (porção inferior), relatados na literatura como agentes em fototerapia .....33

**Figura 10.** Detalhes da cuba de Langmuir, equipamento que permite a construção dos filmes de Langmuir, Langmuir-Schaefer (LS) e Langmuir-Blodgett (LB) .....35

**Figura 11.** (a) Estrutura da molécula anfifílica ácido esteárico, o qual contém uma cadeia alifática de 17 carbonos, e uma porção polar referente ao grupo carboxílico. (b) Isoterma  $\pi$ -A do ácido esteárico com suas etapas de organização molecular na forma de filme monomolecular. O ponto de colapso da membrana (PCp) é indicado em aproximadamente 43 mN/m, onde há perda do controle organizacional do material. (c) Ilustrações esquemáticas das fases referentes aos níveis de organização molecular, saindo de uma fase gasosa e expandida (FG), sendo então comprimidas, atingindo as fases líquida (FL) e sólida/condensada (FC) em maiores pressões superficiais .....36

**Figura 12.** Modelos de interação molecular propostos pelo (a) ATO e pela (b) EosDEC quando fotoativados em membranas de bactérias simplificadas. Enquanto o ATO demonstrou reações de clivagem alquílica somente no fosfolípídio DOPG, a EosDEC estabeleceu a mesma clivagem nos lípidos DOPE, DOPG e CL, em maiores intensidades .....38

**Figura 13.** Foto de um experimento de irradiação feito na cuba de Langmuir .....42

**Figura 14.** (a) Representação esquemática dos filmes de Langmuir e LS do extrato lipídico de *E. coli*, além das técnicas de caracterização realizadas. (i) A solução de clorofórmio é espalhada na interface ar/água e o clorofórmio é deixado evaporar por 10 minutos; (ii) compressão simétrica das barreiras até o material entre as barreiras atingir 30 mN/m de pressão; (iii) O substrato toca horizontalmente a interface (iv) transferindo a monocamada da interface para o substrato, completando a deposição LS. As etapas (iii) e (iv) são repetidas até que o substrato atinja 60 camadas depositadas. Durante a deposição, o crescimento do filme LS é caracterizado por espectroscopia de absorção UV-Vis e após as 60 deposições por FTIR. (b) Estruturas moleculares da EosDEC e do ATO .....43

**Figura 15.** (a) Isoterma da pressão de superfície (mN/m) pela área ( $\text{cm}^2/\text{mg}$  de extrato lipídico) da monocamada do extrato lipídico de *E. coli* pura. (b) Isotermas da pressão de superfície (mN/m) pela área molecular média ( $\text{\AA}^2$ ) dos FSs EosDEC (laranja) e do ATO (azul) .....45

**Figura 16.** Isotermas da pressão de superfície (mN/m) pela área ( $\text{cm}^2/\text{mg}$  de extrato lipídico) das monocamadas mistas de (a) *E. coli*:EosDEC (10:1 e 5:1 v/v) e (b) *E. coli* em solução de ATO a  $10^{-5}$  mol/L. A isoterma  $\pi$ -A da monocamada do extrato lipídico de *E. coli* pura é dada como referência .....46

**Figura 17.** Módulo de elasticidade no plano ( $\text{Cs}^{-1}$ ) para as monocamadas do extrato lipídico de *E. coli*, assim como para as incorporações dos FSs (a) EosDEC (10:1 e 5:1) e (b) ATO ( $10^{-5}$  mol/L). A equação  $\text{Cs}^{-1} = -A((d\pi)/(dA))$  foi utilizada em função da área ( $\text{cm}^2/\text{mg}$  de extrato) e da pressão superficial (inserções das figuras) .....48

**Figura 18.** (a) Espectro de absorção UV-Vis do filme LS do extrato de *E. coli* depositado em substrato de quartzo. O crescimento do filme foi monitorado a cada 4 camadas até 60 camadas. (b) Dependência linear da absorbância em 200 nm (reta) com o número de camadas LS depositadas. O desvio padrão dos dados são apresentados, mas não são evidentes. A equação da reta obtida é indicada junto a curva .....49

**Figura 19.** (a) Espectro de absorção UV-Vis do filme LS de EosDEC depositados em substrato de quartzo. O crescimento do filme foi monitorado a cada 4 camadas até 60 camadas. A inserção mostra a dependência linear da absorbância em 200 e 543 nm em função do número de camadas depositadas. O desvio padrão dos dados são apresentados, mas não são evidentes. As equações das retas obtidas são indicadas junto as curvas. (b) Espectro UV-Vis da solução de EosDEC em clorofórmio ( $10^{-5}$  mol/L). Uma figura esquemática dos agregados J de EosDEC é ilustrada na porção superior. A coloração dos átomos seguem a correspondência: carbono (cinza), hidrogênio (branco), bromo (marrom) e oxigênio (vermelho) .....50

**Figura 20.** (a) Espectro de absorção UV-Vis do filme LS do extrato de *E. coli* com EosDEC (10:1 v/v) depositado em substrato de quartzo. O crescimento do filme foi monitorado a cada 4 camadas até 60 camadas. (b) Dependência linear da absorbância em 200 e 543 nm (reta) em função do número de camadas LS depositadas. O desvio padrão dos dados são apresentados, mas não são evidentes. As equações das retas obtidas são indicadas junto as curvas .....51

**Figura 21.** (a) Espectro de absorção UV-Vis do filme LS do extrato de *E. coli* com ATO ( $10^{-5}$  mol/L) depositado em substrato de quartzo. O crescimento do filme foi monitorado a cada 4 camadas até 60 camadas. A inserção mostra a dependência linear da absorbância em 230 e 579 nm em função do número de camadas depositadas. O desvio padrão dos dados são apresentados, mas não são evidentes. As equações das retas obtidas são indicadas junto as curvas. (b) Espectro UV-Vis da solução de ATO em água ultrapura ( $10^{-5}$  mol/L). Uma figura esquemática dos agregados H do ATO é ilustrada na porção superior. A coloração dos átomos segue a correspondência: carbono (cinza), hidrogênio (branco), nitrogênio (azul) e enxofre (amarelo) .....52

**Figura 22.** Espectros FTIR dos filmes LS (60 camadas) do extrato lipídico de *E. coli* (preto), EosDEC (laranja) e *E. coli*:EosDEC 10:1 v/v (amarelo) depositados sobre substratos de germânio. Os espectros foram divididos em região (a) polar e (b) apolar. (c) Ilustração esquemática da interação da EosDEC com a monocamada de *E. coli*. O extrato é composto por fosfolipídios insaturados e saturados (57,5% PE, 15,1% PG, 9,8% CL e 17,6% substâncias desconhecidas). O sinal negativo na cabeça polar de alguns fosfolipídios foi usado para representar os fosfolipídios carregados negativamente (PG e CL). A inserção mostra a EosDEC se aproximando dos fosfolipídios principalmente pelas cabeças polares (1) e em menor extensão pelas caudas (2). Os fosfolipídios presentes no extrato podem ter diferentes tamanhos ( $R_2$ ) e diferentes grupos polares ( $R_1$ ) .....54

**Figura 23.** Espectros FTIR dos filmes LS do extrato lipídico de *E. coli* (preto), de *E. coli* + ATO  $10^{-5}$  mol/L (verde), os quais foram depositados sobre substratos de germânio. O espectro do pó do ATO (azul) também é fornecido como referência. Os espectros foram divididos em região (a) polar e (b) apolar. (c) Ilustração esquemática da interação do ATO com as monocamadas de *E. coli*. O extrato é composto por fosfolipídios insaturados e saturados (57,5% PE, 15,1% PG, 9,8% CL e 17,6% substâncias desconhecidas). O sinal negativo na cabeça polar de alguns fosfolipídios foi usado para representar os fosfolipídios carregados negativamente (PG e CL). A inserção mostra o ATO se aproximando dos fosfolipídios principalmente pela atração eletrostática entre os grupos amina-catiônicos e os fosfatos aniônicos. Os fosfolipídios presentes no extrato podem ter diferentes tamanhos ( $R_2$ ) e diferentes grupos polares ( $R_1$ ) .....56

**Figura 24.** Evolução da área relativa ( $A/A_0$ ) entre os filmes de Langmuir não irradiados (preto) e irradiados (vermelho) de (a) *E. coli*:EosDEC (10:1 v/v) e (b) *E. coli* em ATO ( $10^{-5}$  mol/L). A área relativa foi calculada baseada na área inicial dos filmes ao atingir 30 mN/m ( $A_0$ ), a qual divide todas as áreas subsequentes do experimento ( $A$ ). As setas verdes indicam a diferença da curva média irradiada em relação a curva não irradiada, após 110 min de experimento .....58

**Figura 25.** Mecanismos propostos para as reações independentes de contato e dependentes de contato entre a monocamada do extrato lipídico de *E. coli* com a EosDEC e o ATO, respectivamente. Terminologias: Estados fundamental ( $S_0$ ) e tripleto excitado ( $T_1$ ) dos FSs; Estado fundamental ( $^3O_2$ ) e singleto ( $^1O_2$ ) do oxigênio; Espécies radicais genéricas ( $R\bullet$ ); Lipídio não oxidado (LH); Radicais centrados em carbono lipídico ( $L\bullet$ ), radicais peroxil ( $LOO\bullet$ ) e alcoxil ( $LO\bullet$ ); Hidroperóxido lipídico (LOOH) .....61

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composição polar dos lipídios presentes no extrato da <i>E. coli</i> .....                                                                                                                                                                                           | 40 |
| <b>Tabela 2.</b> Mudanças na área relativa do extrato lipídico de <i>E. coli</i> [ $((A - A_0)/A_0) \times 100$ ]. $A_0$ e $A$ são as áreas extrapoladas em 30 mN/m para as isothermas $\pi$ -A de <i>E. coli</i> pura e <i>E. coli</i> contendo EosDEC ou ATO, respectivamente ..... | 47 |
| <b>Tabela 3.</b> Atribuições dos principais modos vibracionais dos filmes LS de <i>E. coli</i> , EosDEC, <i>E. coli</i> :EosDEC (10:1 v/v) e <i>E. coli</i> + ATO ( $10^{-5}$ mol/L) .....                                                                                            | 57 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

|                                   |                                                                            |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>Å</b>                          | Angstrom, 10 <sup>-8</sup> cm                                              |
| <b>ATO</b>                        | Azul de toluidina-O                                                        |
| <b>BAM</b>                        | Microscopia de ângulo de Brewster                                          |
| <b>C<sub>s</sub><sup>-1</sup></b> | Módulo de compressão superficial ou elasticidade no plano                  |
| <b>CL</b>                         | Cardiolipina                                                               |
| <b>DOPE</b>                       | 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (PE com dupla cauda insaturada) |
| <b>DOPG</b>                       | 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (PG com dupla cauda insaturada)    |
| <b><i>E. coli</i></b>             | <i>Escherichia coli</i>                                                    |
| <b>EosDEC</b>                     | Eosina decil éster                                                         |
| <b>EROs</b>                       | Espécies reativas de oxigênio                                              |
| <b>FC</b>                         | Fase condensada ou fase sólida                                             |
| <b>FG</b>                         | Fase gasosa                                                                |
| <b>FL</b>                         | Fase líquida                                                               |
| <b>FS</b>                         | Fotossensibilizador                                                        |
| <b>FSs</b>                        | Fotossensibilizadores                                                      |
| <b>FTIR</b>                       | Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier                |
| <b>Ge</b>                         | Germnio                                                                   |
| <b>IFDM</b>                       | Inativação fotodinmica de microrganismos                                  |
| <b>LA</b>                         | Lipídio A                                                                  |
| <b>LB</b>                         | Filmes de Langmuir-Blodgett                                                |
| <b>LED</b>                        | Diodo emissor de luz                                                       |
| <b>LP</b>                         | Lipoproteina                                                              |
| <b>LPS</b>                        | Lipopolissacarídeo                                                         |
| <b>LS</b>                         | Filmes de Langmuir-Schaefer                                                |
| <b>MDR</b>                        | Bactérias multirresistentes                                                |
| <b>ME</b>                         | Membrana externa                                                           |
| <b>MI</b>                         | Membrana interna ou membrana plasmática                                    |
| <b>PCp</b>                        | Ponto de colapso da isoterma $\pi$ -A                                      |

|                              |                                                                                        |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PE</b>                    | Fosfatidiletanolamina                                                                  |
| <b>PG</b>                    | Fosfatidilglicerol                                                                     |
| <b><math>\pi</math>-A</b>    | Pressão superficial versus área                                                        |
| <b>PM-IRRAS</b>              | Espectroscopia de reflexão e absorção na região do infravermelho com módulo polarizado |
| <b>PP</b>                    | Parede celular de peptideoglicanos                                                     |
| <b>PPS</b>                   | Periplasmo                                                                             |
| <b>PS</b>                    | Fosfatidilserina                                                                       |
| <b>R</b>                     | Radical de ligação química                                                             |
| <b>REF</b>                   | Referência                                                                             |
| <b>S<sub>0</sub></b>         | Estado fundamental                                                                     |
| <b>S<sub>1</sub></b>         | Estado excitado singleto (1° camada energética)                                        |
| <b>S<sub>2</sub></b>         | Estado excitado singleto (2° camada energética)                                        |
| <b>T<sub>1</sub></b>         | Estado excitado tripleto (1° camada energética)                                        |
| <b>UA</b>                    | Unidades arbitrárias                                                                   |
| <b><math>\nu</math></b>      | Estiramento vibracional                                                                |
| <b><math>\nu_{as}</math></b> | Estiramento antissimétrico                                                             |
| <b><math>\nu_s</math></b>    | Estiramento simétrico                                                                  |
| <b>UV-Vis</b>                | Ultravioleta visível                                                                   |
| <b>v/v</b>                   | Proporção volumétrica                                                                  |

## APRESENTAÇÃO

O candidato Lucas Gontijo Moreira é engenheiro biotecnológico, formado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unidade Assis/SP. Desde março/2021 é mestrando no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, na Unesp. O candidato vem demonstrando interesse em desenvolver pesquisa acadêmica desde o seu 2º ano de graduação (2017), quando iniciou sua participação nas atividades do laboratório de Nanobiotecnologia, coordenado pelo prof. Pedro Henrique Benites Aoki. Desenvolveu seu projeto de iniciação científica intitulado “Foto-oxidação de filmes de Langmuir como sistemas miméticos de *Escherichia coli*”, com bolsa FAPESP (Processo nº 2018/13021-0; de 01/09/2018 a 31/01/2021). Os dados adquiridos em sua IC compuseram o artigo intitulado “*Chain Cleavage of Bioinspired Bacterial Membranes Photoinduced by Eosin Decyl Ester*”. Moreira, L. G.; Almeida, A. M.; Camacho, S. A.; Estevão, B. M.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. *Langmuir*, 36 (32), 9578–9585, 2020, que fundamentou seu projeto de mestrado.

Neste mestrado, além da experiência adquirida na fabricação e caracterização de filmes de Langmuir e de vesículas unilamelares gigantes (GUVs), o candidato tem se aprofundado no estudo de técnicas espectroscópicas como FTIR e UV-Vis, como ferramentas de investigação de filmes nanoestruturados formados por multicamadas Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS). Os resultados obtidos compuseram o artigo intitulado “*Modulating Photochemical Reactions in Langmuir Monolayers of Escherichia coli Lipid Extract with the Binding Mechanisms of Eosin Decyl Ester and Toluidine Blue-O Photosensitizers*”. Moreira, L. G.; Almeida, A. M.; Nield, T.; Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B. *Journal of Photochemical and Photobiology B*, 218, 112173, 2021, que serve como base para esta dissertação.



A primeira seção desta dissertação é composta pela introdução e seus objetivos, envolvendo os principais conceitos para a compreensão da pesquisa realizada. Na segunda seção estão os procedimentos experimentais realizados. Os resultados e discussões dos dados estão apresentados na seção seguinte, a qual é dividida entre a incorporação das moléculas fotossensibilizantes nas membranas e o seu uso como agentes fotodinâmicos em monocamadas lipídicas da *E. coli*. Na última seção, encontra-se de forma sucinta as principais conclusões obtidas deste trabalho.

## SUMÁRIO

|                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                              | <b>14</b> |
| 1.1 O envelope celular bacteriano .....                                                | 15        |
| 1.2 Super-resistência bacteriana.....                                                  | 23        |
| 1.3 Inativação fotodinâmica de microrganismos (IFDM).....                              | 30        |
| 1.4 Filmes de Langmuir como plataformas miméticas para membranas celulares.....        | 33        |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>                                                               | <b>39</b> |
| <b>3 METODOLOGIA.....</b>                                                              | <b>40</b> |
| 3.1 Materiais e soluções.....                                                          | 40        |
| 3.2 Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS).....                                   | 41        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>                                                 | <b>45</b> |
| 4.1 Adsorção da EosDEC e do ATO nas monocamadas de <i>E. coli</i> .....                | 45        |
| 4.2 Fotoativação da EosDEC e do ATO incorporados nas membranas de <i>E. coli</i> ..... | 58        |
| <b>5 CONCLUSÃO .....</b>                                                               | <b>62</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                | <b>64</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A super-resistência bacteriana é um problema de saúde pública mundial (BASAK; SINGH; RAJURKAR, 2016; MASADEH et al., 2013; PULINGAM et al., 2022) que tem sido exacerbado pelo uso indiscriminado e descarte inadequado de antibióticos (GRENNI; ANCONA; BARRA CARACCILO, 2018; MISHRA et al., 2012). Além disso, essa resistência é maior para bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, devido ao seu complexo envelope celular composto por membranas internas e externas de fosfolipídios e lipopolissacarídeos, respectivamente (ALVES et al., 2014; GOLDFINE, 1982, 1984; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010; STOKES et al., 2017). Ainda, proteínas como as porinas se encontram ancoradas em porções da membrana externa, funcionando como uma barreira protetora, sendo responsáveis pela regulação do transporte de nutrientes para a bactéria (DELCOUR, 2009; SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). Sendo assim, a atividade antibiótica de muitos fármacos depende da internalização no envelope celular através das porinas, as quais podem ser afetadas por mutações genéticas, levando a cepa adquirir resistência ao fármaco e propagá-lo para gerações futuras (CHOI; LEE, 2019). Desta forma, a geração de novos antibióticos não consegue acompanhar essa taxa de mutação, exigindo cada vez mais novas estratégias para combater o surgimento de bactérias super-resistentes.

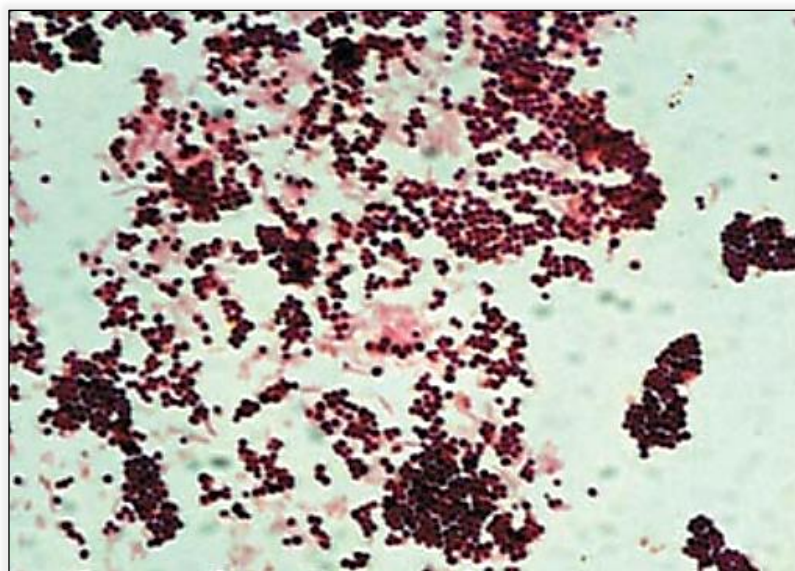
Nesse cenário, a inativação fotodinâmica de microrganismos (IFDM) (AWAD et al., 2016; BUCHOVEC et al., 2017; DELCANALE et al., 2020; GAI et al., 2018; KAIRYTE et al., 2012; MOSLEMI et al., 2018) surge então como uma modalidade terapêutica não invasiva, capaz de reduzir ou eliminar completamente cepas bacterianas. A terapia não se baseia na internalização do agente químico (ALVES et al., 2014; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; HAMBLIN; HASAN, 2004; TOPALOGLU; GULSOY; YUKSEL, 2013), mas no dano fotodinâmico

causado ao envelope celular, razão pela qual é considerada uma alternativa promissora para evitar os fenômenos de super-resistência (ALMEIDA; FAUSTINO; TOMÉ, 2015; COSTA et al., 2012; HAMBLIN; ABRAHAMSE, 2019). Neste contexto, o envelope celular emerge como o principal alvo da terapia, uma vez que representa a barreira física inicial da bactéria e o ponto de entrada de qualquer agente químico. Portanto, esta introdução aborda a natureza do envelope celular, sua composição, bem como as principais estratégias empregadas pelas bactérias para resistir aos tratamentos convencionais. Além disso, explora como a IFDM se destaca como uma alternativa eficaz no combate a microrganismos, destacando as ferramentas essenciais para alcançar tal eficiência.

### 1.1 O envelope celular bacteriano

O envelope celular é a estrutura que envolve e protege o citoplasma de uma célula, compreendendo a membrana celular e vários outros componentes (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). Em sua evolução, organismos procariontes, como as bactérias, desenvolveram uma série de estratégias para se protegerem em um ambiente hostil, uma vez que não possuem organelas membranosas para desempenhar essas funções (MURAT; BYRNE; KOMEILI, 2010). Esse envelope celular deve desempenhar funções cruciais, como a captação de energia do ambiente circundante para a sobrevivência e a eliminação de resíduos desnecessários. Portanto, é comum encontrar envelopes celulares complexos e altamente especializados em diversas espécies bacterianas, que se baseiam em segregações moleculares para cumprir essas funções vitais (MURAT; BYRNE; KOMEILI, 2010; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). Além disso, sendo a barreira que separa os ambientes interno e externo, a superfície do envelope celular é o local onde ocorrem inúmeras reações químicas que coordenam esses processos orgânicos (SALTON; OWEN, 1976).

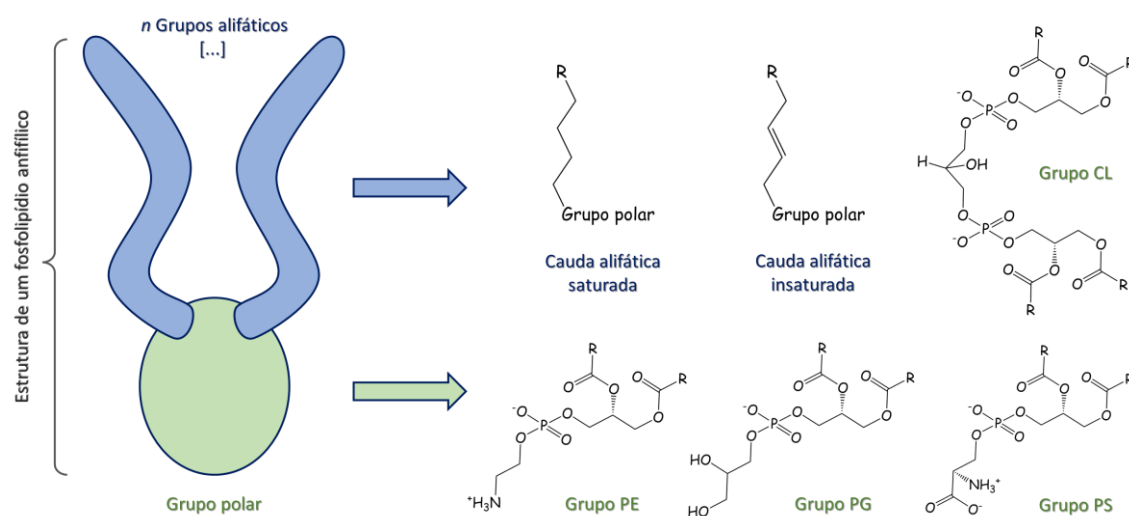
Meados de 1882, Christian Gram desenvolveu um protocolo de coloração que permitiu a classificação da maioria das bactérias em dois grupos distintos. O primeiro grupo retém o corante de Gram, enquanto o segundo não (PARAY et al., 2023). Essa diferença decorre de variações estruturais no envelope celular dessas duas categorias de bactérias. As bactérias Gram-negativas possuem três componentes principais em seu envelope, da camada mais externa para a mais interna: a membrana externa (ME), uma parede de peptidoglicano (PP) e a membrana plasmática ou interna (MI). Por outro lado, as bactérias Gram-positivas, que retêm o corante de Gram, apresentam algumas distinções em relação às Gram-negativas, sendo a ausência da membrana externa o destaque mais significativo (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). A Figura 1 ilustra um exemplo da coloração de Gram, marcando as células Gram-positivas de *Staphylococcus epidermidis*, contendo colorações mais escuras, enquanto as bactérias Gram-negativas de *Escherichia coli* são demarcadas com tons mais claros (MOYES; REYNOLDS; BREAKWELL, 2009).



**Figura 1.** Protocolo de marcação de Gram realizado em uma cocultura de *Staphylococcus epidermidis* (Gram-positiva, colorida em vermelho escuro e roxo) e *Escherichia coli* (Gram-negativa, coloridas em vermelho claro e tons de rosa). Enquanto a primeira apresenta formato circular, e muitas vezes agrupadas em várias unidades, a segunda possui formato em bastonetes, encontrando-se mais separada e pouco aglomerada. Retirada de: (MOYES; REYNOLDS; BREAKWELL, 2009).

A membrana interna de uma bactéria é constituída por uma bicamada majoritária de fosfolipídios (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010), os quais podem se distinguir de acordo com os seus grupos químicos presentes nas porções polares e apolares. Na literatura, é reportado que as bactérias possuem fosfolipídios como, as fosfatidiletanolaminas (PE), os fosfatidilgliceróis (PG), cardiolipinas (CL) e até mesmo fosfatidilserinas (PS) (GOLDFINE, 1982). Além disso, outras classes de lipídios podem estar presentes, variando em tamanho das porções apolares e quantidade de insaturações (SOHLENKAMP; GEIGER, 2015). Observa-se também uma variação na proporção dessas classes de fosfolipídios entre diferentes espécies bacterianas. Por exemplo, a *Escherichia coli* (cepa K-12), frequentemente considerada representante das Gram-negativas, possui aproximadamente 72% de PEs, 24% de PGs e 4% de CL em sua membrana interna (ISHINAGA; KANAMOTO; KITO, 1979). Em contraste, a *Salmonella typhimurium* possui 60% de PEs, 33% de PGs e 7% de CL (GOLDFINE, 1984). Enquanto isso, nas Gram-positivas geralmente se observam proporções relativamente maiores de fosfolipídios aniônicos, como os fosfatidilgliceróis, em comparação com outras classes lipídicas (GOLDFINE, 1982).

Independentemente da composição, a maioria das funções normalmente associadas às organelas de eucariotos é desempenhada na membrana plasmática de bactérias (MURAT; BYRNE; KOMEILI, 2010; SALTON; OWEN, 1976). Isso ocorre porque essas funções são executadas em conjunto com outra componente da membrana interna, as proteínas. Elas colaboram em mecanismos moleculares complexos e interativos, desencadeando cascatas de reações químicas para atingir objetivos específicos, como a síntese de novas moléculas (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010) e o transporte celular (DALBEY; WANG; KUHN, 2011). A Figura 2 mostra a estrutura base do fosfolipídio de membrana, assim como algumas variações das classes químicas encontradas em distintas espécies bacterianas.

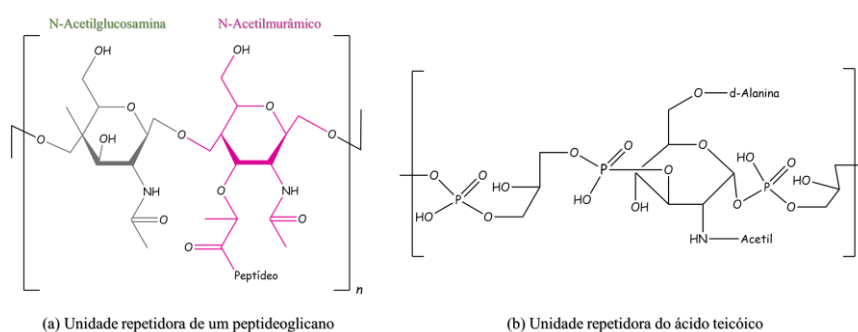


**Figura 2.** Esquema molecular de um fosfolípido da membrana bacteriana. A porção polar é representada em verde, trazendo alguns exemplos existentes em bactérias: fosfatidiletanolaminas (PE); fosfatidilglicerol (PG); fosfatidilserinas (PS) e cardiolipina (CL). A porção apolar é representada em azul, mostrando exemplos base de cadeias alifáticas saturadas e insaturadas. A quantidade de cadeias, número de carbonos, elementos existentes e quantidade de insaturações podem variar entre os lipídios.

O segundo componente referente ao envelope celular diz a respeito da parede celular de peptidoglicanos (PP), se tratando de uma rígida camada exoesquelética, a qual pode evitar, por exemplo, a lise celular em um meio salino (KOCH, 1998). Os peptidoglicanos são formados por unidades repetitivas de um dissacarídeo composto de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina, ligado a cadeias laterais de peptídeos. Essas extremidades são responsáveis pela formação de ligações cruzadas, determinadas pelas pontes peptídicas, permitindo a repetição de inúmeras unidades (VOLLMER; BLANOT; DE PEDRO, 2008). Diferentes composições e orientações químicas das pontes peptídicas podem ocorrer em várias espécies bacterianas, de acordo com a combinação de diferentes aminoácidos e o número de unidades repetidas (VOLLMER; BLANOT; DE PEDRO, 2008). Devido ao elevado número de repetições e ao peso molecular substancial, a parede de peptidoglicanos adquire características de rigidez que frequentemente influenciam na determinação da forma celular (TYPAS et al., 2012). Assim, essas propriedades da parede de peptidoglicanos muitas vezes desempenham

um papel crucial na diferenciação de diversas subclasses de bactérias com base em sua morfologia.

Tanto as bactérias Gram-negativas quanto as Gram-positivas compartilham uma composição química semelhante em relação à sua estrutura de peptideoglicanos (VOLLMER; BLANOT; DE PEDRO, 2008). A principal distinção reside na espessura da camada que envolve a membrana interna (MI). As bactérias Gram-negativas possuem uma ou poucas camadas de peptideoglicanos com apenas alguns nanômetros de espessura, enquanto as Gram-positivas apresentam múltiplas camadas, variando de 30 a 100 nm de espessura (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). Uma das diferenças mais marcantes é que as Gram-positivas geralmente possuem um maior número de ramificações em seus peptídeos, que atuam como locais de interação com proteínas e outras moléculas da superfície, como ácidos teicóicos e lipoteicóicos. Essas proteínas superficiais desempenham papéis significativos no reconhecimento celular e na adesão a superfícies (NAVARRE; SCHNEEWIND, 1999). Por outro lado, os ácidos teicóicos e seus derivados criam uma barreira com carga aniônica que se estende além da superfície da célula, proporcionando proteção e interação com cátions de interesse, como metais e sais, influenciando a porosidade e a homeostase celular (NAVARRE; SCHNEEWIND, 1999). Desta forma, tais características e propriedades, em conjunto acabam por discernir e agrupar diferentes classes bacterianas. A Figura 3 mostra a unidade química repetidora tanto do peptideoglicano, como do ácido teicóico.



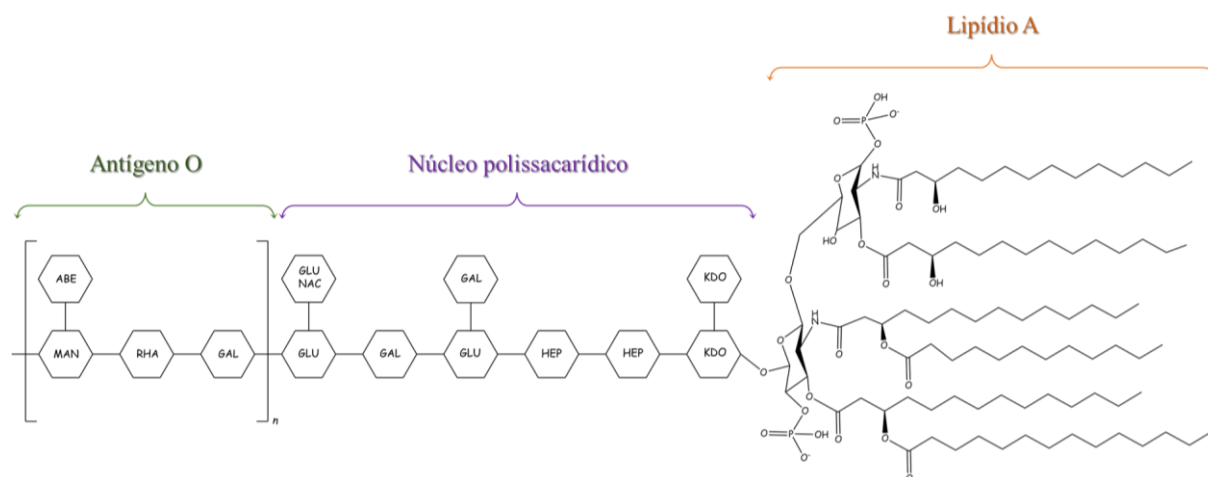
**Figura 3.** Estruturas moleculares basais do (a) peptideoglicano e do (b) ácido teicóico.



No caso das bactérias Gram-negativas, a porção terminal de um conjunto de peptideoglicanos geralmente está associada às lipoproteínas (LP), que são lipídios ligados aos terminais aminos de pequenas proteínas (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). Essas lipoproteínas estão localizadas na terceira estrutura do envelope celular, a membrana externa (ME). O espaço entre a membrana interna (MI) e a ME, que contém a camada de peptideoglicano, é comumente chamado de periplasmo (PPS) (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). Este espaço não apenas abriga os peptídeos, mas também funciona como um compartimento aquoso na célula. O periplasmo é um ambiente denso, repleto de proteínas, com maior viscosidade em comparação ao citoplasma, e essas proteínas desempenham funções essenciais e desencadeiam cascatas químicas benéficas para o envelope celular (MILLER; SALAMA, 2018). Por exemplo, as bactérias Gram-negativas podem potencialmente isolar grupos enzimáticos danosos a elas, impedindo que penetrem na membrana interna (BEACHAM, 1979). Além disso, as proteínas presentes nesse espaço auxiliam na biogênese do envelope celular e no transporte de carboidratos e outras moléculas orgânicas (BEACHAM, 1979; MILLER; SALAMA, 2018). Portanto, o periplasmo desempenha um papel crucial ao incorporar e manter essas funções, tornando-se uma parte fundamental do envelope celular.

Finalmente, a membrana externa (ME) é composta por uma bicamada lipídica, semelhante a outras membranas biológicas. No entanto, apenas a porção interna da ME contém os chamados fosfolipídios, enquanto a porção mais externa é predominantemente constituída de glicolipídios, como os lipopolissacarídeos (LPS) (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). Os LPS são moléculas químicas que têm como base dissacarídeos glicosamínicos compostos por seis ou sete grupos acil, conhecidos como lipídio A (LA). Essa estrutura forma a base da camada externa da ME, integrando-se a um núcleo de polissacarídeo que contém uma extensa cadeia polissacarídica chamada de antígeno-O. Assim, a combinação desses elementos constitui o LPS (LI et al., 2015), que desempenha um papel essencial na ME como uma barreira funcional. Essa

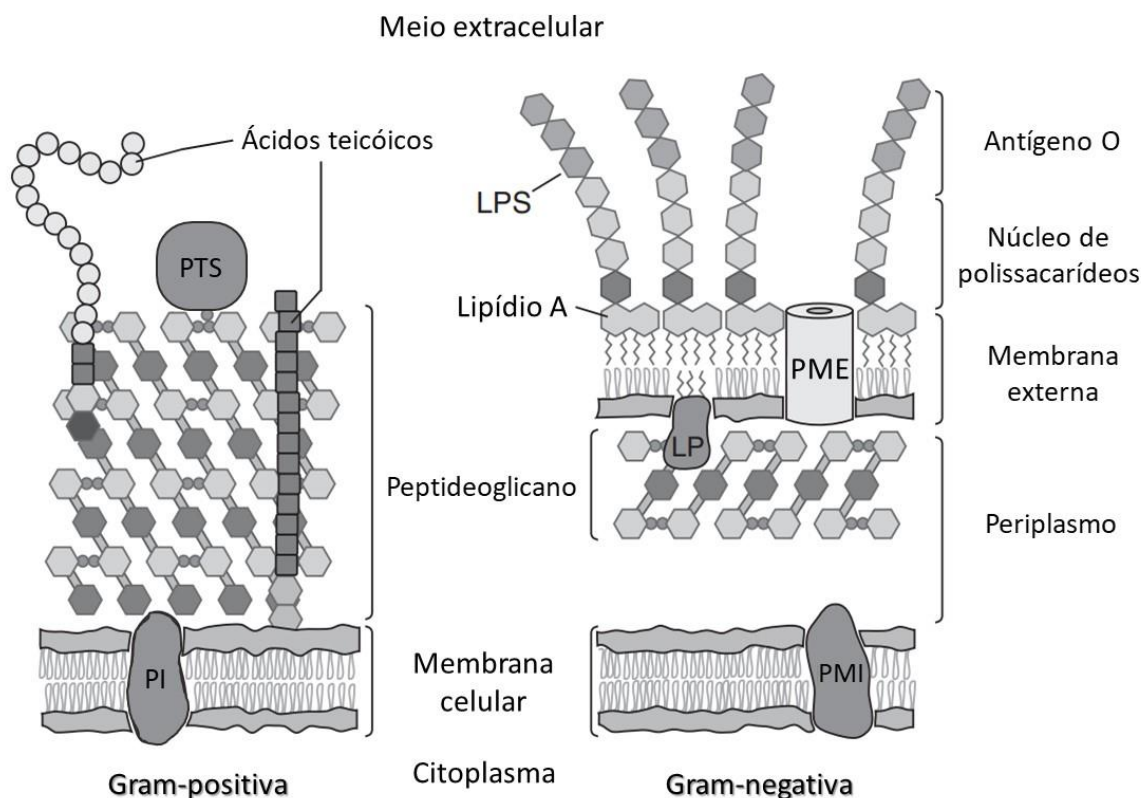
função é resultado da capacidade dos LPS de se associarem facilmente entre si, especialmente na presença de cátions que neutralizam as cargas negativas dos grupos de fosfato presentes nas moléculas (SNYDER; MCINTOSH, 2000). Além disso, suas cadeias alifáticas saturadas possibilitam um empacotamento mais eficiente. Todas essas características da camada de LPS indicam sua eficácia em impedir a passagem de moléculas, incluindo aquelas de natureza hidrofóbica (SNYDER; MCINTOSH, 2000). Além disso, o caráter químico do antígeno-O confere propriedades interessantes, tornando o LPS uma endotoxina e associando-o a casos de septicemia causada por bactérias Gram-negativas (JOHNSON; GAINES; LANDY, 1956; ZHANG; MEREDITH; KAHNE, 2013). Por exemplo, o sistema imunológico humano, quando sensibilizado por essa molécula, consegue facilmente identificar a presença de uma infecção bacteriana (THORN, 2001). A Figura 4 traz detalhes a respeito da composição estrutural de um LPS.



**Figura 4.** Estrutura molecular de um lipopolissacarídeo (LPS), onde a porção mais basal é onde se encontra o lipídio A (LA), enquanto a sua porção exterior possui o antígeno-O. Sua estrutura contém diversos açúcares diferentes, sendo eles: ácido cetodesoxioctônico (KDO), heptose (HEP), glicose (GLU), galactose (GAL), n-acetilglucosamina (GLUNAC), ramnose (RHA), manose (MAN) e abequose (ABE) (LI et al., 2015; MARTORANA et al., 2014). Algumas variações a respeito da quantidade e posições dos açúcares, assim como a repetição de unidades podem ser encontradas.

Não apenas os LPS, mas também uma variedade de proteínas podem ser encontradas ao longo da ME, incluindo lipoproteínas e proteínas de conformação  $\beta$ -barril (SCHULZ, 2002). Como mencionado anteriormente, as lipoproteínas são caracterizadas por lipídios ligados aos seus terminais aminos e são frequentemente encontradas na porção interna da ME. Existem muitas lipoproteínas com funções diversas, algumas das quais ainda não foram completamente compreendidas, e, frequentemente, não são classificadas como proteínas transmembranares (GRABOWICZ, 2019; HAYASHI; WU, 1990). Por outro lado, as proteínas  $\beta$ -barril são maiores, geralmente com uma forma cilíndrica que lhes permite atravessar ambas as camadas da ME (SCHULZ, 2002), como as porinas (SCHIRMER, 1998). Essas proteínas desempenham um papel fundamental no transporte de moléculas, incluindo a difusão passiva de pequenas moléculas orgânicas e açúcares. Além disso, elas atuam limitando a passagem de moléculas hidrofílicas com pesos de até 700 Daltons, conferindo-lhes uma importante função de regulação no processo de transporte (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010).

Outras estruturas de transporte e transposição estão presentes em todo o envelope celular, desempenhando funções cruciais nas bactérias. Entre elas, estão as estruturas flagelares que garantem a motilidade bacteriana (SUBRAMANIAN; KEARNS, 2019) e sistemas de secreção que auxiliam na liberação de toxinas durante infecções em células hospedeiras (GREEN; MECSAS, 2016; MIDDLEBROOK; DORLAND, 1984). Além disso, bombas de efluxo, máquinas moleculares compostas por componentes proteicos, desempenham um papel vital ao bombear moléculas tóxicas para fora da bactéria em direção ao meio extracelular (SUN; DENG; YAN, 2014). A combinação de todos esses componentes e estruturas químicas apresenta a complexidade do envelope celular e como ele desempenha diversas funções essenciais para o metabolismo e a sobrevivência das bactérias. Para uma representação visual, uma ilustração esquemática do envelope bacteriano, seja de uma Gram-positiva ou Gram-negativa, é apresentada na Figura 5.



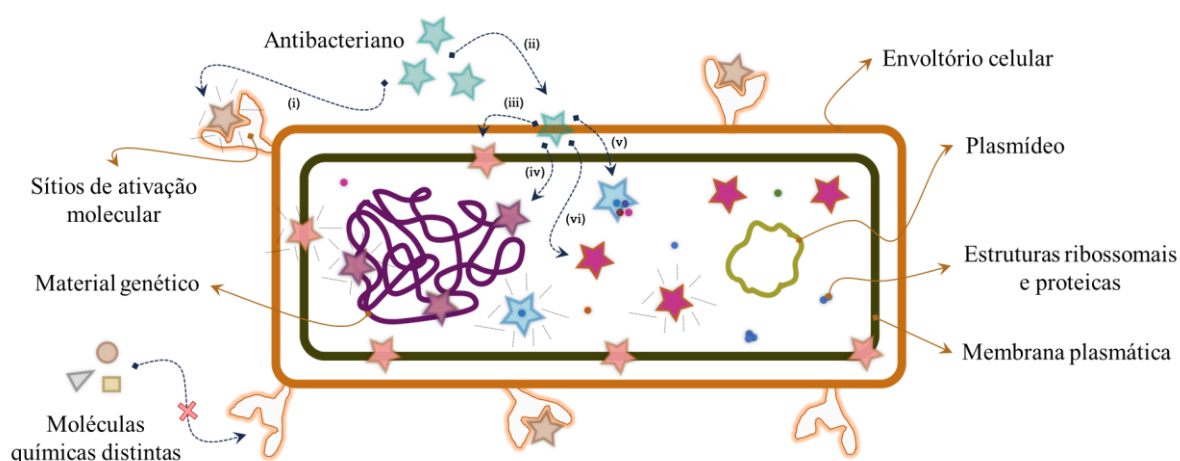
**Figura 5.** Representação esquemática do envelope celular. Do lado esquerdo têm-se a estrutura de uma Gram-positiva, enquanto do lado direito da Gram-negativa. Descrição das estruturas abreviadas: PI, proteína integral; PTS, proteína superficial ligada de forma covalente; PMI, proteína da membrana interna; PME, proteína da membrana externa; LP, lipoproteína; LPS, lipopolissacarídeos. Adaptado de: (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010).

## 1.2 Super-resistência bacteriana

As patologias bacterianas sempre estiveram entrelaçadas com a sociedade humana, propagando doenças entre pessoas (MANOS, 2022), alimentos (ABEBE; GUGSA; AHMED, 2020), plantas (SUNDIN et al., 2016) e outros seres vivos (RAHMAN et al., 2020). No entanto, foi apenas por volta do século XIX que esses microrganismos foram descobertos e associados a doenças, marcando o início da luta contra os diversos efeitos adversos que eles causavam (SAKAI; MORIMOTO, 2022). Com o avanço da tecnologia, a ciência médica deu um salto significativo em torno de 1928, graças à contribuição de Alexander Fleming, que por acaso descobriu uma substância química com propriedades notáveis que inibia o crescimento de uma

determinada cepa bacteriana (BADGER-EMEKA, [s.d.]). Essa molécula, conhecida como penicilina (ou *penicillin* em inglês), continua sendo reconhecida como o primeiro antibiótico, cuja produção em larga escala ajudou a combater uma variedade de doenças bacterianas ao longo dos anos (BADGER-EMEKA, [s.d.]).

Os antibióticos geralmente se enquadram em cinco grandes grupos de ação, todos eles envolvendo intervenções em processos enzimáticos. As estruturas-alvo comuns incluem a biossíntese de peptidoglicanos, ácidos nucleicos e proteínas. Além disso, esses fármacos podem inibir ou modificar o metabolismo bacteriano e desorganizar a membrana celular (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016). Como resultado, essas moléculas abrangem uma variedade de classes químicas e propriedades físico-mecânicas, o que lhes permite agir de maneiras distintas e direcionadas para atingir funções vitais em microrganismos sem prejudicar o hospedeiro (BADGER-EMEKA, [s.d.]). O principal objetivo é inibir o crescimento ou mesmo eliminar as bactérias de forma seletiva, interrompendo processos essenciais para sua sobrevivência. A Figura 6 mostra um esquema das principais rotas utilizadas pelos antibióticos.



**Figura 6.** Mecanismos de ação comuns aos antibióticos. Alguns dos exemplos indicados são: (i) ligação a sítios moleculares específicos, presentes no envoltório celular; (ii) permeação do antibacteriano ao envelope celular; (iii) interação seletiva com a membrana celular, (iv) o material genético e (v) estruturas proteicas, (vi) além de outras formas de inibição no meio citoplasmático.

À medida que as duas décadas seguintes avançavam, vários antibióticos foram desenvolvidos e descobertos, revolucionando o tratamento de inúmeras doenças bacterianas que antes eram consideradas devastadoras e muitas vezes fatais (SAKAI; MORIMOTO, 2022). As infecções bacterianas, que antes representavam uma ameaça global, pareciam estar sob controle, sugerindo que a erradicação de microrganismos patogênicos era apenas uma questão de tempo. No entanto, durante o desenvolvimento dos antibióticos, cepas bacterianas que anteriormente eram suscetíveis a esses medicamentos começaram a mostrar resistência em poucos anos. Isso gerou perplexidade na comunidade científica da época. Por exemplo, a meticilina, um antibiótico desenvolvido na década de 1960 como uma alternativa para tratar bactérias resistentes à penicilina, foi introduzida no mercado (ANDRADE et al., 2020; LAKHUNDI; ZHANG, 2018). No entanto, algumas bactérias desenvolveram a capacidade de produzir enzimas conhecidas como penicilinasas, que degradavam o fármaco antes que ele pudesse exercer seu efeito. Em 1961, surgiram relatos de uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, e até o final da década, essa cepa havia se disseminado globalmente (ANDRADE et al., 2020; LAKHUNDI; ZHANG, 2018). Essa resistência crescente representou um grande desafio no tratamento de diversas infecções bacterianas.

Iniciou-se, assim, uma corrida contra o tempo, com estratégias cada vez mais audaciosas sendo concebidas e desenvolvidas, ao mesmo tempo em que as bactérias evoluíam e se adaptavam, muitas vezes superando os esforços da medicina. Esse período marcou o fim da era de ouro dos antibióticos, onde infecções podiam ser resolvidas rapidamente, e o início do fenômeno da super-resistência bacteriana, que se espalhava de forma exponencial. Nas últimas duas décadas, essa mudança drástica influenciou profundamente as políticas em todo o mundo, abrangendo áreas de saúde, economia e alimentação (JASOVSKÝ et al., 2016; SULIS; SAYOOD; GANDRA, 2022). Doenças que antes eram facilmente tratadas podem agora se tornar fatais e se espalhar rapidamente, causando inúmeros impactos na vida cotidiana. A

Organização Mundial da Saúde (OMS), está monitorando o fenômeno da super-resistência, fornecendo orientações e soluções alternativas para combatê-lo e informando e educando o público sobre seus riscos e desafios (COLLIGNON et al., 2016). A OMS também adverte que, se não forem adotadas medidas eficazes para enfrentar esse problema, a partir de 2050, poderemos enfrentar 10 milhões de mortes anuais em todo o mundo devido a infecções resistentes a antibióticos (ABAT et al., 2018). Neste cenário complexo, torna-se imperativo entender como as bactérias conseguiram desenvolver esses mecanismos de resistência, a fim de buscar soluções eficazes para esse desafio de saúde global.

Diversos fatores impulsionaram o fenômeno da super-resistência, e alguns desses motivos estão detalhados a seguir. O uso indiscriminado de antibióticos nos setores de alimentos, agricultura e saúde, juntamente com a falta de políticas públicas reguladoras na comercialização desses agentes químicos (DUGASSA; SHUKURI, 2017; PULINGAM et al., 2022), contribuíram para a superexposição dos microrganismos aos antibióticos. Isso é de extrema importância porque, embora um antibiótico seja desenvolvido para combater uma bactéria específica, a alta taxa de replicação desses microrganismos permite que surjam novas gerações em grande quantidade em um curto período (ALLEN; WACLAW, 2017). Isso aumenta a probabilidade de que uma dessas gerações subsequentes possa apresentar alguma alteração molecular, seja intencional ou não, que a torne resistente ao antibiótico (ALLEN; WACLAW, 2017). Assim, todas as outras bactérias que não adquiriram essa mudança molecular morrem devido à ação do antibacteriano, deixando vivas apenas as bactérias que desenvolveram a propriedade de resistência. Quando o tratamento é repetido posteriormente para a mesma infecção, já houve tempo suficiente para que a nova cepa resistente se reproduza, tornando ineficaz o tratamento que anteriormente funcionava contra a cepa original.

Nesse contexto, a literatura já descreve uma variedade de mecanismos de resistência (C REYGAERT, 2018), embora as bactérias já possuam em sua estrutura diversos sistemas

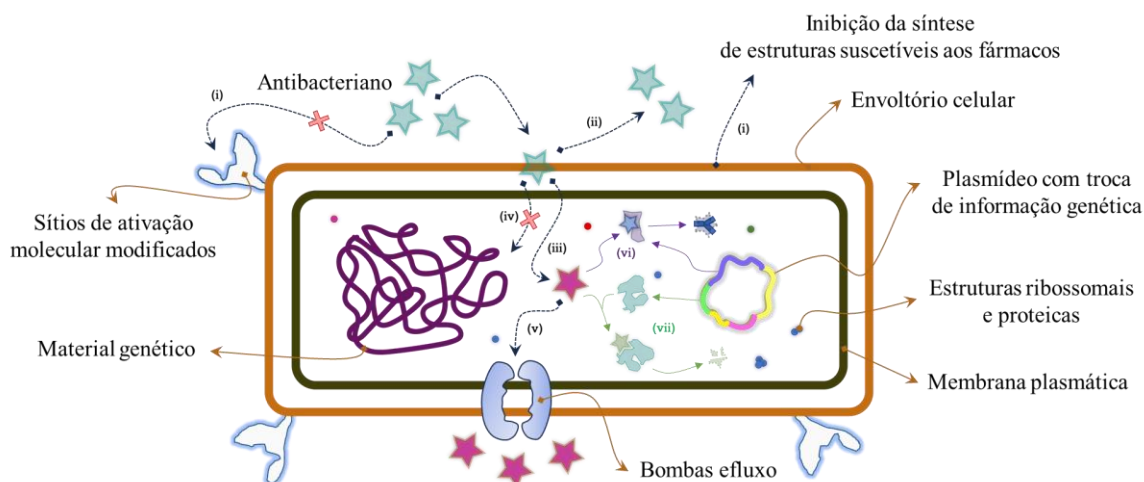
moleculares intrínsecos de autodefesa. Por exemplo, alguns microrganismos podem simplesmente não apresentar sítios ativos para as drogas (DUGASSA; SHUKURI, 2017), tornando-as ineficazes, ou podem apresentarem baixa permeabilidade em suas membranas devido à natureza química de seus componentes (NIKAIDO, 1994), o que impede a entrada dos fármacos. Além disso, a resistência adquirida não se limita a mudanças moleculares espontâneas, pois também pode ser transferida entre bactérias, graças ao compartilhamento físico de pequenos fragmentos genéticos entre populações microbianas semelhantes (JOHN DAVISON, 1999).

Quanto aos aspectos bioquímicos da resistência antimicrobiana, podemos mencionar vários mecanismos, incluindo a inativação de antibióticos, a redução da permeabilidade, a modificação de sítios ativos e a ativação de bombas de efluxo. A inativação antibiótica envolve um processo enzimático em que a bactéria produz enzimas que se ligam e capturam o antibiótico após sua internalização, desativando-o por meio de reações hidrolíticas, transferência de grupos químicos ou indução de processos oxidativos (NEU, 1984). No que diz respeito à modificação da permeabilidade nas membranas, muitos antibióticos dependem da entrada nas bactérias, uma vez que seus alvos são frequentemente estruturas intracelulares (TULKENS, 1991). Portanto, as bactérias evoluíram para limitar e bloquear a passagem desses fármacos, reduzindo sua permeabilidade. Para isso, moléculas hidrofílicas precisam de canais proteicos para serem transportadas, geralmente fornecidos por proteínas chamadas porinas localizadas nas membranas bacterianas (PRAJAPATI; KLEINEKATHÖFER; WINTERHALTER, 2021). No entanto, as bactérias podem reduzir a expressão e produção dessas proteínas para diminuir o fluxo de transporte de fármacos. Além disso, ocorrem alterações moleculares nas proteínas de transporte, restringindo ainda mais o transporte de moléculas com diferentes tamanhos e características químicas (PULINGAM et al., 2022).



Por outro lado, os antibióticos também podem ser ativados por meio de interações com alvos moleculares específicos, projetados para atingir estruturas particulares (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016). A bactéria pode realizar alterações sutis não no antibiótico em si, mas na estrutura molecular à qual ele se destina, impedindo o contato e a ativação do fármaco (NEU, 1984). Além disso, as bombas de efluxo têm ganhado destaque significativo, pois são proteínas encontradas nas membranas bacterianas que desempenham o papel de transportar nutrientes e podem, ao mesmo tempo, expelir componentes tóxicos do interior da célula (WEBBER; PIDDOCK, 2003). Esse mecanismo desempenha um papel fundamental na resistência a muitos antibióticos, pois essas proteínas podem ser específicas para um único antibiótico ou para vários fármacos simultaneamente, resultando no que é conhecido como bactérias multirresistentes (BASSETTI; RIGHI, 2013), ou MDR (do inglês, *Multidrug-Resistant*).

Além dos fatores bioquímicos, os mecanismos da super-resistência bacteriana podem estar associados a aspectos genéticos e mutações no DNA desses microrganismos. Essas mutações podem resultar tanto na ativação de genes que conferem propriedades de resistência, levando à formação de estruturas e mecanismos moleculares, como na transferência de material genético entre bactérias, compartilhando informações que levam à resistência (KHAMENEH et al., 2016). Portanto, é importante destacar que diversos genes estão envolvidos nesse fenômeno, uma vez que existem múltiplos alvos e vias celulares em que um antibiótico pode atuar, desencadeando a expressão genética bacteriana e a subsequente resistência ao fármaco. A Figura 7 indica alguns dos mecanismos de resistência citados de forma esquemática.



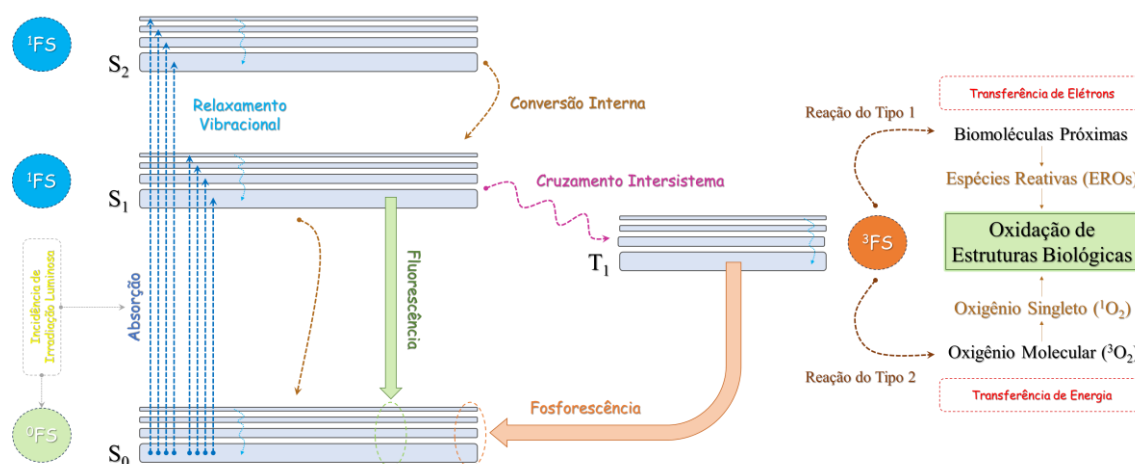
**Figura 7.** Mecanismos de resistência comuns às bactérias. (i) Modificações nos sítios alvos presentes na superfície do envoltório bacteriano, não permitem o contato com antibióticos, os quais não desencadeiam o seu tratamento. (ii) Mudanças no envoltório dificultam a permeação dos fármacos, (iii) enquanto poucos conseguem adentrar no meio intracelular. (iv) No meio citoplasmático, mudanças nas estruturas celulares alvos podem invalidar a ligação junto ao antibiótico. Por outro lado, (v) bombas de efluxo ajudam no transporte dos agentes indesejados pela bactéria para o meio extracelular. Ainda, mecanismos enzimáticos e mudanças genéticas auxiliam tanto na (vi) inibição quanto na (vii) destruição dos agentes antibacterianos.

Portanto, esforços globais estão em andamento na busca por novos agentes terapêuticos com maior eficácia e segurança no tratamento (KHAMENEH et al., 2016). No entanto, a produção de novos antibióticos tem se defasado, uma vez que resistências são relatadas na comunidade pouco tempo após o lançamento desses compostos (JONES; PFALLER, 1998). Assim, estratégias como modificações químicas nas estruturas das moléculas, combinação de terapias e o uso de moléculas complementares (PULINGAM et al., 2022) têm sido empregadas para combater a resistência bacteriana. Outros ainda, se destacam desde o início do século XX, onde estratégias envolvendo fármacos integrados com peptídeos antimicrobianos têm buscado melhores incorporações e eficácias quanto ao tratamento bacteriano (JOO; FU; OTTO, 2016). Os avanços tecnológicos têm permitido melhorias nos métodos químicos e biológicos, proporcionando vantagens no combate antimicrobiano. Por exemplo, o estudo de tratamentos quimioterápicos e fototerápicos (ANAS et al., 2021; SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN,

2013) tem sido incentivado, uma vez que essas abordagens não dependem da internalização nas estruturas celulares bacterianas. Outras estratégias incluem o uso responsável de antibióticos, aplicação seletiva em setores específicos (saúde, agricultura, alimentos), a prevenção da disseminação de bactérias entre animais e seres humanos, e a redução da exposição excessiva a esses fármacos (SEAL et al., 2013). Por fim, a conscientização da população desempenha um papel fundamental para combater o fenômeno da super-resistência. O cenário apresentado aqui ilustra sucintamente a situação em que nos encontramos no século XXI, à medida que buscamos alternativas aos antibióticos tradicionais para mitigar a ameaça da super-resistência.

### 1.3 Inativação fotodinâmica de microrganismos (IFDM)

A IFDM é uma fototerapia que se destaca como um dos tratamentos alternativos eficazes no combate à super-resistência bacteriana (DE MELO; PERUSSI, 2012; PERUSSI, 2007). A IFDM é baseada na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) a partir de moléculas orgânicas, conhecidas como fotossensibilizadores (FSs), que são ativadas por meio de irradiação luminosa (ESTALAYO-ADRIÁN et al., 2020; KIM; LEE; NA, 2016; KNOLL; TURRO, 2015; TIAN et al., 2015). A oxidação é o resultado mais provável da interação das EROs com o alvo celular, que pode ser uma estrutura intracelular ou o envelope bacteriano. Na Figura 8, o diagrama de Jablonsk ilustra os diferentes níveis eletrônicos que um FS atinge à medida que transita entre os seus estados ativados e inativos.



**Figura 8.** Diagrama de Jablonski, indicando as transições radiativas (fluorescência e fosforescência) e não radiativas (conversões internas, cruzamentos intersistema e relaxação vibracional) em diferentes camadas energéticas, com cada uma delas contendo 4 níveis vibracionais. O estado fundamental é denominado S<sub>0</sub>, onde a molécula se encontra em seu estado neutro e não ativado. Enquanto isso, o estado singleto é determinado por S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>. O estado tripleto excitado é indicado na porção da direita por T<sub>1</sub>. Em T<sub>1</sub> a molécula pode desencadear reações fotoquímicas, como as reações do tipo 1 e tipo 2.

Um FS, quando absorve a energia da luz incidente, passa do seu estado fundamental (S<sub>0</sub>) para os estados excitados singleto (S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>) e tripleto (T<sub>1</sub>). Posteriormente, ao retornar desses estados excitados, emite radiação na forma de luz, que pode se manifestar tanto como fluorescência quanto fosforescência (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009). A fluorescência se refere à transição do estado S<sub>1</sub> para o estado S<sub>0</sub>. No estado S<sub>1</sub>, os elétrons estão pareados, com spins opostos àqueles localizados em S<sub>0</sub>, permitindo uma rápida relaxação de volta ao estado S<sub>0</sub>. Esse fenômeno ocorre em uma proporção entre 10<sup>8</sup> a 10<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>, durante o período de exposição à irradiação. Por outro lado, o processo de fosforescência é desencadeado de forma mais lenta, chegando a taxa de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>0</sup> s<sup>-1</sup>, sendo ocasionado após a exposição luminosa. Nesse processo, os elétrons passam por um cruzamento entre sistemas de energia de maneira não radiativa. Isso ocorre a partir do estado S<sub>1</sub> em direção ao estado T<sub>1</sub>. Durante esse processo, a multiplicidade de spin eletrônico é invertida, tornando impossível um retorno

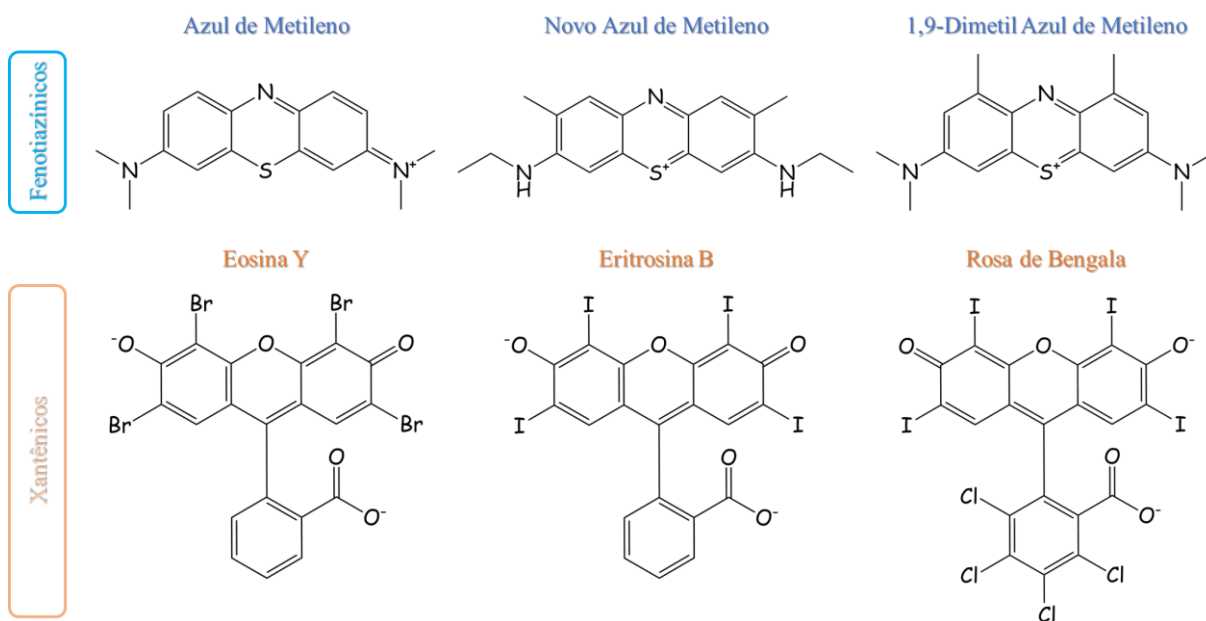
imediatamente ao estado fundamental  $S_0$ . Como resultado, o processo radiativo é mais lento do que a fluorescência (ITOH, 2012).

Assim como o relaxamento vibracional pode ocorrer em  $T_1$ , a liberação de energia nesse estado pode desencadear reações químicas em conjunto com o oxigênio molecular presente no ambiente, se este estiver próximo o suficiente do FS (CORREIA et al., 2021). Existem duas principais reações fotoquímicas, conhecidas como a via de transferência de elétrons, geralmente denominada reação do tipo I, e a via de transferência de energia, a reação do tipo II (REZENDE et al., 2022). Na primeira, ocorre a transferência de elétrons do FS para as biomoléculas presentes no ambiente, gerando radicais livres que interagem com o oxigênio molecular em seu estado fundamental ( $^3O_2$ ), dando origem às EROs. Por outro lado, na reação do tipo II, há uma transferência direta de energia para o oxigênio molecular ( $^3O_2$ ), resultando na formação de espécies de oxigênio singleto ( $^1O_2$ ). Independentemente da via utilizada, o contato dessas espécies com estruturas celulares resulta na oxidação e degradação destas, sem a necessidade de uma interação ou internalização dos FSs (BACELLAR et al., 2018).

As membranas celulares, por serem a primeira linha de defesa de uma célula, tornam-se um dos principais alvos para a implementação da IFDM (AWAD et al., 2016). Portanto, o posicionamento do FS e sua interação com o envelope celular desempenham um papel central nos processos foto-oxidativos, podendo modular o resultado fotoquímico. Assim, surgiu a necessidade de buscar FSs capazes de interagir eficazmente com as membranas lipídicas (KLAUSEN; UCUNCU; BRADLEY, 2020). Nesse contexto, dois grupos de FSs, os derivados fenotiazínicos (FEKRAZAD; ZARE; VAND, 2016; LIANG et al., 2017) e xantênicos (KILLIG; KUNZ; STARK, 2001; VALENZENO, 1984; VALENZENO; POOLER, 1982; VALENZENO; TARR, 1991), se destacaram de maneiras distintas em diversas aplicações. Enquanto o primeiro grupo demonstrou maior eficiência na incorporação em membranas lipídicas, o segundo se destacou por priorizar a produção de  $^1O_2$ , tornando-se uma alternativa

promissora para a terapia fotodinâmica, especialmente no combate a bactérias super-resistentes.

A Figura 9 indica alguns dos FSs implementados das famílias químicas xantênica e fenotiazínica.



**Figura 9.** Estruturas moleculares de diferentes fotossensibilizadores (FSs) da família dos fenotiazínicos (porção superior) e dos xantênicos (porção inferior), relatados na literatura como agentes em fototerapia.

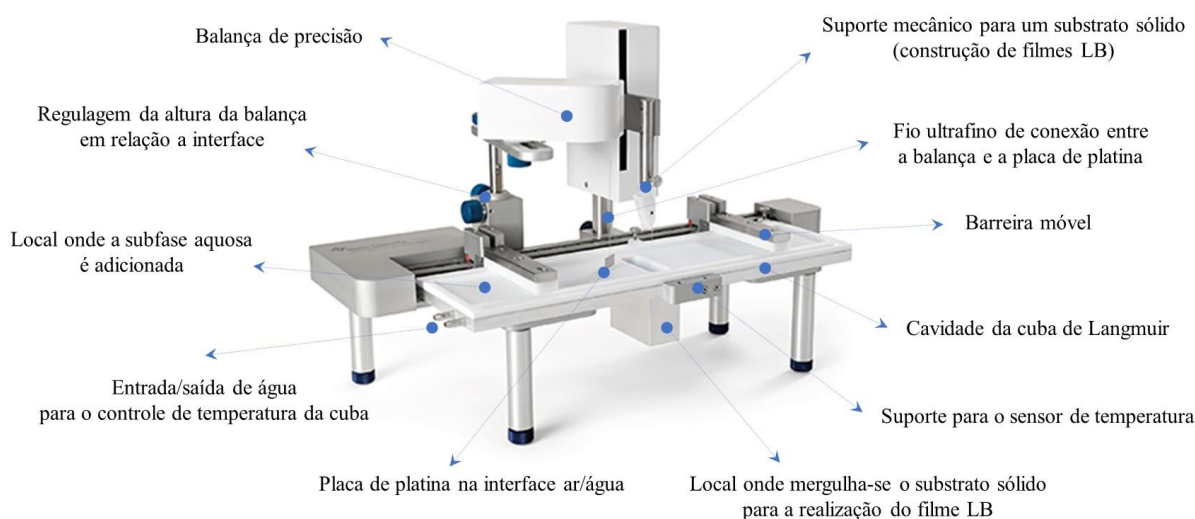
#### 1.4 Filmes de Langmuir como plataformas miméticas para membranas celulares

Para abordar as interações moleculares e mapear as rotas fotoquímicas desencadeadas na IFDM, explorar os FSs diretamente em seres vivos e microrganismos é um desafio complexo. Portanto, os modelos biológicos desempenham um papel fundamental na capacidade de modular a complexidade desejada, mimetizando estruturas específicas. Nesse contexto, os filmes de Langmuir, Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS) emergem como estratégias poderosas para criar sistemas miméticos (OLIVEIRA; CASELI; ARIGA, 2022), como as membranas celulares, com controle em nível molecular (ARIGA, 2020). Essas técnicas permitem a seleção dos componentes que irão compor essas membranas de forma personalizada. Os filmes monomoleculares de Langmuir são considerados uma abordagem

nanoarquitetônica, confinando sistemas dentro de um plano bidimensional para reduzir drasticamente o movimento de translação, no qual as interações moleculares podem ser investigadas (ARIGA; MORI; LI, 2019). Por outro lado, os filmes LB e LS são técnicas complementares para construir sistemas bidimensionais em substratos sólidos, tais como: estruturas supramoleculares compostas de nanopartículas orgânicas e inorgânicas, assim como complexos biomateriais envolvendo lipídios, DNA e enzimas (ARIGA, 2020; YUNOKI; KIMURA; FUJIMORI, 2019). Em conjunto, essas ferramentas provaram ser úteis para determinar os mecanismos de ação de muitos materiais biologicamente relevantes (ARIGA, 2020; ARIGA; MORI; LI, 2019; OLIVEIRA; CASELI; ARIGA, 2022).

A técnica de Langmuir oferece um amplo espectro de caracterizações para a estrutura mimetizada. Para realizá-la, o material destinado a formar o filme de Langmuir em uma subfase aquosa deve possuir características anfifílicas (OLIVEIRA; CASELI; ARIGA, 2022). Inicialmente, a molécula de interesse é preparada em um solvente volátil para sua transferência física para a interface ar/água, onde ela se dispõe de maneira aleatória, sem a formação de estruturas coloidais, como micelas e vesículas. Conforme o solvente volátil evapora, as porções polares do material estabelecem interações eletrostáticas com a água interfacial. Enquanto isso, a porção hidrofóbica cria repulsões eletrostáticas com a mesma interface, possibilitando a ordenação alifática e o emparelhamento adequado (OLIVEIRA; CASELI; ARIGA, 2022). Com isso, uma das principais análises realizadas nos filmes de Langmuir são as isotermas de pressão de superfície, que permitem a extração de medidas termodinâmicas da interface superficial. Isso é alcançado pela avaliação da pressão resultante da tensão superficial e da área ocupada pelo material na interface (MARTÍNEZ-BALBUENA et al., 2017). Nesse contexto, a tensão superficial é tipicamente determinada usando a metodologia de Wilhelmy, em que uma placa de material inerte é posicionada sobre a interface ar/água e conectada a uma balança de alta precisão (VOLPE; SIBONI, 2018). A pressão superficial ( $\pi$ ) é resultante das interações entre

as moléculas da subfase e as moléculas interfaciais devido às diferenças em suas energias de Gibbs, sendo registrada pelo sensor por meio das forças presentes (MAFÉ; MANZANARES; KONTTURI, 1998).

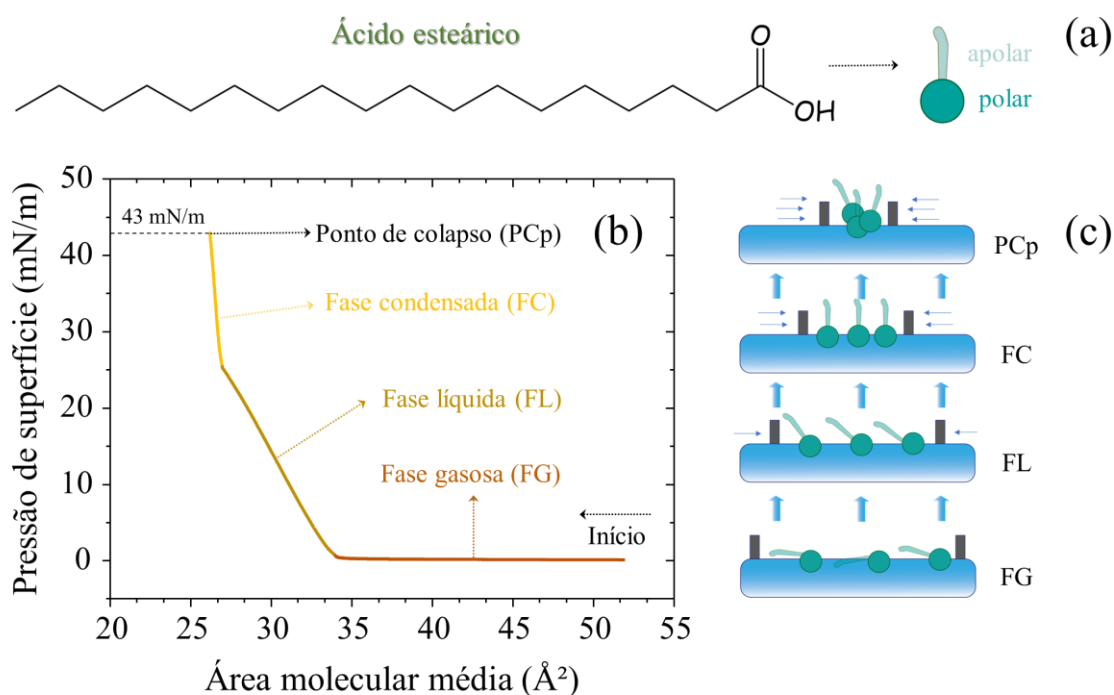


**Figura 10.** Detalhes da cuba de Langmuir, equipamento que permite a construção dos filmes de Langmuir, Langmuir-Schaefer (LS) e Langmuir-Blodgett (LB).

Os filmes de Langmuir são construídos num equipamento usualmente denominado cuba de Langmuir (Figura 10), o qual é feito de material inerte (OLIVEIRA; CASELI; ARIGA, 2022). A cuba possui uma cavidade onde se recebe uma solução aquosa, permitindo a formação de um menisco e oferecendo uma plataforma para a deposição do material anfifílico em sua superfície. Nas extremidades da cuba, encontram-se barreiras móveis e mecânicas, que podem ser controladas via software. A compressão ou expansão controlada dessas barreiras é fundamental para organizar o material na interface e, assim, construir as isotermas de pressão e área ( $\pi$ -A). Durante esse processo, a tensão superficial varia à medida que as barreiras se movem constantemente, juntamente com a área ocupada pelo material na interface, que diminui durante a compressão e aumenta durante a expansão. Esse movimento resulta em interações entre as moléculas interfaciais, que podem ser associadas com os diferentes estados da matéria no



espaço tridimensional (OLIVEIRA; CASELI; ARIGA, 2022). Filmes com poucas interações e que ocupam grandes áreas são comparáveis ao estado gasoso, enquanto a compressão leva a estados mais condensados, semelhantes ao estado líquido e sólido. Essas informações permitem a compreensão do comportamento do material de interesse e como ele se organiza em diferentes condições. Portanto, os fosfolipídios de membrana são de grande interesse, pois é possível organizá-los para mimetizar a estrutura celular (OLIVEIRA; CASELI; ARIGA, 2022). A Figura 11 apresenta, de maneira esquemática, as principais transformações de estado que ocorrem durante o processo da fabricação de filmes de Langmuir a partir de um material anfifílico simples, o ácido esteárico.

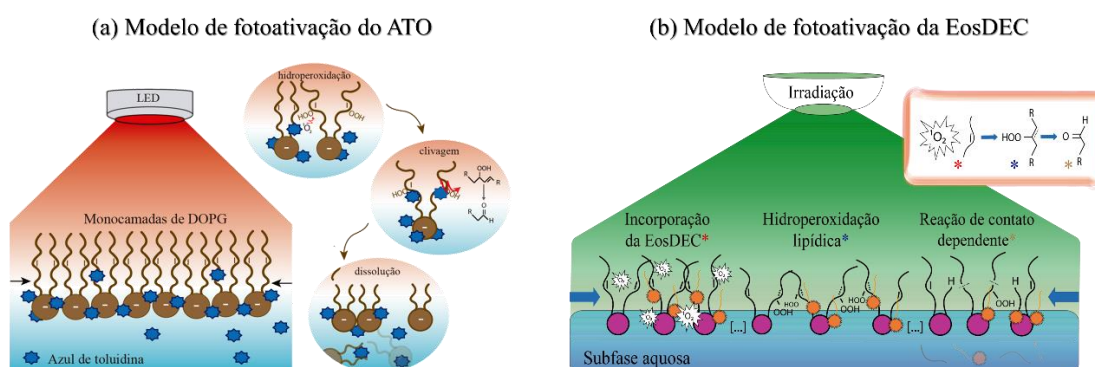


**Figura 11.** (a) Estrutura da molécula anfifílica ácido esteárico, o qual contém uma cadeia alifática de 17 carbonos, e uma porção polar referente ao grupo carboxílico. (b) Isoterma  $\pi$ -A do ácido esteárico com suas etapas de organização molecular na forma de filme monomolecular. O ponto de colapso da membrana (PCp) é indicado em aproximadamente 43 mN/m, onde há perda do controle organizacional do material. (c) Ilustrações esquemáticas das fases referentes aos níveis de organização molecular, saindo de uma fase gasosa e expandida (FG), sendo então comprimidas, atingindo as fases líquida (FL) e sólida/condensada (FC) em maiores pressões superficiais. Fonte: do autor.

Existem diversas outras técnicas de caracterização que podem ser aplicadas aos filmes de Langmuir, permitindo uma avaliação abrangente de suas propriedades. A avaliação da morfologia e topologia dos filmes construídos pode ser realizada por meio de técnicas de microscopia, como a microscopia de ângulo de Brewster (BAM) (VOLLHARDT, 2014) e a microscopia de fluorescência (STOTTRUP; NGUYEN; TÜZEL, 2010), por exemplo. Além disso, as propriedades ópticas das monocamadas podem ser investigadas usando elipsometria (BAIN, 1998; MAESTRO; GUTFREUND, 2021), espectroscopia de fluorescência (LI; LI; AROCA, 2017) e espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-Vis) (RUBIA-PAYÁ et al., 2015). A estrutura de monocamadas desconhecidas pode ser determinada por difração de raios X (BASU; SANYAL, 2002), enquanto medidas reológicas podem fornecer informações sobre as propriedades mecânicas (KARBASCHI et al., 2014; LANGEVIN, 2014). As interações moleculares presentes nos filmes de Langmuir podem ser identificadas e documentadas por meio de técnicas de espectroscopia vibracional, sendo comumente empregada a espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS) (LEBLANC, 2006; VOLPATI et al., 2014). Além disso, na literatura, já foram relatados estudos que utilizam filmes Langmuir-Schaefer (LS) como plataformas para caracterização, já que estes se tratam da deposição de multicamadas organizadas provenientes de Filmes de Langmuir, empregando a espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (ALMEIDA et al., 2023; KOBAL et al., 2023).

De fato, usando modelos simplificados de membranas bacterianas baseados em filmes de Langmuir, mostramos recentemente que as interações em nível molecular com o FS azul de toluidina-O (ATO) (ALMEIDA; OLIVEIRA; AOKI, 2019) hidrofílico e o FS eosina decil éster (EosDEC) (MOREIRA et al., 2020) hidrofóbico podem desencadear um resultado fotoquímico sob iluminação. A clivagem da cadeia lipídica por reações dependentes de contato foi confirmada em monocamadas fosfolipídicas contendo EosDEC, que se inseriram

eficientemente nas cadeias carbônicas devido à sua natureza hidrofóbica. Enquanto isso, o ATO hidrofílico foi conduzido para as monocamadas via interações eletrostáticas com as cabeças lipídicas zwitteriônicas, favorecendo a hidroperoxidação por reações independentes de contato. A clivagem da cadeia somente pôde ser observada em monocamadas com carga líquida negativa, cuja interações eletrostáticas mais forte favoreceram a inserção de moléculas de ATO até as cadeias lipídicas. Apesar das importantes contribuições quanto à correlação entre o sítio de ligação dos FSs e o resultado da foto-oxidação, os experimentos foram realizados em monocamadas de Langmuir simplificadas, baseadas em fosfolipídios insaturados puros e sintéticos. A Figura 12 traz os modelos de fotoativação propostos para as monocamadas de DOPE, DOPG e CL junto aos FSs ATO e EosDEC.



**Figura 12.** Modelos de interação molecular propostos pelo (a) ATO e pela (b) EosDEC quando fotoativados em membranas de bactérias simplificadas. Enquanto o ATO demonstrou reações de clivagem alquílica somente no fosfolipídio DOPG, a EosDEC estabeleceu a mesma clivagem nos lipídios DOPE, DOPG e CL, em maiores intensidades. Adaptado de: (ALMEIDA; OLIVEIRA; AOKI, 2019; MOREIRA et al., 2020).

Nesta dissertação de mestrado, será dado um passo adiante desvendando os mecanismos de incorporação e fotossensibilização induzidos pelo ATO e EosDEC em monocamadas de Langmuir do extrato lipídico de *E. coli*, empregado como um modelo complexo de membranas bacterianas Gram-negativas. As isotermas de pressão superficial ( $\pi$ -A) permitiram a avaliação da incorporação das membranas de ATO e EosDEC e dos efeitos posteriores de fotooxidação. Os locais de ligação em nível molecular foram determinados por FTIR em filmes LS

depositados a partir de monocamadas de Langmuir do extrato lipídico de *E. coli* contendo os FSs. Como demonstraremos, a complexidade do extrato lipídico impacta não apenas nos mecanismos de incorporação do ATO e da EosDEC, mas também nos efeitos de fotooxidação esperados a partir de monocamadas de fosfolipídios puros.

## 2 OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo geral contribuir para as áreas da saúde e nanobiotecnologia, aperfeiçoando as tecnologias empregadas em fototerapias. Os objetivos específicos contemplam as seguintes atividades:

- I. Produção de monocamadas de Langmuir do extrato lipídico da membrana de *E. coli* em subfase aquosa, além da inserção de diferentes concentrações dos FSs azul de toluidina-O e eosina decil éster para a fabricação de filmes mistos;
- II. Identificação dos mecanismos moleculares de interação da membrana lipídica com os FSs, reiterando suas diferenças;
- III. Análise dos efeitos oxidativos produzidos pela fotoativação dos FSs sobre o extrato lipídico da *E. coli*.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Materiais e soluções

O extrato lipídico total da *Escherichia coli* (que é uma combinação de caudas lipídicas de 16, 17 e 18 carbonos, com diferentes proporções polares em sua composição) foi adquirido pela *Avanti Polar Lipids* (ref. 100500P). Seus detalhes são apresentados na Tabela 1. O extrato tem origem da cepa de *E. coli* B (ATCC 11303), o qual contém uma variedade de ácidos graxos em sua membrana, conforme detalhado na literatura (ISHINAGA; KANAMOTO; KITO, 1979; KITO et al., 1971, 1972, 1973, 1975; SHIGEO et al., 1972), além de uma composição de 75% de lipídios saturados e 25% de lipídios insaturados. O clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ , 99,0 ~ 99,4%) e o azul de toluidina-O (ATO,  $\log P = -0,50$ , ~80%) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (ref. 32211 e T3260, respectivamente). O xantênico eosina decil éster (EosDEC,  $\log P = 1,84$ , ~90%) foi sintetizado conforme relatado anteriormente (ESTEVÃO et al., 2014), o qual foi cedido pelo grupo do prof. Wilker Caetano, do departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os materiais foram utilizados como recebidos, sem purificação adicional. Por fim, o sistema Milli-Q (modelo Direct-Q® 3UV) forneceu a água ultrapura (resistividade =  $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ) utilizada como solvente aquoso e como subfase para os filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS).

**Tabela 1.** Composição polar dos lipídios presentes no extrato da *E. coli* (LIPIDS, 2023).

| Componentes                                                                                                          | %      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Fosfolipídio PE                                                                                                      | 57,5%  |
| Fosfolipídio PG                                                                                                      | 15,1 % |
| Fosfolipídio CL                                                                                                      | 9,8%   |
| Parte desconhecida<br>(outras classes de lipídios, lipídios agrupados<br>com proteínas, carboidratos, dentre outros) | 17,6%  |

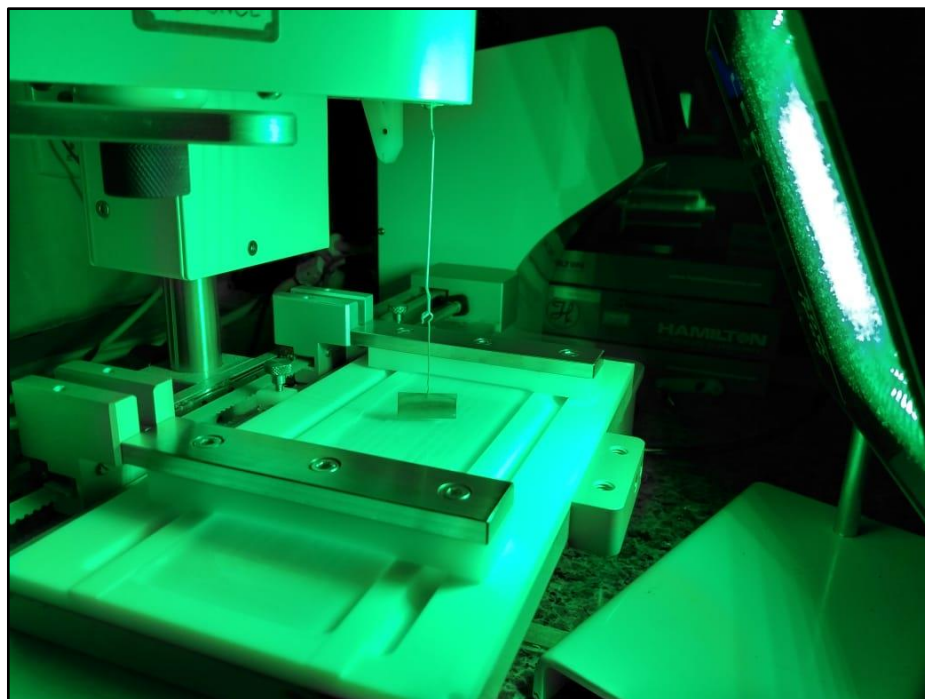
### 3.2 Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS)

O filme de Langmuir do extrato lipídico da *E. coli* foi produzido em uma cuba de Langmuir KSV-NIMA (modelo KN 2002), espalhando cerca de 20  $\mu\text{L}$  da solução de clorofórmio diluída (1,0 mg/mL) sobre a subfase aquosa em temperatura ambiente (23°C). O solvente foi deixado evaporar por 10 min antes da compressão simétrica das barreiras à 5 mm/min, restando apenas as moléculas do extrato na interface. As isotermas de pressão superficial ( $\pi$ ) *versus* área ( $\text{cm}^2/\text{mg}$  de extrato) foram construídas usando o método de Wilhelmy com um sensor de platina (WELZEL; WEIS; SCHWARZ, 1998). A mesma metodologia foi aplicada para fabricar filmes mistos de Langmuir da *E. coli*:EosDEC (proporção volumétrica 10:1 e 5:1) e *E. coli* na subfase com ATO ( $10^{-5}$  mol/L). Para tal fim, as isotermas mistas de EosDEC foram fabricadas espalhando-se primeiramente a solução do extrato da *E. coli*, e logo em seguida a solução de EosDEC em clorofórmio ( $10^{-3}$  mol/L). No caso dos filmes mistos de *E. coli* + ATO, a solução aquosa na cuba de Langmuir foi substituída por uma solução aquosa contendo ATO previamente diluído a uma concentração de  $10^{-5}$  mol/L, sobre a qual a solução do extrato foi espalhada. Ambas as concentrações dos FSs foram escolhidas de forma a serem o mais baixas possível, permitindo a identificação de efeitos de incorporação e foto-oxidação, além de se basearam em outros trabalhos na literatura (ALMEIDA; OLIVEIRA; AOKI, 2019; MOREIRA et al., 2020).

O módulo de compressão superficial ( $C_s^{-1}$ ), ou ainda, elasticidade no plano da monocamada, diz a respeito ao estado do empacotamento da monocamada, onde maiores valores de  $C_s^{-1}$  refletem em monocamadas menos compressíveis e mais sólidas, com o seu oposto verdadeiro. Essa informação foi adquirida a partir da inclinação das isotermas  $\pi$ -A (OLIVEIRA; CASELI; ARIGA, 2022), tal como indicado na equação  $C_s^{-1} = -A(d\pi/dA)$ , onde  $\pi$  é a pressão superficial adquirida, enquanto A é a área ocupada pelo material. Nela, Harkins e Dervichian estabeleceram intervalos de valores para monocamadas anfifílicas, separando as fases

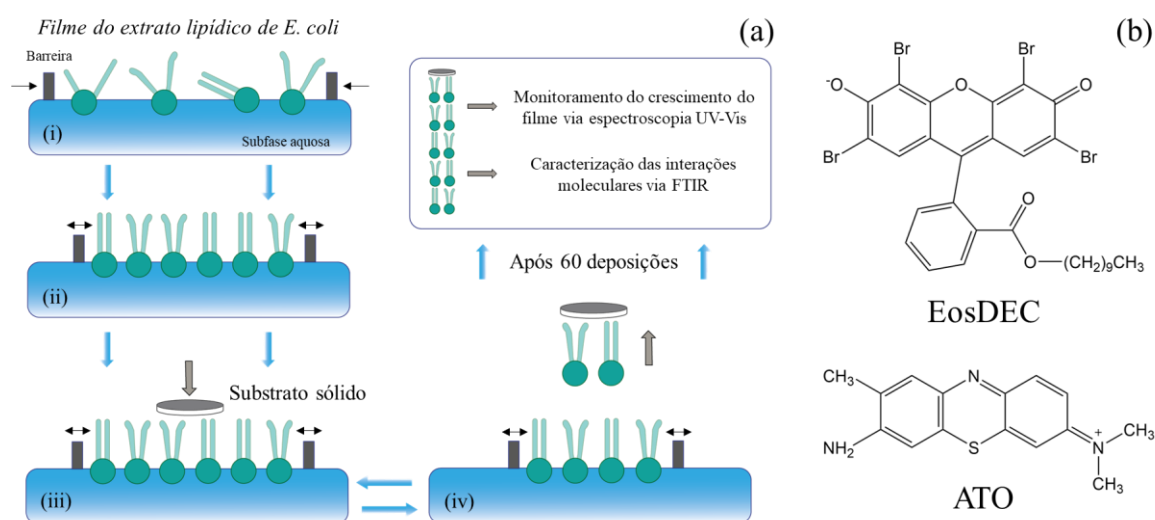
bidimensionais como a gasosa ( $\sim 0$  mN/m), líquido-expandida (25 a 50 mN/m), líquido-condensada (100 a 250 mN/m) e sólida ( $> 500$  mN/m) (DERVICHIAN, 1939; HARKINS; YOUNG; BOYD, 1940).

Nenhuma precaução foi tomada para evitar a oxidação não controlada pelo ar (LILJEBLAD et al., 2010; SENNATO et al., 2005), mas garantimos a reprodutibilidade dos filmes fabricados realizando experimentos em triplicata com variação da pressão superficial abaixo de  $\pm 2$  mN/m, para uma determinada área. Em uma segunda etapa, referente aos experimentos de fotoativação dos FSs, a *E. coli* na subfase com ATO assim como as monocamadas mistas com EosDEC foram mantidas a 30 mN/m, e irradiadas por um período de 2 horas usando fontes de LED vermelho (IP66-50W) e verde (BRIWAX FFG-50 W), respectivamente. Os LEDs foram posicionados 20 cm acima da interface, garantindo uma iluminação homogênea em toda a cuba, como mostrado na Figura 13. Ainda, garante-se a reprodutibilidade dos experimentos feitos tanto no escuro como no claro em triplicatas, com o desvio das áreas medidas em  $\pm 2\%$ .



**Figura 13.** Foto de um experimento de irradiação feito na cuba de Langmuir. Fonte: do autor.

Por último, monocamadas de Langmuir do extrato lipídico da *E. coli*, EosDEC, *E. coli* coespalhada com EosDEC (*E. coli*:EosDEC 10:1 v/v) e *E. coli* em  $10^{-5}$  mol/L de ATO (*E. coli* + ATO) foram transferidas para substratos sólidos pelo protocolo de Langmuir-Schaefer (LS) (KURNIAWAN et al., 2018). Para isso, a pressão superficial das monocamadas foi mantida constante em 30 mN/m enquanto a superfície dos filmes foi tocada por um substrato sólido de forma horizontal. O substrato foi então levantado e as multicamadas LS foram depositadas repetindo este procedimento. O crescimento dos filmes LS em substrato de quartzo foi monitorado por espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-Vis), de 190 a 1100 nm, utilizando um espectrômetro Agilent (modelo Cary 60). A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para filmes LS em substratos de germânio (Ge) usando um espectrômetro Bruker (modelo Alpha II) com resolução espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$  e 256 *scans*. Os espectros foram obtidos no modo de transmissão, onde ao menos 5 espectros foram adquiridos em diferentes porções do filme LS. Uma representação esquemática da fabricação dos filmes de Langmuir e LS, bem como as principais técnicas de caracterização realizadas, é apresentada na Figura 14a. As estruturas moleculares da EosDEC e do ATO são ilustradas na Figura 14b.



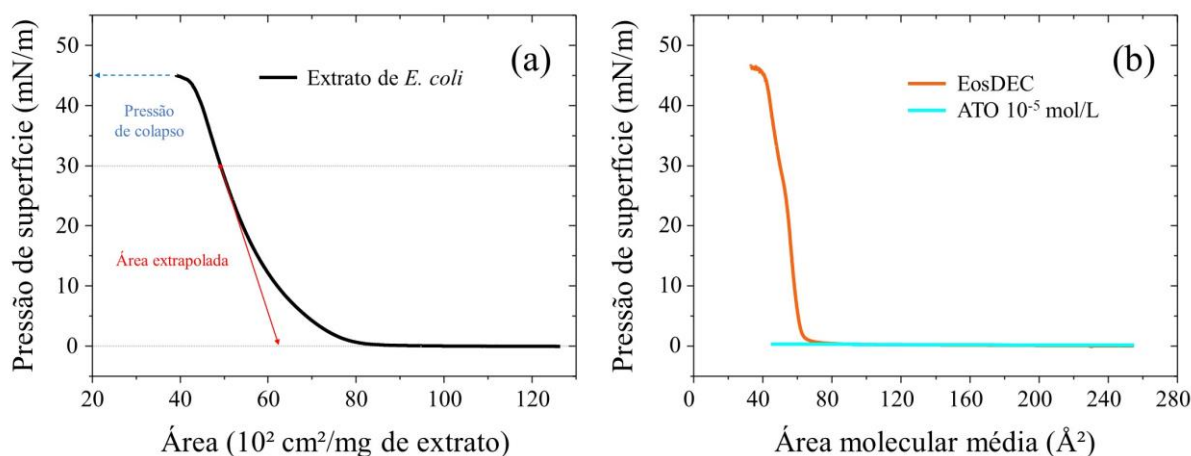


**Figura 14.** (a) Representação esquemática dos filmes de Langmuir e LS do extrato lipídico de *E. coli*, além das técnicas de caracterização realizadas. (i) A solução de clorofórmio é espalhada na interface ar/água e o clorofórmio é deixado evaporar por 10 minutos; (ii) compressão simétrica das barreiras até o material entre as barreiras atingir 30 mN/m de pressão; (iii) O substrato toca horizontalmente a interface (iv) transferindo a monocamada da interface para o substrato, completando a deposição LS. As etapas (iii) e (iv) são repetidas até que o substrato atinja 60 camadas depositadas. Durante a deposição, o crescimento do filme LS é caracterizado por espectroscopia de absorção UV-Vis e após as 60 deposições por FTIR. (b) Estruturas moleculares da EosDEC e do ATO.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Adsorção da EosDEC e do ATO nas monocamadas de *E. coli*

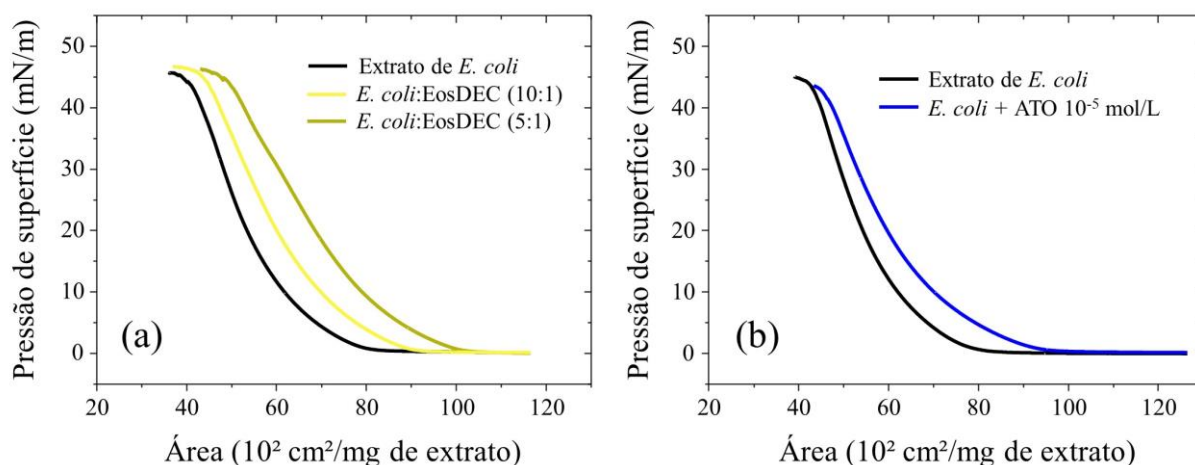
O extrato lipídico puro da *E. coli* é superficialmente ativo e apresenta uma isoterma  $\pi$ -A com pressão de colapso em torno de 45 mN/m (Figura 15a). Observa-se ainda uma área extrapolada na pressão de 30 mN/m de 130 cm<sup>2</sup> (ou 6,5 x 10<sup>3</sup> cm<sup>2</sup>/mg de extrato), o que é comparável aos 136 cm<sup>2</sup> relatado por Sandrino et al. (SANDRINO et al., 2017). Certa atividade superficial também foi observada para a EosDEC pura, formando monocamadas altamente compactas (Figura 15b), conforme relatado anteriormente (MOREIRA et al., 2020). Enquanto isso, filmes contendo apenas ATO na subfase aquosa não apresentaram atividade superficial durante a compressão das barreiras, como é indicado na Figura 15b.



**Figura 15.** (a) Isotherma da pressão de superfície (mN/m) pela área (cm<sup>2</sup>/mg de extrato lipídico) da monocamada do extrato lipídico de *E. coli* pura. (b) Isothermas da pressão de superfície (mN/m) pela área molecular média (Å<sup>2</sup>) dos FSs EosDEC (laranja) e do ATO (azul).

As isothermas  $\pi$ -A das monocamadas mistas de *E. coli*:EosDEC (10:1 e 5:1, v/v) em água ultrapura e da monocamada de *E. coli* em ATO (10<sup>-5</sup> mol/L) são exibidas nas Figuras 16a e 16b, respectivamente. O aumento do volume da EosDEC no filme misto de *E. coli*:EosDEC deslocou as isothermas  $\pi$ -A para maiores áreas devido à maior adsorção de EosDEC nas monocamadas. Os deslocamentos na área relativa ( $A_{relativa} = (A - A_0)/A_0$ ) das monocamadas de *E.*

*coli*:EosDEC (A) em relação as monocamadas puras de *E. coli* ( $A_0$ ) estão resumidos na Tabela 2. A comparação com trabalhos anteriores (MOREIRA et al., 2020) não é direta, pois o número de moléculas lipídicas do extrato de *E. coli* não pode ser estimado, assim como a sua razão molar com a EosDEC. Contudo, podemos fazer suposições com base nos dados. A incorporação de quantidades semelhantes de EosDEC (5:1) expandiram significativamente os filmes de *E. coli* (33,9%) quando comparado aos 8,5% das monocamadas de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE:EosDEC 5:1) (MOREIRA et al., 2020), sugerindo que fosfatidiletanolaminas (PE) podem não governar as interações com o extrato lipídico, apesar de estarem em maior quantidade na constituição do extrato.



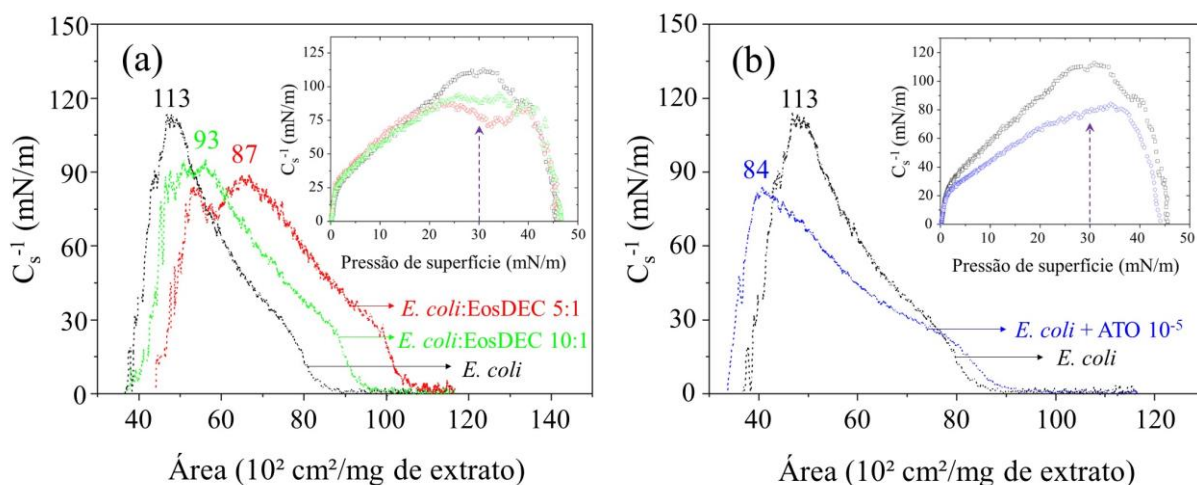
**Figura 16.** Isotermas da pressão de superfície (mN/m) pela área (cm<sup>2</sup>/mg de extrato lipídico) das monocamadas mistas de (a) *E. coli*:EosDEC (10:1 e 5:1 v/v) e (b) *E. coli* em solução de ATO a 10<sup>-5</sup> mol/L. A isoterma  $\pi$ -A da monocamada do extrato lipídico de *E. coli* pura é dada como referência.

A incorporação do ATO no filme de *E. coli* (Figura 16b) também sugere a expansão das monocamadas de *E. coli*, dado o deslocamento da isoterma  $\pi$ -A para maior área. Em contraste com a EosDEC, a área relativa de *E. coli* com ATO (11,9%) é comparável à observada para monocamadas de DOPE puro em 10<sup>-5</sup> mol/L de ATO (13%) (ALMEIDA; OLIVEIRA; AOKI, 2019), sugerindo um papel importante dos grupos polares PE nos mecanismos de interação com o ATO catiônico, que se mantêm aqui nos modelos complexos da membrana de *E. coli*.

**Tabela 2.** Mudanças na área relativa do extrato lipídico de *E. coli* [ $(\frac{A - A_0}{A_0}) \times 100$ ].  $A_0$  e  $A$  são as áreas extrapoladas em 30 mN/m para as isotermas  $\pi$ -A de *E. coli* pura e *E. coli* contendo EosDEC ou ATO, respectivamente.

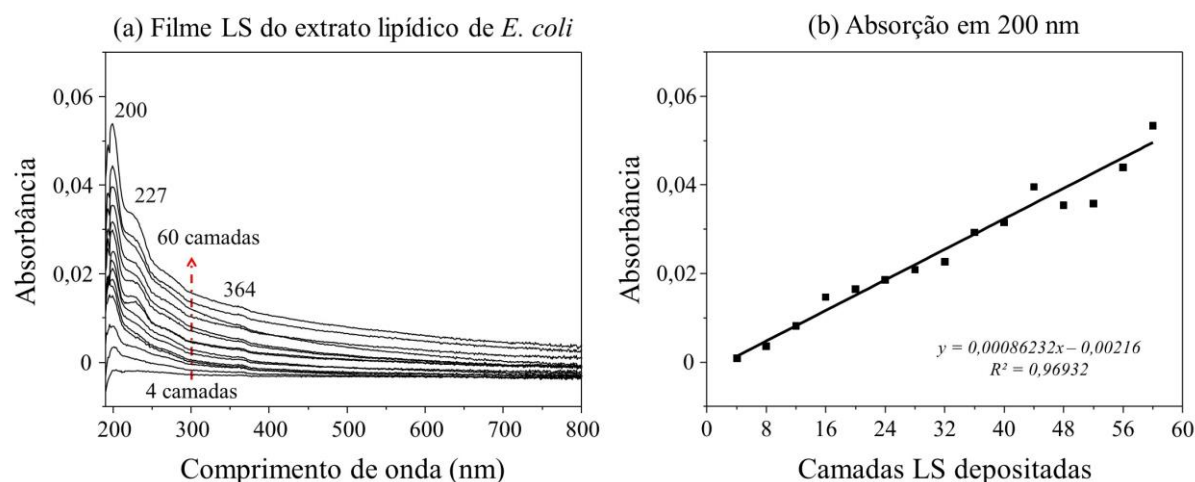
|                        | Área relativa          |                      |
|------------------------|------------------------|----------------------|
|                        | <i>E. coli</i> :EosDEC | <i>E. coli</i> + ATO |
| 10:1 (v/v)             | 12,5 % $\pm$ 4,7 %     | -                    |
| 5:1 (v/v)              | 33,9 % $\pm$ 4,1 %     | -                    |
| 10 <sup>-5</sup> mol/L | -                      | 11,9 % $\pm$ 4,5 %   |

Dados adicionais sobre a elasticidade no plano das monocamadas são fornecidos na Figura 17. A elasticidade, ou módulo de compressão superficial ( $C_s^{-1}$ ), foi calculada a partir das isotermas  $\pi$ -A da Figura 16, utilizando a equação  $C_s^{-1} = -A (d\pi/dA)$  (OLIVEIRA; CASELI; ARIGA, 2022), onde  $\pi$  é a pressão superficial e  $A$  é a área dos filmes por massa de extrato lipídico. A princípio, o filme de *E. coli* apresentou uma máxima compressibilidade de 113 mN/m, indicando que os filmes atingiram o estado líquido-condensado (OLIVEIRA; CASELI; ARIGA, 2022). No que diz respeito aos filmes mistos, podemos observar que a monocamada de *E. coli* é afetada tanto pela incorporação da EosDEC quanto do ATO. No caso da EosDEC, os valores máximos de elasticidade diminuíram de 113 para 93 mN/m e 87 mN/m, considerando as proporções de 10:1 e 5:1, respectivamente. A incorporação do ATO também diminuiu a elasticidade da monocamada de 113 para 84 mN/m. Ambas as modificações ocorreram na região de 30 mN/m (inserções das figuras), o que é relevante do ponto de vista biológico, pois acredita-se que essa pressão superficial equivale à energia livre de Gibbs correspondente ao estado termodinâmico das membranas celulares (MARSH, 1996). Tais resultados, indicam um aumento na fluidez das monocamadas (OLIVEIRA; CASELI; ARIGA, 2022) sob incorporação de ambos os FSs, o que afeta diretamente no transporte de carga e massa através da membrana.



**Figura 17.** Módulo de elasticidade no plano ( $C_s^{-1}$ ) para as monocamadas do extrato lipídico de *E. coli*, assim como para as incorporações dos FSs (a) EosDEC (10:1 e 5:1) e (b) ATO ( $10^{-5}$  mol/L). A equação  $C_s^{-1} = -A (d\pi/dA)$  foi utilizada em função da área ( $\text{cm}^2/\text{mg}$  de extrato) e da pressão superficial (inserções das figuras).

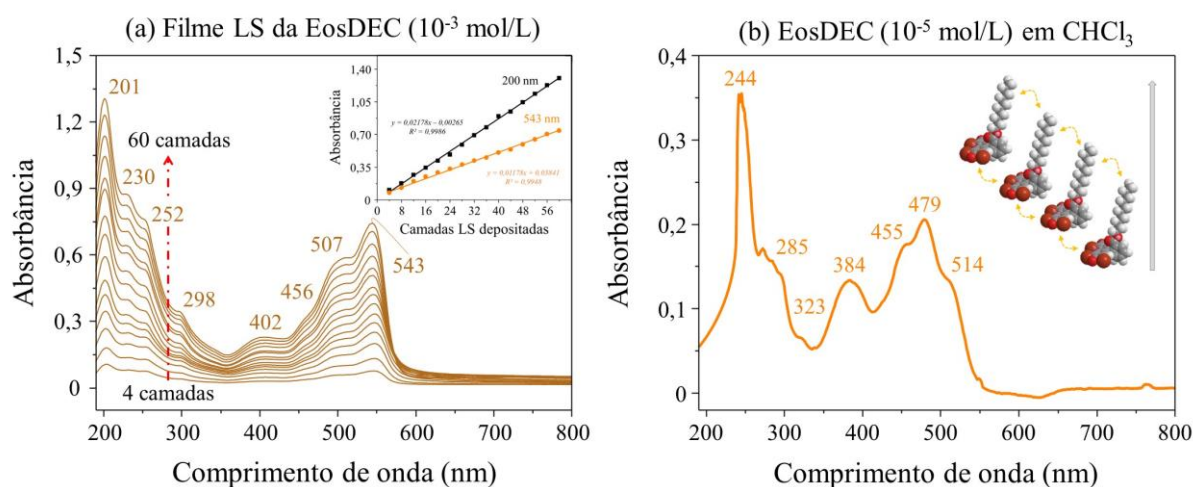
Monocamadas de Langmuir do extrato de *E. coli*, *E. coli*:EosDEC (10:1 v/v) e *E. coli* em ATO ( $10^{-5}$  mol/L) foram transferidas para substratos sólidos formando filmes de Langmuir-Schaefer (LS), mantendo pressão superficial constante de 30 mN/m. As deposições dos filmes LS foram monitoradas a cada 4 camadas, até 60 camadas, pela espectroscopia de absorção UV-Vis. O filme LS do extrato lipídico de *E. coli* exibiu três bandas na faixa do UV próximo, em 200 nm, 227 nm e em 364 nm (Figura 18a). Bandas de absorção semelhantes foram previamente identificadas por Van den Berg et al. (VAN DEN BERG; HAGEN; VAN DONGEN, 2000) ao caracterizarem a proteína prismane (HCP), a qual é codificada pelo gene de agrupamento híbrido da *E. coli*. Por fim, um crescimento linear de absorbância foi observado em 200 nm com o aumento do número de camadas LS (Figura 18b;  $R^2 = 0,969$ ), sugerindo que quantidades similares da monocamada foram depositadas em cada etapa.



**Figura 18.** (a) Espectro de absorção UV-Vis do filme LS do extrato de *E. coli* depositado em substrato de quartzo. O crescimento do filme foi monitorado a cada 4 camadas até 60 camadas. (b) Dependência linear da absorbância em 200 nm (reta) com o número de camadas LS depositadas. O desvio padrão dos dados são apresentados, mas não são evidentes. A equação da reta obtida é indicada junto a curva.

Adicionalmente, devido à atividade superficial da EosDEC, um filme LS derivado da monocamada pura de EosDEC também foi depositado. A Figura 19a mostra o espectro de absorção para o filme LS da EosDEC, com as bandas localizadas em 201, 230, 252, 298, 402, 507 e 543 nm. Particularmente relevante, as bandas em 507 e 543 nm são atribuídas as formas diméricas e monoméricas da EosDEC, respectivamente. Além disso, uma forma trimérica também aparece em 402 nm (DE; DAS; GIRIGOSWAMI, 2005; SURADKAR; BHAGWAT, 2006). Entretanto, a forma dimérica da EosDEC, quando adicionada apenas em clorofórmio (Figura 19b), é originalmente encontrada em 455 nm. Além disso, a forma monomérica também se apresenta de forma deslocada, sendo localizada em 479 nm (Figura 19b), junto com uma porção residual em 514 nm. Outras três bandas presentes na solução de clorofórmio estão localizadas em 244, 285 e 323 nm, as quais são atribuídas às transições  $\pi-\pi^*$  dos anéis aromáticos (ALVAREZ-MARTIN et al., 2017), onde foram deslocadas para 201, 230-252 e 298 nm no filme LS, respectivamente. Tais mudanças indicam a formação de agregados do tipo J no filme LS puro, onde os dipolos das moléculas se encontram em um arranjo no estilo cabeça-

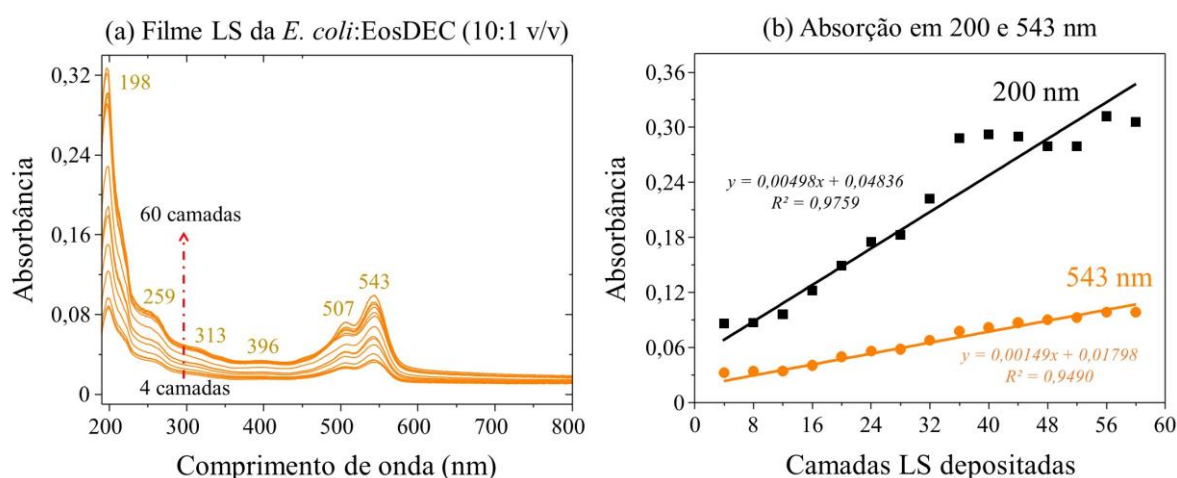
cauda (DE; DAS; GIRIGOSWAMI, 2005; EL-BAYOUMI; KASHA, 1961; SAFAR SAJADI; KHOEE, 2021), conforme ilustrado na inserção da Figura 19b. Apesar de tal efeito, a inserção na Figura 19a exibe o crescimento linear do filme LS em 200 nm ( $R^2 = 0,999$ ) e em 543 nm ( $R^2 = 0,995$ ), demonstrando que quantidades similares do material foram depositadas durante a construção do filme LS.



**Figura 19.** (a) Espectro de absorção UV-Vis do filme LS de EosDEC depositados em substrato de quartzo. O crescimento do filme foi monitorado a cada 4 camadas até 60 camadas. A inserção mostra a dependência linear da absorbância em 200 e 543 nm em função do número de camadas depositadas. O desvio padrão dos dados são apresentados, mas não são evidentes. As equações das retas obtidas são indicadas junto as curvas. (b) Espectro UV-Vis da solução de EosDEC em clorofórmio ( $10^{-5}$  mol/L). Uma figura esquemática dos agregados J de EosDEC é ilustrada na porção superior. A coloração dos átomos seguem a correspondência: carbono (cinza), hidrogênio (branco), bromo (marrom) e oxigênio (vermelho).

As bandas de absorção monoméricas (507 nm) e diméricas (543 nm) do filme LS da EosDEC também foram observadas no filme misto de *E. coli*:EosDEC (Figura 20a), confirmando a deposição do FS. Uma banda menor em 396 nm confirma a forma trimérica da EosDEC. As transições  $\pi$ - $\pi^*$  dos anéis aromáticos estão localizadas em 198, 259 e 313 nm. A principal modificação encontrada está na banda dimérica em 507 nm, que possui menor valor de absorbância do que a observada nos filmes LS de EosDEC (Figura 19a), sugerindo a presença de menos agregados. De fato, a EosDEC demonstra uma tendência em formar

monocamadas altamente compactadas favorecidas pelas interações  $\pi$ - $\pi$  entre os anéis xantênicos (MOREIRA et al., 2020). Com relação à absorbância *versus* o número de camadas (Figura 20b), um crescimento linear foi observado em 200 nm ( $R^2 = 0,976$ ) e 543 nm ( $R^2 = 0,949$ ). Tal comportamento sugere que quantidades aproximadas do material foram depositadas a cada camada.

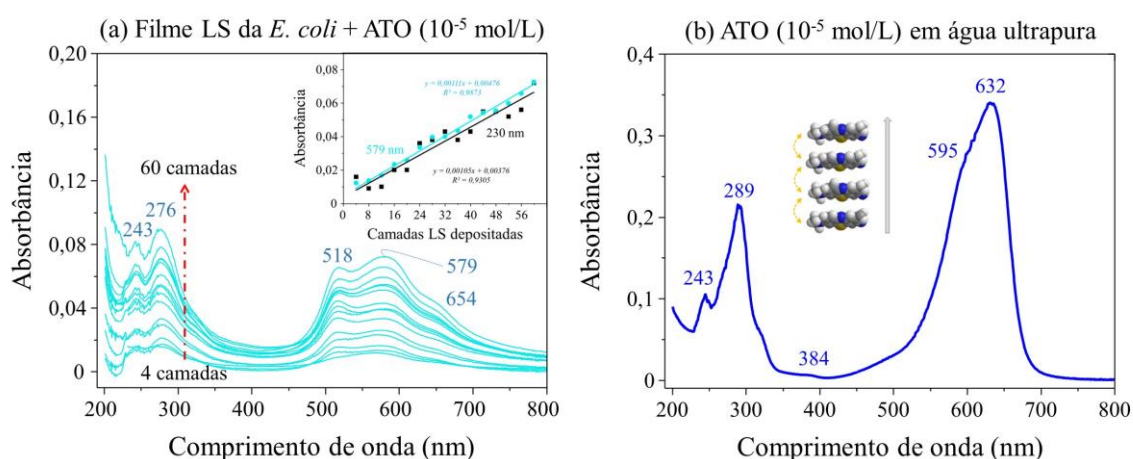


**Figura 20.** (a) Espectro de absorção UV-Vis do filme LS do extrato de *E. coli* com EosDEC (10:1 v/v) depositado em substrato de quartzo. O crescimento do filme foi monitorado a cada 4 camadas até 60 camadas. (b) Dependência linear da absorbância em 200 e 543 nm (reta) em função do número de camadas LS depositadas. O desvio padrão dos dados são apresentados, mas não são evidentes. As equações das retas obtidas são indicadas junto as curvas.

O último filme LS monitorado foi o da *E. coli* em subfase de ATO ( $10^{-5}$  mol/L), o qual apresentou bandas de absorção em 243, 276, 518, 579 e 654 nm (Figura 21a), sendo todas atribuídas aos modos do FS ATO depositado. O espectro de absorção UV-Vis da solução aquosa de ATO (Figura 21b) mostra uma absorção máxima em 632 nm, além de uma menor absorção em 595 nm, atribuídos às espécies monoméricas e diméricas, respectivamente (CHAN; BOLTON, 1980; ILANCHELIAN; RETNA RAJ; RAMARAJ, 2000). Contudo, a banda do monômero é deslocada no filme LS misto para 654 nm, enquanto a banda do dímero é deconvoluída em 518 nm e 579 nm (D'ILARIO; MARTINELLI, 2006). Tal comportamento indica a presença de agregados J e H no filme LS, os quais mostram dipolos dispostos na



orientação cabeça-cauda e paralelos entre si (ADACHI et al., 2010; CAI et al., 2018; EL-BAYOUMI; KASHA, 1961; SAFAR SAJADI; KHOEE, 2021). Além disso, a absorbância monitorada tanto em 230 nm ( $R^2 = 0,931$ ) como em 579 nm ( $R^2 = 0,987$ ) demonstra um crescimento linear, sugerindo que quantidades semelhantes do material foram transferidas para o substrato a cada etapa.



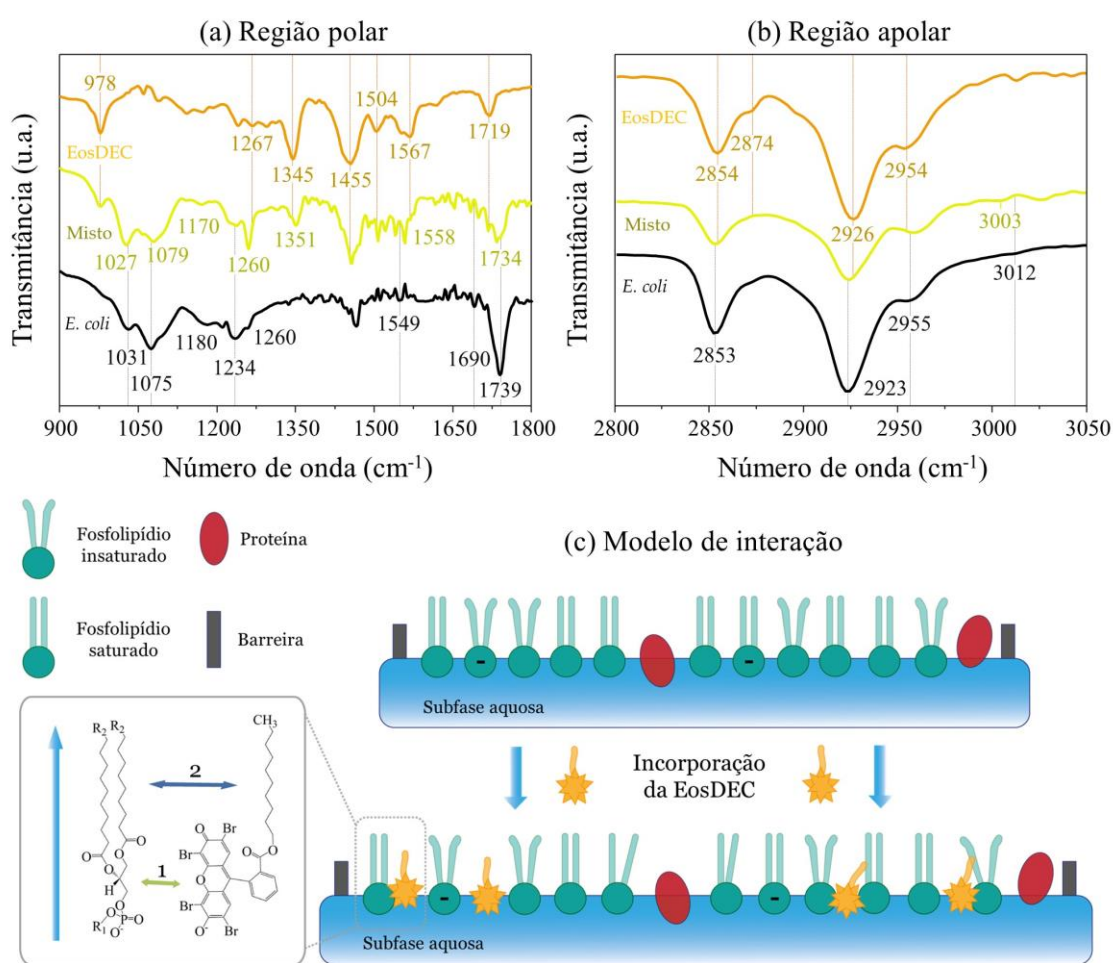
**Figura 21.** (a) Espectro de absorção UV-Vis do filme LS do extrato de *E. coli* com ATO ( $10^{-5}$  mol/L) depositado em substrato de quartzo. O crescimento do filme foi monitorado a cada 4 camadas até 60 camadas. A inserção mostra a dependência linear da absorbância em 230 e 579 nm em função do número de camadas depositadas. O desvio padrão dos dados são apresentados, mas não são evidentes. As equações das retas obtidas são indicadas junto as curvas. (b) Espectro UV-Vis da solução de ATO em água ultrapura ( $10^{-5}$  mol/L). Uma figura esquemática dos agregados H do ATO é ilustrada na porção superior. A coloração dos átomos segue a correspondência: carbono (cinza), hidrogênio (branco), nitrogênio (azul) e enxofre (amarelo).

Com o sucesso da construção de todos os filmes LS, espera-se que as interações estabelecidas nos filmes de Langmuir sejam preservadas em grande extensão após a deposição (AOKI et al., 2009). Assim, as interações moleculares da EosDEC e do ATO no filme lipídico de *E. coli* foram acessadas através da espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros FTIR de filmes LS do extrato lipídico de *E. coli*, EosDEC e *E. coli*:EosDEC (10:1 v/v) são mostrados na Figura 22. As atribuições dos principais modos vibracionais são elencadas na Tabela 3, junto aos deslocamentos induzidos pela incorporação dos FSs. Os grupos polares da *E. coli* (Figura 22a) foram significativamente mais

afetados do que a região alifática (Figura 22b), após a incorporação da EosDEC. Por exemplo, o  $\nu_s(\text{PO}_2^-)$  deslocou de  $1075\text{ cm}^{-1}$  para  $1079\text{ cm}^{-1}$ , enquanto o  $\nu(\text{C-O-PO}_2^-)$  foi de  $1031\text{ cm}^{-1}$  para  $1027\text{ cm}^{-1}$ , além de ter a sua intensidade relativa aumentada. O  $\nu_{as}(\text{C-O-C})$  deslocou de  $1180\text{ cm}^{-1}$  para  $1170\text{ cm}^{-1}$ , enquanto o modo vibracional C-O em  $1260\text{ cm}^{-1}$  teve a sua intensidade aumentada. A  $\nu(\text{C=O})$  não hidratada (SANDRINO et al., 2017) em  $1739\text{ cm}^{-1}$  foi deslocada para  $1734\text{ cm}^{-1}$  e teve a intensidade diminuída. Essas modificações revelam que a incorporação da EosDEC afeta os grupos fosfatos até a região da carbonila do filme lipídico. Além disso, bandas da EosDEC foram identificadas no filme misto em  $1558\text{ cm}^{-1}$ ,  $1507\text{ cm}^{-1}$  e  $1457\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes ao estiramento C=C e de grupos aromáticos. A forma tetraquinóide dos corantes xantênicos pôde ainda ser observada no pico em  $978\text{ cm}^{-1}$  (AMAT-GUERRI et al., 1990). Os modos vibracionais da amida primária (I) e secundária (II) também foram observados no espectro FTIR de ambos os filmes de *E. coli* e *E. coli*:EosDEC (10:1 v/v), o que condiz com os dados PM-IRRAS relatados por Sandrino et al. (SANDRINO et al., 2017). Essas bandas provavelmente surgem de proteínas residuais que podem fazer parte dos 17,6% de substâncias desconhecidas presentes no extrato lipídico da *E. coli*, mas sob a presença da EosDEC, nenhuma modificação pôde ser identificada.

Em relação às cadeias apolares (Figura 22b), apenas o estiramento HC=CH foi afetado, deslocando-se de  $3012\text{ cm}^{-1}$  para  $3003\text{ cm}^{-1}$ . A baixa intensidade do modo vibracional HC=CH em relação ao  $\nu(\text{CH}_2)$  sugere cadeias altamente organizadas, o que é característico de lipídios saturados, sendo estes o principal componente (> 70%) da membrana lipídica da *E. coli* (ISHINAGA; KANAMOTO; KITO, 1979). De fato, não foi observado alterações nos modos vibracionais de  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  e  $\nu_s(\text{CH}_2)$ , revelando que o estado de ordenação das caudas alifáticas não foi afetado pela incorporação da EosDEC (ALMEIDA; OLIVEIRA; AOKI, 2019; LEVIN et al., 1985; LILJEBLAD et al., 2010; MOREIRA et al., 2020). Portanto, as principais alterações observadas no filme LS da *E. coli*:EosDEC (10:1 v/v), indicam que as moléculas de

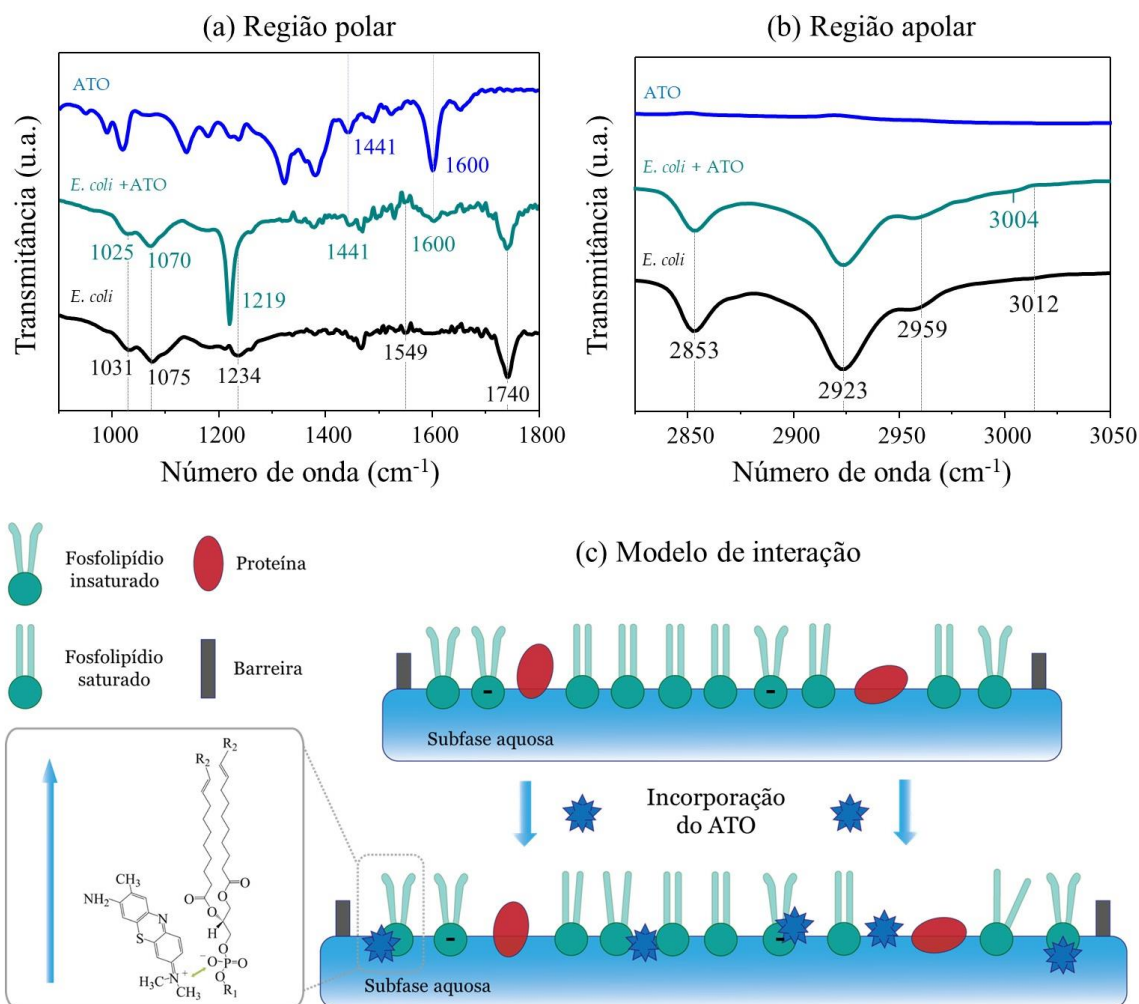
EosDEC estão mais próximas da região polar da *E. coli*, com adsorção limitada nas caudas, conforme esquematizado na Figura 22c. É provável que a presença de lipídios saturados possa ter aumentado o empacotamento das monocamadas de *E. coli*, dificultando a sua inserção no meio lipídico. Tal comportamento difere daquele observado anteriormente em monocamadas totalmente insaturadas, que se mostraram menos compactas, permitindo a incorporação da EosDEC até as regiões das cadeias (MOREIRA et al., 2020).



**Figura 22.** Espectros FTIR dos filmes LS (60 camadas) do extrato lipídico de *E. coli* (preto), EosDEC (laranja) e *E. coli*:EosDEC 10:1 v/v (amarelo) depositados sobre substratos de germânio. Os espectros foram divididos em região (a) polar e (b) apolar. (c) Ilustração esquemática da interação da EosDEC com a monocamada de *E. coli*. O extrato é composto por fosfolipídios insaturados e saturados (57,5% PE, 15,1% PG, 9,8% CL e 17,6% substâncias desconhecidas). O sinal negativo na cabeça polar de alguns fosfolipídios foi usado para representar os fosfolipídios carregados negativamente (PG e CL). A inserção mostra a EosDEC se aproximando dos fosfolipídios principalmente pelas cabeças polares (1) e em menor extensão pelas caudas (2). Os fosfolipídios presentes no extrato podem ter diferentes tamanhos ( $R_2$ ) e diferentes grupos polares ( $R_1$ ).

Os espectros FTIR dos filmes LS do extrato lipídico de *E. coli* e *E. coli* + ATO ( $10^{-5}$  mol/L) são mostrados na Figura 23, assim como o espectro do pó de ATO, que é fornecido como referência. Os efeitos do ATO nas monocamadas de *E. coli* foram mais significativos nos grupos polares, junto à região dos fosfatos (Figura 23a). Por exemplo, o  $\nu(\text{C-O-PO}_2^-)$  em  $1031\text{ cm}^{-1}$  e o  $\nu_s(\text{PO}_2^-)$  em  $1075\text{ cm}^{-1}$  deslocaram para  $1025\text{ cm}^{-1}$  e  $1070\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Além disso, o  $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$  foi deslocado de  $1234\text{ cm}^{-1}$  para  $1219\text{ cm}^{-1}$ , além de ter a sua intensidade aumentada. Sabe-se ainda que os fosfatos são suscetíveis às ligações de hidrogênio com as moléculas de água circundantes e os grupos aminas de lipídios adjacentes presentes na membrana (GRUNER et al., 1988). A incorporação do ATO parece ter afetado essas ligações de hidrogênio, devido as interações eletrostáticas entre os grupos amina (catiônicos) do ATO e os fosfatos (aniônicos) do extrato de *E. coli*, semelhante ao que foi observado anteriormente para monocamadas de Langmuir de DOPE e DOPG (ALMEIDA; OLIVEIRA; AOKI, 2019). Evidências mais substanciais da incorporação das moléculas do ATO no filme de *E. coli* incluem a aparição das bandas de fenotiazina, em  $1441\text{ cm}^{-1}$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$  (ALMEIDA; OLIVEIRA; AOKI, 2019).

Em relação às caudas alifáticas (Figura 23b), a banda do  $\nu(\text{CH}_2)$  predomina o espectro, com a única alteração notável relacionada ao  $\nu(\text{HC=CH})$ , que passou de  $3012\text{ cm}^{-1}$  para  $3004\text{ cm}^{-1}$ . Embora a incorporação do ATO na vizinhança das insaturações lipídicas possa ser sugerida, uma modificação tão sutil não indica uma presença significativa na região da cadeia, assim como foi observado para o filme LS da *E. coli*:EosDEC (10:1 v/v). Desta forma, o ATO parece interagir fortemente com os grupos polares, afetando principalmente os grupos fosfatos, sem mostrar preferências significativas pelos lipídios saturados ou insaturados. Além disso, nenhum efeito foi detectado quanto as proteínas residuais do extrato frente a incorporação do ATO. Uma representação esquemática de tais interações moleculares é apresentada na Figura 23c.



**Figura 23.** Espectros FTIR dos filmes LS do extrato lipídico de *E. coli* (preto), de *E. coli* + ATO  $10^{-5}$  mol/L (verde), os quais foram depositados sobre substratos de germânio. O espectro do pó do ATO (azul) também é fornecido como referência. Os espectros foram divididos em região (a) polar e (b) apolar. (c) Ilustração esquemática da interação do ATO com as monocamadas de *E. coli*. O extrato é composto por fosfolipídios insaturados e saturados (57,5% PE, 15,1% PG, 9,8% CL e 17,6% substâncias desconhecidas). O sinal negativo na cabeça polar de alguns fosfolipídios foi usado para representar os fosfolipídios carregados negativamente (PG e CL). A inserção mostra o ATO se aproximando dos fosfolipídios principalmente pela atração eletrostática entre os grupos amina-catiônicos e os fosfatos aniônicos. Os fosfolipídios presentes no extrato podem ter diferentes tamanhos ( $R_2$ ) e diferentes grupos polares ( $R_1$ ).

**Tabela 3.** Atribuições dos principais modos vibracionais dos filmes LS de *E. coli*, EosDEC, *E. coli*:EosDEC (10:1 v/v) e *E. coli* + ATO ( $10^{-5}$  mol/L).

| Denominações                                  | Extrato lipídico total de <i>E. coli</i> (cm <sup>2</sup> ) |                     |                  | EosDEC (cm <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------|------------------|----------------------------|
|                                               | Água                                                        | EosDEC <sup>A</sup> | ATO <sup>A</sup> | Água                       |
| $\nu(\text{HC}=\text{CH})$                    | 3012                                                        | 3003                | 3004             | -                          |
| $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$                | 2955                                                        | 2958                | 2958             | 2954                       |
| $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$                | 2923                                                        | 2924                | 2923             | 2926                       |
| $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$                 | 2873                                                        | -                   | -                | 2874                       |
| $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$                 | 2853                                                        | 2853                | 2853             | 2854                       |
| $\nu(\text{C}=\text{O})$                      | 1739                                                        | 1734                | 1739             | 1719                       |
| Amida I (proteína) <sup>B</sup>               | 1690                                                        | 1699                | 1692             | -                          |
| Amida II (proteína)                           | 1549                                                        | 1541                | 1549             | -                          |
| Grupo fenotiazínico                           | -                                                           | -                   | 1441 e 1600      | -                          |
| $\nu(\text{C}=\text{C}, \text{aromático})_2$  | -                                                           | 1558                | -                | 1553 e 1567                |
| $\nu(\text{C}=\text{C}, \text{aromático})_1$  | -                                                           | 1507                | -                | 1504                       |
| $\nu(\text{C}_6\text{H}_5)$                   | -                                                           | 1457                | -                | 1455                       |
| $\nu_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$               | -                                                           | 1351                | -                | 1345                       |
| $\nu(\text{C}-\text{O})$                      | 1260                                                        | 1260                | -                | 1267                       |
| $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$              | 1234                                                        | 1231                | 1219             | -                          |
| $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ | 1180                                                        | 1170                | 1170             | -                          |
| $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$               | 1075                                                        | 1079                | 1070             | -                          |
| $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{PO}_2^-)$        | 1031                                                        | 1027                | 1025             | -                          |
| $\nu_{\text{s}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$  | 983                                                         | -                   | -                | -                          |
| Forma tetraquinóide                           | -                                                           | 978                 | -                | 978                        |

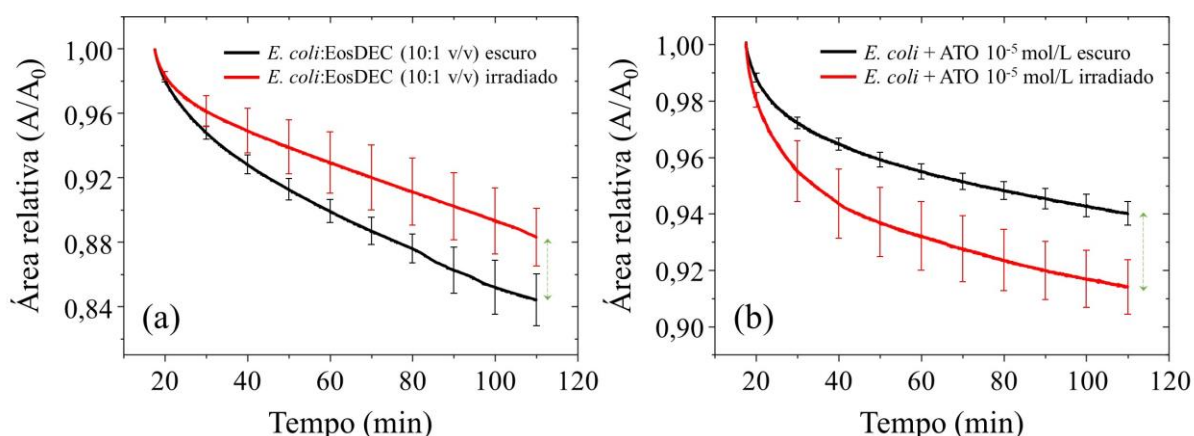
\* Apenas deslocamentos maiores ou iguais a 4 cm<sup>-1</sup> foram considerados, referente a resolução espectral do equipamento.

<sup>A</sup> *E. coli*:EosDEC = 10:1 (v/v); *E. coli* + ATO =  $10^{-5}$  mol/L.

<sup>B</sup> Amida relacionada à estrutura secundária.

#### 4.2 Fotoativação da EosDEC e do ATO incorporados nas membranas de *E. coli*

A foto-oxidação das monocamadas de *E. coli* induzidas tanto pela EosDEC (*E. coli*:EosDEC 10:1 v/v) como pelo ATO ( $10^{-5}$  mol/L) foram analisadas através da evolução da área superficial, sob pressão de superfície constante em 30 mN/m, conforme apresentado na Figura 24. Uma diminuição em área de todas as monocamadas não irradiadas é observada, o que está relacionado à oxidação descontrolada dos lipídios por espécies reativas de oxigênio (EROs) presentes no ar (LILJEBLAD et al., 2010), resultando na perda de material lipídico para a subfase. Por outro lado, um ligeiro aumento de  $3,9\% \pm 1,8\%$  na área relativa é observado para a monocamada mista de *E. coli*:EosDEC (10:1 v/v) irradiada, em relação à sua porção não irradiada, após 110 min (Figura 24a).



**Figura 24.** Evolução da área relativa ( $A/A_0$ ) entre os filmes de Langmuir não irradiados (preto) e irradiados (vermelho) de (a) *E. coli*:EosDEC (10:1 v/v) e (b) *E. coli* em ATO ( $10^{-5}$  mol/L). A área relativa foi calculada baseada na área inicial dos filmes ao atingir 30 mN/m ( $A_0$ ), a qual divide todas as áreas subsequentes do experimento ( $A$ ). As setas verdes indicam a diferença da curva média irradiada em relação a curva não irradiada, após 110 min de experimento.

Os estados excitados da EosDEC geram oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), os quais podem reagir com as insaturações presentes na cadeia dos lipídios, formando hidroperóxidos (ESTEVÃO et al., 2014). Estes grupos hidrofílicos tendem migrar para porções polares da monocamada (BUETTNER, 1993; VAN GINKEL et al., 1992; WONG-EKKABUT et al., 2007), o que

aumenta a área ocupada pelas moléculas lipídicas, semelhante ao observado em monocamadas irradiadas de fosfatidilcolinas insaturadas com os FSs eritrosina B (AOKI et al., 2016; BISTAFFA et al., 2020) e eosina Y (PEREIRA et al., 2018). Contudo, o resultado aqui apresentado para EosDEC (+ 4%) contrasta com os dados relatados anteriormente para monocamadas mistas de DOPE:EosDEC (5:1), DOPG:EosDEC (5:1) e CL:EosDEC (2:1), cujas áreas relativas diminuíram 28%, 19% e 17% após a irradiação, respectivamente (MOREIRA et al., 2020). Essa perda de material para a subfase foi associada à natureza hidrofóbica da EosDEC (ESTEVÃO et al., 2014), o que permitiu uma inserção mais significativa na região das cadeias alifáticas. Isso resultou na aproximação dos FSs aos sítios de alta energia das insaturações carbônicas, potencializando a reação de hidroperoxidação e transformando-os em aldeídos por meio de reações dependentes de contato, favorecendo a clivagem alquílica (BACELLAR et al., 2018). Porém, a complexidade existente no extrato lipídico da *E. coli* impactou significativamente tal mecanismo de inserção da EosDEC, modulando o seu resultado fotoquímico para apenas a hidroperoxidação.

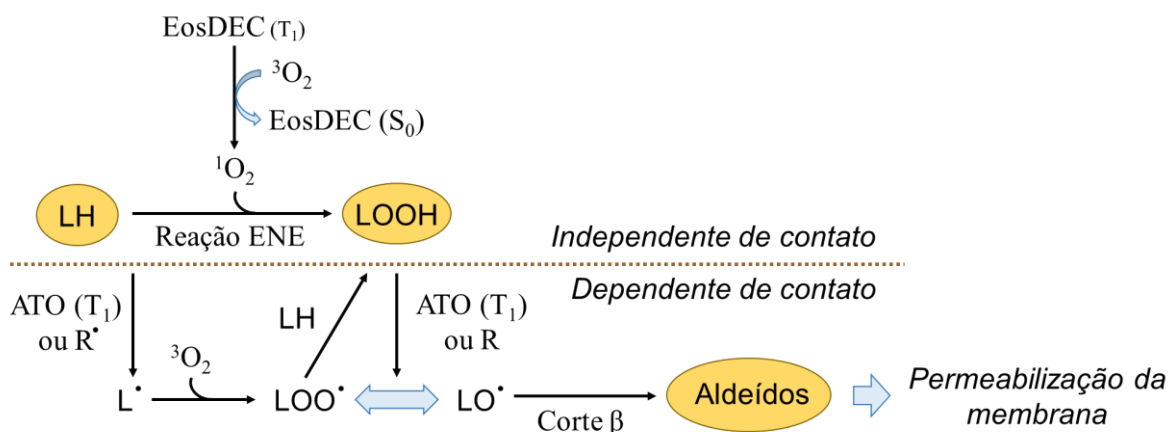
Em membranas bacterianas, os fosfolipídios são comumente separados em domínios distintos, que diferem quanto à sua composição, interação proteolipídica e grau de organização (VANOUNOU; PAROLA; FISHOV, 2003). Matsumoto et al. (MATSUMOTO et al., 2006; MAXFIELD, 2002; SIMONS; TOOMRE, 2000) destaca que os fosfolipídios saturados (os quais possuem cadeias lipídicas mais ordenadas em relação aos fosfolipídios insaturados) presentes nas membranas bacterianas tendem a estar próximos uns aos outros, formando até mesmo microdomínios segregados. Assim, uma vez que a EosDEC está ligada primordialmente a cadeias carbônicas saturadas, sua partição para domínios saturados do extrato lipídico da *E. coli* é esperada, devido à sua semelhança quanto à ordenação das cadeias.

Neste caso, mesmo considerando uma ínfima incorporação na região das cadeias da monocamada, ainda é evitado o contato direto com as insaturações, favorecendo então a



hidroperoxidação lipídica. Além disso, a pequena variação da área relativa se deve ao fato de ter-se uma quantidade limitada de lipídios insaturados no extrato (ISHINAGA; KANAMOTO; KITO, 1979), quando comparado as monocamadas de fosfolipídios sintéticos. Desta forma, o mecanismo de formação dos hidroperóxidos proposto para as reações independentes de contato entre as espécies  $^1\text{O}_2$  (gerados a partir dos estados tripletos excitados da EosDEC) e os lipídios insaturados do extrato de *E. coli* são detalhados na Figura 25 (BACELLAR et al., 2018).

Por outro lado, a irradiação reduziu a área relativa da monocamada mista de *E. coli* com ATO ( $10^{-5}$  mol/L) em  $2,5\% \pm 0,5\%$  (Figura 24b), indicando a perda de material para a subfase. Isso é consistente com a diminuição de 10% na área relativa relatada para monocamadas de DOPG, as quais foram irradiadas na subfase com ATO ( $10^{-5}$  mol/L) (ALMEIDA; OLIVEIRA; AOKI, 2019). A forte interação atrativa com os grupos aniônicos do DOPG, permitiu a inserção profunda das moléculas do ATO catiônico na monocamada, favorecendo reações dependentes de contato entre os estados excitados do FS e as insaturações das cadeias alifáticas ou até mesmo hidroperóxidos previamente formados, resultando na criação de aldeídos e posterior permeabilização da membrana (ALMEIDA; OLIVEIRA; AOKI, 2019; BACELLAR et al., 2018). Os dados de FTIR aqui apresentados (Figura 23), também sugerem uma forte interação do ATO com os fosfatos aniônicos disponíveis do extrato lipídico da *E. coli*, o qual contém mais de 15% de fosfatidilgliceróis em sua composição. Essa interação possivelmente é a força motriz que permite a inserção do ATO nas monocamadas, induzindo a permeabilização fotoinduzida. A Figura 25 mostra o mecanismo proposto para as reações dependentes de contato entre os estados tripletos excitados de ATO (ou seus radicais) e os lipídios insaturados presentes no extrato de *E. coli*, levando à clivagem da cadeia carbônica e a formação de aldeídos.



**Figura 25.** Mecanismos propostos para as reações independentes de contato e dependentes de contato entre a monocamada do extrato lipídico de *E. coli* com a EosDEC e o ATO, respectivamente. Terminologias: Estados fundamental ( $S_0$ ) e tripleto excitado ( $T_1$ ) dos FSs; Estado fundamental ( $^3O_2$ ) e singleto ( $^1O_2$ ) do oxigênio; Espécies radicais genéricas ( $R^\bullet$ ); Lipídio não oxidado (LH); Radicais centrados em carbono lipídico ( $L^\bullet$ ), radicais peroxil (LOO $^\bullet$ ) e alcoxil (LO $^\bullet$ ); Hidroperóxido lipídico (LOOH). *Reimpressão (adaptada) com permissão de Bacellar et al. (BACELLAR et al., 2018). Direitos autorais (2018) American Chemistry Society.*

## 5 CONCLUSÃO

Monocamadas de Langmuir do extrato lipídico da *E. coli* foram construídas como forma representativa de modelo complexo da membrana bacteriana Gram-negativa, buscando determinar os mecanismos de ligação e os efeitos foto-oxidativos induzidos pela irradiação dos fotossensibilizadores EosDEC e ATO. Os fosfatos aniônicos se mostraram afetados pela incorporação tanto do ATO como para a EosDEC, sendo o efeito mais forte para o ATO devido às interações eletrostáticas atrativas. A extensão das interações da EosDEC atinge a região da carbonila, beneficiada pela sua natureza hidrofóbica. Além disso, ambos os FSs apresentaram inserção limitada na região da cadeia apolar. No entanto, cadeias alquílicas foram clivadas como resultado das reações dependentes de contato entre os estados tripletos excitados do ATO e as insaturações ou hidroperóxidos previamente formados, levando a perda de material sob iluminação. Por outro lado, reações independentes de contato foram desencadeadas pela EosDEC fotoativada, resultando no aumento da área relativa da monocamada e a formação de hidroperóxidos.

Surpreendentemente, a natureza hidrofóbica da EosDEC não proporcionou fortes adsorção nas cadeias lipídicas, o que contrasta com dados anteriores sobre monocamadas lipídicas insaturadas puras. Mesmo considerando uma pequena incorporação nas cadeias carbônicas, a cauda saturada da EosDEC pode ter favorecido a partição para domínios de moléculas saturadas do extrato da *E. coli*, evitando assim o contato direto com as insaturações da membrana e diminuindo a sua eficiência quanto a permeabilização da membrana. Tomados em conjunto, esses resultados destacam o papel desempenhado pelas interações moleculares, partindo de modelos mais simplificados em relação a modelos mais complexos, assim como os sítios de ligação dos FSs para o resultado fotoquímico. A compreensão das interações moleculares entre os FSs de diferentes lipofilicidades e o extrato lipídico podem fornecer dados para a busca do

controle sobre o resultado fotoquímico, o que é relevante para futuros desenvolvimentos em fotomedicina. Enquanto isso, FSs eficientes podem ser desenvolvidos com maiores taxas de incorporação e partição para domínios enriquecidos com fosfolipídios insaturados, uma vez que o dano à membrana depende fortemente das reações dependentes de contato.

## REFERÊNCIAS

- ABAT, C. et al. Extremely and pandrug-resistant bacteria extra-deaths: myth or reality? **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 9, p. 1687–1697, 2018.
- ABEBE, E.; GUGSA, G.; AHMED, M. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2020, p. 1–19, 2020.
- ADACHI, K. et al. Controllable adsorption and ideal H-aggregation behaviors of phenothiazine dyes on the tungsten oxide nanocolloid surface. **Langmuir**, v. 26, n. 1, p. 117–125, 2010.
- ALLEN, R. J.; WACLAW, B. Microbial population dynamics and evolution: a statistical physicist's guide. **IOP Publishing Ltd**, p. 0–30, 2017.
- ALMEIDA, A.; FAUSTINO, M. A.; TOMÉ, J. P. Photodynamic inactivation of bacteria: Finding the effective targets. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 10, p. 1221–1224, 2015.
- ALMEIDA, A. M. et al. Photochemical outcomes triggered by gold shell-isolated nanorods on bioinspired nanoarchitectonics for bacterial membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1865, n. 8, 2023.
- ALMEIDA, A. M.; OLIVEIRA, O. N.; AOKI, P. H. B. Role of toluidine blue-O binding mechanism for photooxidation in bioinspired bacterial membranes. **Langmuir**, v. 35, n. 51, p. 16745–16751, 2019.
- ALVAREZ-MARTIN, A. et al. Photodegradation mechanisms and kinetics of eosin-Y in oxic and anoxic conditions. **Dyes and Pigments**, v. 145, p. 376–384, 2017.
- ALVES, E. et al. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 141–164, 2014.
- AMAT-GUERRI, F. et al. Synthesis and spectroscopic properties of new rose bengal and eosin Y derivatives. **Dyes and Pigments**, v. 12, n. 4, p. 249–272, 1990.
- ANAS, A. et al. Advances in photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 49, p. 100452, 2021.
- ANDRADE, M. M. et al. The history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2020, p. 1–18, 2020.

AOKI, P. H. B. et al. Taking advantage of electrostatic interactions to grow Langmuir-Blodgett films containing multilayers of the phospholipid dipalmitoylphosphatidylglycerol. **Langmuir**, v. 25, n. 22, p. 13062–13070, 2009.

AOKI, P. H. B. et al. Molecular-level modifications induced by photo-oxidation of lipid monolayers interacting with erythrosin. **Langmuir**, v. 32, n. 15, p. 3766–3773, 2016.

ARIGA, K. Don't forget Langmuir–Blodgett films 2020: Interfacial nanoarchitectonics with molecules, materials, and living objects. **Langmuir**, v. 36, n. 26, p. 7158–7180, 2020.

ARIGA, K.; MORI, T.; LI, J. Langmuir nanoarchitectonics from basic to frontier. **Langmuir**, v. 35, n. 10, p. 3585–3599, 2019.

AWAD, M. M. et al. Important cellular targets for antimicrobial photodynamic therapy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7679–7688, 2016.

BACELLAR, I. O. L. et al. Photosensitized membrane permeabilization requires contact-dependent reactions between photosensitizer and lipids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 30, p. 9606–9615, 2018.

BADGER-EMEKA, L. Production of Antibiotics. In: **The Lancet**. [s.l.: s.n.].

BAIN, C. D. Studies of adsorption at interfaces by optical techniques: Ellipsometry, second harmonic generation and sum-frequency generation. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 3, n. 3, p. 287–292, 1998.

BASAK, S.; SINGH, P.; RAJURKAR, M. Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. **Journal of Pathogens**, v. 2016, p. 4065603, 2016.

BASSETTI, M.; RIGHI, E. Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? **Hematology**, v. 2013, n. 1, p. 428–432, 2013.

BASU, J. K.; SANYAL, M. K. Ordering and growth of Langmuir-Blodgett films: X-ray scattering studies. **Physics Report**, v. 363, n. 1, p. 1–84, 2002.

BEACHAM, I. R. Periplasmic enzymes in gram-negative bacteria. **International Journal of Biochemistry**, v. 10, n. 11, p. 877–883, 1979.

BISTAFFA, M. J. et al. Photo-induced necrosis on oropharyngeal carcinoma (HEp-2) cells mediated by the xanthene erythrosine. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 20, n. 10, p. 6180–6190, 2020.

BUCHOVEC, I. et al. Inactivation of Gram-negative bacteria *Salmonella enterica* by chlorophyllin-based photosensitization: Mechanism of action and new strategies to enhance the inactivation efficiency. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 172, p. 1–10, 2017.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535–543, 1993.

C REYGAERT, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.

CAI, K. et al. Concurrent cooperative J-aggregates and anticooperative H-aggregates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 17, p. 5764–5773, 2018.

CHAN, M. S.; BOLTON, J. R. Structures, reduction potentials and absorption maxima of synthetic dyes of interest in photochemical solar-energy storage studies. **Solar Energy**, v. 24, n. 6, p. 561–574, 1980.

CHOI, U.; LEE, C. R. Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–9, 2019.

COLLIGNON, P. C. et al. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 8, p. 1087–1093, 2016.

CORREIA, J. H. et al. Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1–16, 2021.

COSTA, D. C. S. et al. Comparative photodynamic inactivation of antibiotic resistant bacteria by first and second generation cationic photosensitizers. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 11, n. 12, p. 1905–1913, 2012.

D'ILARIO, L.; MARTINELLI, A. Toluidine blue: Aggregation properties and structural aspects. **Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering**, v. 14, n. 4, p. 581–595, 2006.

DALBEY, R. E.; WANG, P.; KUHN, A. Assembly of bacterial inner membrane proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, p. 161–187, 2011.

DE MELO, W. DE C. M. A.; PERUSSI, J. R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 331–340, 2012.

DE, S.; DAS, S.; GIRIGOSWAMI, A. Environmental effects on the aggregation of some xanthene dyes used in lasers. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 8, p. 1821–1833, 2005.

DELCANALE, P. et al. Photodynamic action of: Hypericum perforatum hydrophilic extract against Staphylococcus aureus. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 324–331, 2020.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 808–816, 2009.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 245–254, 2004.

DERVICHIAN, D. G. Changes of phase and transformations of higher order in monolayers. **The Journal of Chemical Physics**, v. 7, n. 10, p. 931–948, 1939.

DUGASSA, J.; SHUKURI, N. Review on antibiotic resistance and its mechanism of development. **Journal of Health, Medicine and Nursing**, v. 1, n. 3, p. 1–17, 2017.

EL-BAYOUMI, M. A.; KASHA, M. Energy transfer in hydrogen-bonded N-heterocyclic complexes and their possible role as energy sinks. **The Journal of Chemical Physics**, v. 34, n. 6, p. 2181–2182, 1961.

ESTALAYO-ADRIÁN, S. et al. Water-soluble amphiphilic ruthenium(ii) polypyridyl complexes as potential light-activated therapeutic agents. **Chemical Communications**, v. 56, n. 65, p. 9332–9335, 2020.



ESTEVÃO, B. M. et al. Interaction of eosin and its ester derivatives with aqueous biomimetic micelles: Evaluation of photodynamic potentialities. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 287, p. 30–39, 2014.

ETEBU, E.; ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. **International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research**, v. 4, n. 6, p. 90–101, 2016.

FEKRAZAD, R.; ZARE, H.; VAND, S. M. S. Photodynamic therapy effect on cell growth inhibition induced by radachlorin and toluidine blue O on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: An in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 213–217, 2016.

GAI, S. et al. Recent advances in functional nanomaterials for light-triggered cancer therapy. **Nano Today**, v. 19, p. 146–187, 2018.

GOLDFINE, H. Lipids of prokaryotes–structure and distribution. **Current Topics in Membranes and Transport**, v. 17, n. C, p. 1–43, 1982.

GOLDFINE, H. Bacterial membranes and lipid packing theory. **Journal of Lipid Research**, v. 25, n. 13, p. 1501–1507, 1984.

GRABOWICZ, M. Lipoproteins and their trafficking to the outer membrane. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 2, p. 1–8, 2019.

GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial secretion systems: An overview. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, 2016.

GRENNI, P.; ANCONA, V.; BARRA CARACCILO, A. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 25–39, 2018.

GRUNER, S. M. et al. X-ray diffraction study of the polymorphic behavior of N-methylated dioleoylphosphatidylethanolamine. **Biochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2853–2866, 1988.

HAMBLIN, M. R.; ABRAHAMSE, H. Can light-based approaches overcome antimicrobial resistance? **Drug Development Research**, v. 80, n. 1, p. 48–67, 2019.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436–450, 2004.

HARKINS, W. D.; YOUNG, T. F.; BOYD, E. The thermodynamics of films: Energy and entropy of extension and spreading of insoluble monolayers. **The Journal of Chemical Physics**, v. 8, n. 12, p. 954–965, 1940.

HAYASHI, S.; WU, C. Lipoproteins in bacteria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 22, n. 3, p. 451–471, 1990.

ILANCHELIAN, M.; RETNA RAJ, C.; RAMARAJ, R. Spectral studies on the Cyclodextrin inclusion complexes of toluidine blue O and Meldola's blue in aqueous solution. **Journal of Inclusion Phenomena**, v. 36, n. 1, p. 9–20, 2000.

ISHINAGA, M.; KANAMOTO, R.; KITO, M. Distribution of phospholipid molecular species in outer and cytoplasmic membranes of Escherichia coli. **Journal of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 161–165, 1979.

ITOH, T. Fluorescence and phosphorescence from higher excited states of organic molecules. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 8, p. 4541–4568, 2012.

JASOVSKÝ, D. et al. Antimicrobial resistance: A threat to the world's sustainable development. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 121, n. 3, p. 159–164, 2016.

JOHN DAVISON. Genetic exchange between bacteria in the environment. **Plasmid**, v. 42, p. 73–91, 1999.

JOHNSON, A. G.; GAINES, S.; LANDY, M. Studies on the O antigen of Salmonella typhosa. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 103, n. 2, p. 225–246, 1956.

JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Bacterial resistance: A worldwide problem. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 31, n. 2, p. 379–388, 1998.

JOO, H. S.; FU, C. I.; OTTO, M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1695, 2016.

KAIRYTE, K. et al. Effective inactivation of food pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* by combined treatment of hypericin-based photosensitization and high power pulsed light. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 6, p. 1144–1151, 2012.

KARBASCHI, M. et al. Rheology of interfacial layers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 6, p. 514–519, 2014.

KHAMENEH, B. et al. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 32–42, 2016.

KILLIG, F.; KUNZ, L.; STARK, G. Photomodification of the electrical properties of the plasma membrane: A comparison between 6 different membrane-active photosensitizers. **Journal of Membrane Biology**, v. 181, p. 41–46, 2001.

KIM, K.; LEE, C. S.; NA, K. Light-controlled reactive oxygen species (ROS)-producible polymeric micelles with simultaneous drug-release triggering and endo/lysosomal escape. **Chemical Communications**, v. 52, n. 13, p. 2839–2842, 2016.

KITO, M. et al. A particulate phospholipid synthesizing system from Escherichia coli B. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, n. 5, p. 837–844, 1971.

KITO, M. et al. Differences in fatty acid composition among phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol and cardiolipin of Escherichia coli. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, v. 260, n. 3, p. 475–478, 1972.

KITO, M. et al. Effect of changes in fatty acid composition of phospholipid species on the  $\beta$ -galactoside transport system of Escherichia coli K-12. **BBA - Biomembranes**, v. 298, n. 1, p. 69–74, 1973.

KITO, M. et al. Metabolism of the phosphatidylglycerol molecular species in Escherichia coli. **European Journal of Biochemistry**, v. 54, n. 1, p. 55–63, 1975.

KLAUSEN, M.; UCUNCU, M.; BRADLEY, M. Design of photosensitizing agents for targeted antimicrobial photodynamic therapy. **Molecules**, v. 25, n. 22, 2020.

KNOLL, J. D.; TURRO, C. Control and utilization of ruthenium and rhodium metal complex excited states for photoactivated cancer therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 282–283, p. 110–126, 2015.

KOBAL, M. B. et al. Unveiling the mechanisms underlying photothermal efficiency of gold shell-isolated nanoparticles (AuSHINs) on ductal mammary carcinoma cells (BT-474). **Biophysical Chemistry**, v. 300, p. 107077, 2023.

KOCH, A. L. The biophysics of the Gram-negative periplasmic space. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23–59, 1998.

KURNIAWAN, J. et al. Preparation and characterization of solid-supported lipid bilayers formed by Langmuir-Blodgett deposition: A tutorial. **Langmuir**, v. 34, n. 51, p. 15622–15639, 2018.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, 2018.

LANGEVIN, D. Rheology of adsorbed surfactant monolayers at fluid surfaces. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 46, p. 47–65, 2014.

LEBLANC, R. M. Molecular recognition at Langmuir monolayers. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 529–536, 2006.

LEVIN, I. W. et al. Two types of hydrocarbon chain interdigitation in sphingomyelin bilayers. **Biochemistry**, v. 24, n. 22, p. 6282–6286, 1985.

LI, J. F.; LI, C. Y.; AROCA, R. F. Plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 13, p. 3962–3979, 2017.

LI, X. et al. Trapped lipopolysaccharide and LptD intermediates reveal lipopolysaccharide translocation steps across the *Escherichia coli* outer membrane. **Scientific Reports**, v. 5, n. June, p. 1–8, 2015.

LIANG, H. et al. Optimization of hydrogel containing toluidine blue-O for photodynamic therapy by response surface methodology. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, p. 389–396, 2017.

LILJEBLAD, J. F. D. et al. Phospholipid monolayers probed by vibrational sum frequency spectroscopy: Instability of unsaturated phospholipids. **Biophysical Journal**, v. 98, n. 10, p. L50–L52, 2010.

LIPIDS, A. P. **Escherichia coli extract total**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/avanti/100500p>>. Acesso em: 20 out. 2023.

- MAESTRO, A.; GUTFREUND, P. In situ determination of the structure and composition of Langmuir monolayers at the air/water interface by neutron and X-ray reflectivity and ellipsometry. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 293, p. 102434, 2021.
- MAFÉ, S.; MANZANARES, J. A.; KONTTURI, K. Phospholipid monolayers at water | oil interfaces: Theoretical modelling of surface pressure-molecular area isotherms. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 457, n. 1–2, p. 155–162, 1998.
- MANOS, J. The human microbiome in disease and pathology. **Apmis**, v. 130, n. 12, p. 690–705, 2022.
- MARSH, D. Lateral pressure in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes**, v. 1286, n. 3, p. 183–223, 1996.
- MARTÍNEZ-BALBUENA, L. et al. Applicability of the Gibbs adsorption isotherm to the analysis of experimental surface-tension data for ionic and nonionic surfactants. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 247, p. 178–184, 2017.
- MARTORANA, A. M. et al. Dissecting Escherichia coli outer membrane biogenesis using differential proteomics. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.
- MASADEH, M. M. et al. In vitro determination of the antibiotic susceptibility of biofilm-forming Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus: Possible role of proteolytic activity and membrane lipopolysaccharide. **Infection and Drug Resistance**, 2013.
- MATSUMOTO, K. et al. Lipid domains in bacterial membranes. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1110–1117, 2006.
- MAXFIELD, F. R. Plasma membrane microdomains. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 4, p. 483–487, 2002.
- MIDDLEBROOK, J. L.; DORLAND, R. B. Bacterial toxins: Cellular mechanisms of action. **Microbiological Reviews**, v. 48, n. 3, p. 199–221, 1984.
- MILLER, S. I.; SALAMA, N. R. The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. **PLoS Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2018.
- MISHRA, R. P. N. et al. Vaccines and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 596–602, 2012.

- MOREIRA, L. G. et al. Chain cleavage of bioinspired bacterial membranes photoinduced by eosin decyl ester. **Langmuir**, v. 36, n. 32, p. 9578–9585, 2020.
- MOSLEMI, N. et al. Photodynamic inactivation of *Porphyromonas gingivalis* utilizing radachlorin and toluidine blue-O as photosensitizers: An in vitro study. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 107–112, 2018.
- MOYES, R. B.; REYNOLDS, J.; BREAKWELL, D. P. Differential staining of bacteria: Gram stain. **Current Protocols in Microbiology**, p. 1–8, 2009.
- MURAT, D.; BYRNE, M.; KOMEILI, A. Cell biology of prokaryotic organelles. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 10, p. 1–19, 2010.
- NAVARRE, W. W.; SCHNEEWIND, O. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 1, p. 174–229, 1999.
- NEU, H. C. Changing mechanisms of bacterial resistance. **American Journal of Medicine**, v. 77, p. 11–23, 1984.
- NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 382–388, 1994.
- OLIVEIRA, O. N.; CASELI, L.; ARIGA, K. The past and the future of Langmuir and Langmuir-Blodgett films. **Chemical Reviews**, v. 122, n. 6, p. 6459–6513, 2022.
- PARAY, A. A. et al. Gram staining : A Brief review. **International Journal of Research and Review**, v. 10, n. 9, 2023.
- PEREIRA, L. S. A. et al. Evidence of photoinduced lipid hydroperoxidation in Langmuir monolayers containing eosin Y. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 682–689, 2018.
- PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, 2007.
- PRAJAPATI, J. D.; KLEINEKATHÖFER, U.; WINTERHALTER, M. How to enter a bacterium: Bacterial porins and the permeation of antibiotics. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 9, p. 5158–5192, 2021.

- PULINGAM, T. et al. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170, n. 106103, p. 1–18, 2022.
- RAHMAN, M. T. et al. Zoonotic diseases: Etiology, impact, and control. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1–34, 2020.
- REZENDE, L. G. et al. Assessing photosensitized membrane damage: Available tools and comprehensive mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 98, n. 3, p. 572–590, 2022.
- ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2009.
- RUBIA-PAYÁ, C. et al. UV-Vis Reflection-Absorption Spectroscopy at air-liquid interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 225, p. 134–145, 2015.
- SAFAR SAJADI, S. M.; KHOEE, S. The simultaneous role of porphyrins' H- and J- aggregates and host–guest chemistry on the fabrication of reversible Dextran-PMMA polymersome. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2021.
- SAKAI, T.; MORIMOTO, Y. The history of infectious diseases and medicine. **Pathogens**, v. 11, p. 1–12, 2022.
- SALTON, M. R. J.; OWEN, P. Bacterial membrane structure. **Annual Review of Microbiology**, v. 30, p. 451–482, 1976.
- SANDRINO, B. et al. Challenges in application of Langmuir monolayer studies to determine the mechanisms of bactericidal activity of ruthenium complexes. **Langmuir**, v. 33, n. 49, p. 14167–14174, 2017.
- SCHIRMER, T. General and specific porins from bacterial outer membranes. **Journal of Structural Biology**, v. 121, n. 2, p. 101–109, 1998.
- SCHULZ, G. E. The structure of bacterial outer membrane proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1565, n. 2, p. 308–317, 2002.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 605–619, 2015.

SEAL, B. S. et al. Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 14, n. 1, p. 78–87, 2013.

SENNATO, S. et al. Evidence of domain formation in cardiolipin-glycerophospholipid mixed monolayers. A thermodynamic and AFM study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 33, p. 15950–15957, 2005.

SHIGEO, A. et al. Changes in positional distribution of fatty acids in the phospholipids of *Escherichia coli* after shift-down in temperature. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, v. 270, n. 3, p. 301–306, 1972.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbour Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. 1–17, 2010.

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 31–39, 2000.

SNYDER, D. S.; MCINTOSH, T. J. The lipopolysaccharide barrier: Correlation of antibiotic susceptibility with antibiotic permeability and fluorescent probe binding kinetics. **Biochemistry**, v. 39, n. 38, p. 11777–11787, 2000.

SOHLENKAMP, C.; GEIGER, O. Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 1, p. 133–159, 2015.

SPERANDIO, F.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 108–120, 1 jul. 2013.

STOKES, J. M. et al. Pentamidine sensitizes Gram-negative pathogens to antibiotics and overcomes acquired colistin resistance. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 1–21, 2017.

STOTTRUP, B. L.; NGUYEN, A. H.; TÜZEL, E. Taking another look with fluorescence microscopy: Image processing techniques in Langmuir monolayers for the twenty-first century. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 7, p. 1289–1300, 2010.



- SUBRAMANIAN, S.; KEARNS, D. B. Functional regulators of bacterial flagella. **Annual Review of Microbiology**, v. 73, p. 225–246, 2019.
- SULIS, G.; SAYOOD, S.; GANDRA, S. Antimicrobial resistance in low- and middle-income countries: current status and future directions. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 20, n. 2, p. 147–160, 2022.
- SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 2, p. 254–267, 2014.
- SUNDIN, G. W. et al. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 9, p. 1506–1518, 2016.
- SURADKAR, Y. R.; BHAGWAT, S. S. CMC determination of an odd carbon chain surfactant (C13E20) mixed with other surfactants using a spectrophotometric technique. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 51, n. 6, p. 2026–2031, 2006.
- THORN, J. The inflammatory response in humans after inhalation. **Inflammation Research**, v. 50, n. 5, p. 254–261, 2001.
- TIAN, J. et al. A pH-activatable and aniline-substituted photosensitizer for near-infrared cancer theranostics. **Chemical Science**, v. 6, n. 10, p. 5969–5977, 2015.
- TOPALOGLU, N.; GULSOY, M.; YUKSEL, S. Antimicrobial photodynamic therapy of resistant bacterial strains by indocyanine green and 809-nm diode laser. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 4, p. 155–162, 2013.
- TULKENS, P. M. Intracellular distribution and activity of antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p. 100–106, 1991.
- TYPAS, A. et al. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 123–136, 2012.
- VALENZENO, D. P. Photohemolytic lesions: Stoichiometry of creation by phloxine B. **Photochemistry and Photobiology**, v. 40, n. 6, p. 681–688, 1984.

VALENZENO, D. P.; POOLER, J. P. Cell membrane photomodification: Relative effectiveness of halogenated fluoresceins for photohemolysis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 35, n. 3, p. 343–350, 1982.

VALENZENO, D. P.; TARR, M. Membrane photomodification of cardiac myocytes: Potassium and leakage currents. **Photochemistry and Photobiology**, v. 53, n. 2, p. 195–201, 1991.

VAN DEN BERG, W. A. M.; HAGEN, W. R.; VAN DONGEN, W. M. A. M. The hybrid-cluster protein ('prismane protein') from *Escherichia coli*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 3, p. 666–676, 2000.

VAN GINKEL, G. et al. Impact of oxidized lipids and antioxidants, such as vitamin E and lazaroids, on the structure and dynamics of unsaturated membranes. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 88, n. 13, p. 1901–1912, 1992.

VANOUNOU, S.; PAROLA, A. H.; FISHOV, I. Phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol are segregated into different domains in bacterial membrane. A study with pyrene-labelled phospholipids. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1067–1079, 2003.

VOLLHARDT, D. Brewster angle microscopy: A preferential method for mesoscopic characterization of monolayers at the air/water interface. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 3, p. 183–197, 2014.

VOLLMER, W.; BLANOT, D.; DE PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 149–167, 2008.

VOLPATI, D. et al. Vibrational spectroscopy for probing molecular-level interactions in organic films mimicking biointerfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 207, n. 1, p. 199–215, 2014.

VOLPE, C. DELLA; SIBONI, S. The Wilhelmy method: A critical and practical review. **Surface Innovations**, v. 6, n. 3, p. 120–132, 2018.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 9–11, 2003.

WELZEL, P. B.; WEIS, I.; SCHWARZ, G. Sources of error in Langmuir trough measurements Wilhelmy plate effects and surface curvature. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 144, n. 1–3, p. 229–234, 1998.

WONG-EKKABUT, J. et al. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: A molecular dynamics study. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 12, p. 4225–4236, 2007.

YUNOKI, T.; KIMURA, Y.; FUJIMORI, A. Maintenance properties of enzyme molecule stereostructure at high temperature by adsorption on organo-modified magnetic nanoparticle layer template. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 92, n. 10, p. 1662–1671, 2019.

ZHANG, G.; MEREDITH, T. C.; KAHNE, D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 779–785, 2013.