UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

KAREN JOCHELAVICIUS

Efeito da foto-ativação da curcumina e do azul de metileno em monocamadas de lipídios
bacterianos

São Carlos
2018

KAREN JOCHELAVICIUS

Efeito da foto-ativação da curcumina e do azul de metileno em monocamadas de lipídios
bacterianos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestra em Ciências

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de
Oliveira Junior

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2018

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

Jochelavicius, Karen

Efeito da foto-ativação da curcumina e do azul de metileno em monocamadas de lipídios bacterianos / Karen Jochelavicius; orientador Osvaldo Novais de Oliveira Junior - versão corrigida -- São Carlos, 2018.

67 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Inativação fotodinâmica. 2. Membranas bacterianas. 3. Filmes de Langmuir. 4. Filmes Langmuir-Blodgett. I. Oliveira Junior, Osvaldo Novais de , orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Thaty, que desde 2010 é mais do que uma orientadora ou co-orientadora, me ajudando em cada novo passo dessa jornada acadêmica, e se fazendo presente mesmo dos EUA. Depois dela, não poderia deixar de agradecer ao meu orientador nesse trabalho de mestrado, Chu, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com ele, por todo o apoio nesses dois anos, e por revisar meus textos na época das festas de fim de ano, numa velocidade surpreendente. Também gostaria de agradecer à prof^a. Carla da Unesp Araraquara, por conceder gentilmente os fotossensibilizadores, e ao prof. Chico Guimarães pelas medidas de confocal. Aos técnicos Bruno, e, em especial, Debora, que trabalha mais diretamente com a sala-limpa, e atende aos meus pedidos de ajuda, e às secretárias, Si e Rô, do grupo também deixo o meu obrigada. Agradeço também à Neusa da biblioteca, pela ajuda na formatação do texto. Por fim, gostaria de agradecer ao CNPq pelo apoio financeiro.

Gostaria também de agradecer à minha família, por ter me apoiado sempre, em todos os momentos da minha vida; ao Bruno, não apenas pelo apoio moral e pelo companheirismo, mas também por ter participado ativamente na formatação do meu texto; à Lê e à Paulinha pelos almoços no bandeirão que rendem muito; ao Foca, Deborah Totty, Gabriel e Ciro por rolês, conversas, desabafos, etc; aos AdS por todas as edições dos eventos que eu pude ir sem dar migué, tardes de jogos, turbos, e todas as atividades promovidas; ao GTPsi; ao grupo de polímeros; ao coral; aos meus professores e colegas da dança e do funcional/pilates; ao grupo de forró; à minha psicóloga; ao pessoal da sinagoga; às amigas de Pinda Lary e Amanda; ao pessoal da Glowlies, e a todos que participaram de alguma forma desse processo, seja ajudando, apoiando, me acolhendo em São Carlos, ou me proporcionando bons momentos!

RESUMO

JOHELAVICIUS, K. Efeito da foto-ativação da curcumina e do azul de metileno em monocamadas de lipídios bacterianos. 2018. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

O crescente número de bactérias resistentes é devido principalmente ao número limitado de modos de ação dos antibióticos, contra os quais bactérias criam mecanismo de resistência. Há, portanto, necessidade de terapias com espectro de ação mais amplo, atingindo diferentes alvos moleculares. A inativação fotodinâmica (IFD) pode ser uma dessas terapias, pois baseia-se na geração de espécies reativas que atacam diversas moléculas, e não um alvo específico. Fotossensibilizadores (FSs) absorvem luz em comprimento de onda específico e a energia absorvida pode ser transferida a um oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). Tais espécies são altamente citotóxicas e produzem reações de oxidação que levam à morte celular. Um dos alvos das EROs são fosfolipídios insaturados das membranas biológicas. O objetivo desta dissertação é investigar a interação dos FSs curcumina e azul de metileno com fosfolipídios e o efeito da foto-ativação desses FSs em um mimético de membrana bacteriana. Para tanto, foram usados filmes de Langmuir do extrato lipídico de *Escherichia coli* e dos lipídios sintéticos isolados DOPE, POPG e cardiolipina. As isotermas de pressão com o extrato de *E. coli* indicam interação entre os FSs e os lipídios do filme, aumentando a área ocupada. A irradiação do filme na presença de curcumina aumenta sua estabilidade, o que sugere formação de hidroperóxidos de lipídio, mais hidrofílicos, pela ação do oxigênio singlete. Nos filmes dos lipídios isolados só a curcumina é incorporada, havendo aumento na área ocupada pelo filme, e redução no potencial de superfície. Nenhum efeito decorrente da irradiação desses filmes foi detectado. Um filme Langmuir-Blodgett (LB) de extrato de *E. coli* com curcumina foi submetido a quatro ciclos de fotoclareamento seguido de recuperação da fluorescência visualizados num microscópio confocal. A intensidade da fluorescência aumentou após o primeiro ciclo, indicativo de mudança conformacional para alocar maior quantidade de curcumina, o que corrobora a hipótese da formação de hidroperóxidos.

Palavras-chave: Inativação fotodinâmica. Membranas bacterianas. Filmes de Langmuir. Filmes Langmuir-Blodgett.

ABSTRACT

JOHELAVICIUS, K. **Photoactivation of curcumin and methylene blue in bacterial lipids monolayers**. 218. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The growing number of resistant bacteria is mainly due to the limited number of modes of action of antibiotics, against which bacteria create resistance. There is, therefore, a need for therapies with broader action spectrum, reaching different molecular targets. Photodynamic inactivation (PDI) may be one of these therapies, because it is based on the generation of reactive species that attack several molecules, not a specific target. Photosensitizers (FSs) absorb light at a specific wavelength and the absorbed energy can be transferred to a molecular oxygen, generating reactive oxygen species (ROS). Such species are highly cytotoxic and produce oxidation reactions that lead to cell death. One of the targets of ROS are unsaturated phospholipids from biological membranes. The objective of this dissertation is to investigate the interaction of the FSs curcumin and methylene blue with phospholipids and the effect of photoactivation of these FSs on a bacterial membrane mimetic. For this purpose, Langmuir films of the lipid extract of *Escherichia coli* and the synthetic lipids DOPE, POPG and cardiolipin were used. The surface pressure isotherms with the *E. coli* extract indicate interaction between the FSs and the lipids of the film, increasing the occupied area. The irradiation of the film in the presence of curcumin increases its stability, which suggests the formation of more hydrophilic lipid hydroperoxides by the action of singlet oxygen. In the synthetic lipid films only curcumin is incorporated, with increase in the area occupied by the film, and reduction in surface potential. No effect from irradiation of these films was detected. A Langmuir-Blodgett (LB) film of *E. coli* extract with curcumin was submitted to four cycles of photobleaching followed by fluorescence recovery visualized in a confocal microscope. The intensity of the fluorescence increased after the first cycle, indicative of conformational change to allocate a larger amount of curcumin, which corroborates the hypothesis of hydroperoxide formation.

Keywords: Photodynamic inactivation. Bacterial membranes. Langmuir film. Langmuir-Blodgett film.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Parede celular de bactérias: (a) Gram-positivas, mostrando os ácidos teicóicos (lipoteicóico e de parede) e as camadas de peptideoglicano, e (b) Gram-negativas, composta pela ME (composta principalmente por LPS), periplasma (onde se encontra uma camada de peptideoglicano) e MI (a membrana plasmática).....	20
Figura 2 – Exemplos de curvas isotermas de $\pi \times A$ de um ácido graxo, com uma cadeia de hidrocarboneto, e de um fosfolipídio, com dois.	22
Figura 3 – Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett e os diferentes tipos de LB.	23
Figura 4 – Mecanismo de ação da TFD. A produção de EROs, após a fotoativação do FS, é dada por duas rotas distintas: tipos 1 e 2.....	24
Figura 5 – Reação eno entre o oxigênio singleto e a dupla ligação de uma cadeia de hidrocarboneto de um lipídio, localizada entre os carbonos 9 e 10. Com a formação do hidropéroxido, a ligação é movida para um carbono adjacente.....	25
Figura 6 - Estrutura dos fotossensibilizadores: (a) azul de metileno e (b) curcumina, na sua forma enólica.....	26
Figura 7 – Funcionamento do pinhole, eliminando a luz fora de foco (representada pelas linhas em laranja claro), num microscópio confocal.	26
Figura 8 – Representação esquemática de um microscópio confocal de varredura a laser, com o raio emitido pelo laser representado em azul, e o emitido pela amostra depois de excitada, em verde.	27
Figura 9 – Estrutura molecular dos lipídios sintéticos: (a) DOPE; (b) POPG; (c) 18:1 CL, (d) DMPA, (e) 06:0-06:0 NBD PC, (f) DPPG e (g) DPPE.....	30
Figura 10 – Cuba KSV minitrough equipada com as provas de Wilhelmy (para medida da pressão superficial) e de Kelvin (para medida do potencial de superfície). É possível notar o pano preto cobrindo o box.....	31
Figura 11 – Sensor de Wilhelmy parcialmente imerso na água.	33
Figura 12 – Representação do sensor de potencial de superfície da KSV NIMA.....	34
Figura 13 – Fotografia da cuba KSV minitrough com os LEDs azul (a) e vermelho (b) posicionados para a irradiação da monocamada.	36
Figura 14– Isotermas de $\pi \times A$ de extrato lipídico de <i>E. coli</i> em subfases de PBS puro e PBS com 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina, em três tempos de espera diferentes: 30 min (a), 1 h (b) e 2 h (c). Em (d), tem-se a superposição dessas curvas, na presença de curcumina. Em todos os gráficos a curva em subfase de PBS, para o tempo de espera de 10 min (para evaporação do solvente), é	

plotada. Nota-se que a pressão é plotada em função da área por mg de lipídio, pois não é conhecida sua massa molar.	39
Figura 15 – Isotermas de $\pi \times A$ de extrato lipídico de <i>E. coli</i> em subfases de PBS puro e PBS com 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de azul de metileno (AM), em três tempos de espera diferentes: 30 min (a), 1 h (b) e 2 h (c). Em (d), tem-se a superposição dessas curvas, na presença de AM. Em todos os gráficos a curva em subfase de PBS, para o tempo de espera de 10 min (para evaporação do solvente) é plotada.	40
Figura 16 – (a) Isoterma de $\pi \times A$ e (b) módulo da compressibilidade em função da pressão superficial para o extrato de <i>E. coli</i>	41
Figura 17 – (a) Isoterma de $\pi \times A$ e imagens de BAM e (b) módulo da compressibilidade para o extrato de <i>E. coli</i> (em vermelho) em subfase aquosa. As demais curvas de C_s^{-1} fogem ao interesse deste trabalho.	41
Figura 18 – (a) Variação da área relativa (A/A_0) em filmes de Langmuir do extrato lipídico de <i>E. coli</i> sem e com curcumina, irradiado por um LED azul por 30 s ou não, mantidos em uma pressão de 30 mN/m. A_0 é a área na qual essa pressão foi atingida. (b) Curva do aumento relativo de área entre as curvas com curcumina irradiada e não irradiada, mostradas em (a).	43
Figura 19 – Isotermas de $\pi \times A$ do DOPE e do DPPE em subfase de PBS.	45
Figura 20 – Isotermas de $\pi \times A$ do DOPE (traço pontilhado) em D_2O (a) e em PBS (b). As demais curvas não são de interesse para comparação neste trabalho.	45
Figura 21 – Módulo da compressibilidade em função da pressão superficial dos filmes de DOPE, DPPE e extrato de <i>E. coli</i>	46
Figura 22 – Módulos de compressibilidade para o DPPE e o DOPE. As demais curvas não são de interesse direto para comparação com este trabalho.	46
Figura 23 – Módulo de compressibilidade para o DPPE em água (1). As demais curvas não são de interesse para comparação com este trabalho.	47
Figura 24 – Isotermas de $\pi \times A$ do DOPE em subfases com ou sem curcumina, em várias concentrações, sendo irradiada ou não com o LED azul, por 10 min.	47
Figura 25 – Isotermas de potencial de superfície para os filmes de DOPE com ou sem curcumina, em várias concentrações, sendo irradiada ou não com o LED azul, por 10 min. (a) 0,25 μM de curcumina; (b) 0,5 μM de curcumina; (c) 2,5 μM de curcumina e (d) 5 μM de curcumina.	48
Figura 26 – Potencial de superfície em função do tempo dos filmes de DOPE com ou sem curcumina, em várias concentrações, sendo irradiada ou não com o LED azul, por 10 min. (a) 0,25 μM de curcumina; (b) 0,5 μM de curcumina; (c) 2,5 μM de curcumina; (d) 5 μM de curcumina e (e) combinação de todas as curvas. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min.	49

Figura 27 – Isotermas de potencial vs área (a) e potencial vs tempo (b) para DOPE em subfase de PBS puro ou com 5 $\mu\text{mol/L}$ de azul de metileno, irradiado ou não. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min.....	51
Figura 28 – Isoterma de $\pi \times A$ (a) e módulo de compressibilidade (b) do POPG, em PBS.....	52
Figura 29 – Isotermas de $\pi \times A$ (a) e módulo de compressibilidade (b) do DPPG e do POPG encontradas na literatura. As demais curvas fogem ao interesse deste trabalho.....	52
Figura 30 – Isotermas de $\pi \times A$ do POPG em subfase de PBS puro ou com 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina, irradiada ou não.	53
Figura 31 – Potenciais de superfície em função da área (a) e do tempo (b) do POPG em subfase de PBS puro ou com 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina, irradiada ou não. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min.	53
Figura 32 – Potenciais de superfície em função da área (a) e do tempo (b) do POPG em subfase de PBS puro ou com 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de azul de metileno, irradiado ou não. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min.....	54
Figura 33 - Isoterma de $\pi \times A$ (a) e módulo de compressibilidade (b) da CL, em PBS.	54
Figura 34 – Isotermas de $\pi \times A$ (CL) em subfase de PBS puro ou com 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina, irradiada ou não.	55
Figura 35 - Potenciais de superfície em função da área (a) e do tempo (b) da cardiolipina (CL) em subfase de PBS puro ou com 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina, irradiada ou não. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min.	55
Figura 36 – Potenciais de superfície em função da área (a) e do tempo (b) da cardiolipina (CL) em subfase de PBS puro ou com 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de azul de metileno, irradiado ou não. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min.....	56
Figura 37 - Imagem do final do filme LB com curcumina. A região circulada em vermelho mostra o filme com curcumina, a região em verde mostra a borda do filme, e a em azul (sem emissão) mostra o substrato sem filme.	57
Figura 38 – Imagens de microscopia confocal do filme LB com curcumina, com a gota antes (a) e depois de seca (b).....	58
Figura 39 – Imagem de microscopia confocal da superfície do filme na gota antes (a) e depois (b) do fotoclareamento. Ele foi realizado na região marcada com um quadrado vermelho. A região circulada em verde foi usada como controle.....	58

Figura 40 – Gráfico da intensidade fluorescência (u.a.) por tempo, dado quatro ciclos de fotoclareamento (região 1). A região 2 foi usada como controle.....59

LISTA DE SIGLAS

AM - azul de metileno

CL - cardiolipina

DMPA - ácido dimiristoilfosfatídico (1,2- ditetradecanoil-sn-glicero-3-fosfato)

DOPE - 1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

DPPE - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

DPPG - 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glycerol)

EROs - espécies reativas de oxigênio

FRAP - *Fluorescence recover after photobleaching*

FS - fotossensibilizador

IFD - inativação fotodinâmica

LB - Langmuir-Blodgett

LC - líquido-condensada

LE - líquido-expandida

LPS - lipopolissacarídeo

ME - membrana externa

MI - membrana interna

POPG - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)

TFD - terapia fotodinâmica

Sumário

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1.1	CLASSIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS	19
1.1.1	Bactérias Gram-negativas	19
1.1.2	Bactérias Gram-positivas	20
1.2	SISTEMAS MIMÉTICOS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS.....	20
1.3	FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR-BLODGETT (LB)	21
1.4	MECANISMO DE AÇÃO DA TFD	23
1.5	OS FOTOSSENSIBILIZADORES	25
1.6	MICROSCOPIA CONFOCAL.....	26
1.6.1	Recuperação de fluorescência depois de <i>photobleaching</i> (FRAP)	27
2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	29
2.1	REAGENTES	29
2.2	FILMES DE LANGMUIR	30
2.2.1	Técnicas de caracterização.....	32
2.2.2	Irradiação de luz <i>in situ</i>	35
2.3	FILMES LB	36
2.4	MICROSCOPIA CONFOCAL.....	37
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1	FILMES DE LANGMUIR DO EXTRATO LIPÍDICO DE E. COLI	39
3.1.1	Irradiação do filme na presença de curcumina.....	42
3.2	FILMES DE LANGMUIR DOS LIPÍDIOS ISOLADOS	44
3.2.1	DOPE	44
3.2.2	POPG	51
3.2.3	Cardiolipina.....	54
3.3	MICROSCOPIA CONFOCAL.....	56
4	CONCLUSÕES	61
	<u>REFERÊNCIAS</u>	63

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A resistência microbiana é uma ameaça global, e a necessidade de se desenvolverem novas terapias é premente. No século XX, a descoberta dos antibióticos revolucionou o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias, que dizimavam a população mundial. (1-2) Contudo, o rápido aparecimento de cepas resistentes tem provocado uma crise no uso de antibióticos. Seu modo de ação único (cada antibiótico ataca um alvo molecular específico) (3) e a velocidade de replicação bacteriana, com alta taxa de mutação e possibilidade de troca de material genético entre bactérias por meio do plasmídeo, são fatores que determinam o surgimento da resistência. Além disso, ele é intensificado pela prescrição inapropriada de antibióticos, pelo término precoce do tratamento por alguns pacientes e pelo uso generalizado na pecuária. (4) De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que na Europa o número de mortes devido a infecções hospitalares por bactérias resistentes exceda 25.000 por ano. (5)

Há crescente necessidade por terapias antimicrobianas com espectro de ação mais amplo, sendo efetivas tanto contra bactérias Gram-positivas como Gram-negativas. Nesse âmbito, a terapia fotodinâmica (TFD), ou inativação fotodinâmica (IFD, termo mais usado para microrganismos), tem recebido destaque. Ela não só age contra bactérias, mas também contra fungos, vírus e protozoários, o que a torna interessante para tratar infecções emergentes ou de difícil diagnóstico. (3) É importante ressaltar que ela também age contra células humanas, sendo útil, por exemplo, no tratamento de câncer. Dessa forma, a seletividade e a toxicidade na ausência de luz de agentes fotoantimicrobianos devem ser consideradas. O primeiro passo para o tratamento pela IFD é encontrar um fotossensibilizador (FS) adequado para a aplicação desejada. O fotossensibilizador é uma molécula capaz de absorver energia luminosa, passando para um estado excitado, e transferi-la para um oxigênio molecular. Além da toxicidade na ausência de luz e da seletividade já citadas, a especificidade, a foto-eficiência antimicrobiana, os alvos moleculares onde agem e a mutagenicidade devem ser estudados para a escolha da molécula ideal. Uma dificuldade para essa escolha é que pouco ainda se sabe sobre os mecanismos moleculares que levam à morte bacteriana pela IFD. (6-7)

Sabe-se que a eficácia de um FS é diferente para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido à diferença morfológica entre suas paredes celulares. A parede de Gram-positivas é mais porosa, e, por isso, mais permeável (uma descrição mais detalhada da parede celular bacteriana é feita a seguir). (7) Logo abaixo da parede celular, encontra-se a

membrana plasmática, formada por fosfolipídios e proteínas, que podem ser oxidados. Além de fosfolipídios insaturados e alguns aminoácidos, bases nitrogenadas também são passíveis de oxidação. (8) Ainda não há um consenso sobre qual molécula é mais relevante para a ação da TFD, porém isso varia para cada FS, e há mais de um alvo molecular, geralmente. De qualquer forma, a membrana é uma barreira protetora da célula. Seja apenas como meio que se deve permear para infiltrar até o citoplasma, ou como meio em que as alterações moleculares ocasionadas pela oxidação contribuam para a morte celular, ela é importante na TFD.

O DNA é passível de oxidação por oxigênio singlete e é vital para a célula, o que motivou a hipótese de que seria alvo principal para a IFD. Porém, Awad e colaboradores (6) obtiveram resultados conflitantes com essa hipótese em seus estudos de alvos moleculares da TFD antimicrobiana, usando *Escherichia coli* como modelo de bactéria Gram-negativa e Zn porfirinas catiônicas com diferentes lipofilicidades como FSs. O análogo lipofílico (ZnTnHex-2-PyP), quando fotoativado, causou vazamento de metabólitos logo no início do processo, ao contrário do análogo hidrofílico (ZnTM-2-PyP). Devido à maior lipofilicidade, o primeiro acumula muito melhor na membrana. Além da ruptura, proteínas ligadas à membrana também sofreram oxidação, o que gera inativação de complexos respiratórios. Por fim, enzimas citosólicas foram inativadas. Os autores concluíram que a perda da viabilidade está associada com a perda da função de barreira protetora da membrana plasmática e a inativação de complexos respiratórios e enzimas metabólicas, mas não com um dano significativo ao DNA. Como a penetração dos FSs foi considerada crucial para sua ação, FSs anfífilos e catiônicos são mais interessantes para a IFD.

Vários estudos abordam a efetividade da IFD antimicrobiana *in vitro*, com diferentes espécies de bactérias e FSs. Porém, poucos utilizam modelos de membrana a fim de avaliar a ação da TFD no âmbito da interação entre fotossensibilizador (FS) e lipídios. Dentre eles, apenas dois são específicos para membranas bacterianas, utilizando-se de bicamadas lipídicas. (9-10) Há dois trabalhos com monocamadas lipídicas (11-12), e um deles realiza a fotoativação do FS através da irradiação da monocamada. (11)

Neste trabalho foi estudada a interação da curcumina e do azul de metileno com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de lipídios isolados e do extrato lipídico de *Escherichia coli*, com e sem fotoativação. A seguir será apresentada uma introdução teórica das técnicas utilizadas e dos tópicos relevantes para este trabalho.

1.1 CLASSIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

As bactérias são seres unicelulares durante cuja evolução desenvolveram um envelope celular sofisticado e complexo, de forma a garantir proteção e sobrevivência. Esse envelope também permite passagem seletiva de nutrientes do meio externo para o meio interno, e de dejetos, no sentido contrário. O envelope celular é distinto nas diferentes espécies de bactérias, mas há um conjunto de características estruturais fundamentais que as divide em dois grandes grupos: Gram-positivo e Gram-negativo. As bactérias Gram-positivas retêm o corante desenvolvido por Christian Gram (daí o nome dos grupos), diferentemente das Gram-negativas, que não o retêm. (13)

1.1.1 Bactérias Gram-negativas

As bactérias Gram-negativas são envolvidas por duas membranas: a membrana interna (MI) e a membrana externa (ME). Entre elas se encontra um fluido semelhante a um gel, denominado periplasma, que contém uma camada fina da parede celular de peptidoglicana, como mostra a Figura 1(b). O periplasma possui alta concentração de enzimas de degradação e proteínas de transporte. A MI, também chamada de membrana plasmática, é formada por uma bicamada fosfolipídica que envolve o protoplasma. A ME é também uma bicamada, com fosfolipídios na camada interna, juntamente com lipoproteínas. A camada externa é composta principalmente por lipopolissacarídeos (LPS).

A função da ME é de barreira protetora, sendo essencial à sobrevivência de *E. coli*, por exemplo. Bactérias Gram-negativas são mais resistentes a antibióticos, como as *Pseudomonas sp.* (13-14), justamente pela presença de tal barreira. Para a passagem de nutrientes, há proteínas de membrana que formam canais, as porinas. O LPS é composto pelo lipídio A, um cerne polissacarídico, e o polissacarídeo O (Figura 1 (b)). O lipídio A atua como endotoxina, após a morte de bactérias Gram-negativas, e é a causa de sintomas como febre e formação de coágulos sanguíneos. O cerne polissacarídico confere estabilidade à estruturação da membrana. O polissacarídeo O, voltado para a porção externa da ME, é usado para o reconhecimento molecular, atuando como antígeno. (15)

1.1.2 Bactérias Gram-positivas

Nas bactérias Gram-positivas não existe a ME, como mostra a Figura 1(a). Para proteger a célula e suportar a pressão exercida pela membrana plasmática, há várias camadas de peptideoglicana, ao invés de uma como nas bactérias Gram-negativas. No envelope celular há ácidos teicóicos, formados por um álcool (glicerol, glicosil ou ribitol, por exemplo) e fosfato. Eles representam mais de 60 % da massa do envelope celular, sendo os maiores responsáveis por sua estrutura e função. Os ácidos lipoteicóicos atravessam a camada de peptideoglicana e se ligam à membrana plasmática, enquanto os ácidos teicóicos da parede se ligam apenas à camada de peptideoglicana. Devido aos grupos fosfato, eles têm carga negativa e podem se ligar e regular o movimento de cátions pela parede, para os meios intra ou extracelular. Eles também são responsáveis por boa parte da especificidade gênica do envelope celular, possibilitando a identificação de bactérias Gram-positivas por testes laboratoriais. (13-15)

Figura 1 – Parede celular de bactérias: (a) Gram-positivas, mostrando os ácidos teicóicos (lipoteicóico e de parede) e as camadas de peptideoglicano, e (b) Gram-negativas, composta pela ME (composta principalmente por LPS), periplasma (onde se encontra uma camada de peptideoglicano) e MI (a membrana plasmática).

Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE (15)

1.2 SISTEMAS MIMÉTICOS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

A membrana biológica envolve o conteúdo de uma célula, provendo forma, tamanho e microambientes específicos. É formada por uma bicamada lipídica, que contém principalmente fosfolípidios, glicolípidios e proteínas, num modelo conhecido como mosaico fluido. (15-16) Além disso, tem a função de conectar os meios intra e extracelular,

viabilizando e controlando a passagem de solutos e moléculas de um meio para outro. Diversos eventos ocorrem na ou são mediados pela membrana, incluindo reconhecimento molecular, fusão, endocitose, exocitose, interação intercelular, excitabilidade, translocação, transporte e osmose. (17)

A físico-química de membranas miméticas é relevante para estudar tais eventos. Modelos de membrana são incapazes de reproduzir toda sua complexidade. Entretanto, podem simular processos mediados pela membrana em sistemas relativamente simples, de forma útil, focando no entendimento de um evento específico dentre os muitos que ocorrem. (17) Micelas aquosas e reversas, microemulsões, monocamadas (filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett), filmes negros de lipídios, lipossomos e vesículas são exemplos de modelos de membrana utilizados. (17-18)

1.3 FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR-BLODGETT (LB)

Moléculas anfifílicas possuem uma porção polar e outra apolar, o que lhes confere a propriedade de formar filmes na interface gás-líquido, conhecidos como filmes de Langmuir. Levam o nome de Irving Langmuir, que estudou as propriedades moleculares desses filmes, recebendo o prêmio Nobel em Química em 1932. A formação desses filmes (de óleo sobre a superfície da água) foi primeiramente descrita pelos babilônios, entre 1894-1595 a.C. (19) No século XVIII, Benjamin Franklin observou o efeito “calmante” do óleo sobre o mar, e fez algumas investigações sobre isso em 1774. A espessura da camada de óleo foi medida por Lord Rayleigh (1842 - 1919), dividindo o volume espalhado pela área ocupada. Hoje é sabido que tal valor corresponde ao comprimento da molécula utilizada. Antes de Langmuir, um destaque deve ser dado a Agnes Pokels (1862 - 1935), que criou um protótipo bastante próximo do que hoje é conhecida como cuba de Langmuir. Era possível comprimir as moléculas de óleo na superfície da água por barreiras, e também medir a tensão superficial da água. (20)

As moléculas de um fosfolipídio se orientam na superfície do líquido, formando uma monocamada, de forma que a cabeça polar fique em contato com o líquido (aquoso) e a cauda apolar com o gás (geralmente o ar). Daí o nome: monocamadas de Langmuir. Para sua formação, é necessário espalhar o fosfolipídio diluído em solvente volátil e insolúvel em água sobre a superfície do líquido. O líquido está contido em uma cuba de Teflon (ou outro material inerte), com barreiras móveis que aumentam ou diminuem a área ocupada pelo filme.

É medida a pressão superficial do filme em função da área ocupada por molécula ($\pi x A$), geralmente pelo método de Wilhelmy, descrito na seção 2.2.1.1. A pressão é dada pela diferença entre a tensão superficial do líquido sem (γ_0) e com o filme (γ) na superfície do líquido (18):

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

Uma curva de $\pi x A$ depende da temperatura, e portanto é feita sob temperatura constante, sendo denominada de isoterma de pressão, esquematizada na Figura 2. Inicialmente, com uma área suficiente, as moléculas estão dispersas e não interagem entre si, ao que se denomina fase gasosa (G). Com a redução da área, as moléculas se aproximam, e começam a interagir, formando as fases líquida (L) e, depois, sólida (S). Alguns fosfolipídios não atingem a fase sólida, mas têm sua fase líquida dividida entre líquido-expandida (LE) e líquido-condensada (LC). Reduzindo ainda mais a área disponível, ao atingir uma pressão máxima (característica de cada filme), a monocamada colapsará, quebrando-se em estruturas tridimensionais. (22)

Este modelo reproduz metade de uma membrana, que é composta por uma bicamada lipídica, não sendo possível observar eventos transmembrana. No entanto, tal modelo possui a vantagem de que a densidade e a composição lipídica podem ser alteradas. (21) Além disso, os experimentos são realizados em meio aquoso, que é relevante biologicamente, e é possível controlar propriedades físico-químicas do filme e do meio, tais como pressão superficial, temperatura, pH e área por molécula disponível. Outra vantagem é que pequenas quantidades de produtos, muitas vezes caros, são necessárias. (23)

Figura 2 – Exemplos de curvas isotermas de $\pi x A$ de um ácido graxo, com uma cadeia de hidrocarboneto, e de um fosfolipídio, com dois.

Fonte: Adaptada de BIOLIN SCIENTIFIC (22)

O filme de Langmuir pode ser transferido para um substrato sólido, formando um filme LB. Langmuir já havia sugerido a possibilidade de transferência, mas quem realizou os experimentos foi Katherine Blodgett (1898 - 1979). Há diferentes tipos de deposição de filmes LB (representados na Figura 3), produzidos através da imersão e retirada, verticalmente, de um substrato sólido. (20) Esse processo pode ser repetido para formar mais de uma camada, porém o número de camadas possíveis vai depender do grau de organização do filme, relacionado ao empacotamento das cadeias alifáticas dos fosfolipídios. A formação de filmes LB de fosfolipídios com insaturações, por exemplo, é dificultada devido ao menor grau de empacotamento das cadeias insaturadas. Uma estratégia para contornar esse problema é depositar uma primeira camada de um outro fosfolipídio, mais ordenado. Por exemplo, pode-se depositar uma camada de DMPA com acetato de zinco na subfase. Os íons Zn^{2+} interagem com a cabeça polar dos lipídios, facilitando a aproximação das moléculas destes. Assim, as caudas ficam mais condensadas e ordenadas, facilitando a deposição do filme. (24)

Figura 3 – Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett e os diferentes tipos de LB.

Fonte: PAVINATTO (18)

1.4 MECANISMO DE AÇÃO DA TFD

A TFD inicia-se uma vez que a molécula de FS passa para um estado eletrônico excitado através da absorção de luz. Do estado singlete excitado, ela pode emitir fluorescência, retornando ao fundamental, ou passar para o estado tripleto através do cruzamento intersistema (transição de um estado eletrônico a outro, sem emitir radiação). Na presença de oxigênio, o estado tripleto pode gerar espécies reativas, de duas maneiras (8):

- (i) tipo 1: transferindo um elétron, por meio de reações dos FSs com substratos biológicos, formando radicais, ou
- (ii) tipo 2: transferindo energia ao oxigênio, e formando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).

Figura 4 – Mecanismo de ação da TFD. A produção de EROs, após a fotoativação do FS, é dada por duas rotas distintas: tipos 1 e 2.

Fonte: Adaptada de WAINWRIGHT (3)

A Figura 4 apresenta os tipos de mecanismos da TFD. As espécies formadas são conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs). O $^1\text{O}_2$ é altamente eletrofílico, e pode ligar-se diretamente às duplas ligações da molécula alvo. Isso se deve ao fato de que o estado singlete do oxigênio apresenta um orbital vazio, ao contrário do tripleto, que possui dois orbitais semi-ocupados. Os radicais formados pelo tipo 1 podem ser o radical hidroxila, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Tais espécies iniciam reações de oxidação em cadeia. No caso da oxidação de lipídios insaturados pelo oxigênio singlete, ocorre formação de hidroperóxidos, por uma reação eno. O $^1\text{O}_2$ é adicionado ao fosfolipídio, onde há uma dupla ligação, depois de abstrair um átomo de hidrogênio alílico (aquele ligado a um carbono alílico, o qual está ligado a um terceiro carbono, que por sua vez se liga a um quarto por meio de uma dupla ligação). A ligação dupla é movida para carbonos vizinhos, como mostra a Figura 5. O produto gerado assume majoritariamente a configuração *trans*, que difere da

configuração *cis* encontrada em membranas. Já para a oxidação por um radical, o hidrogênio alílico é abstraído, formando um radical no carbono da cadeia alifática que perdeu um próton. Ele pode reagir com o oxigênio molecular, formando um radical peroxil (ROO^*). Essa espécie pode arrancar um hidrogênio de outro lipídio, formando um radical e um lipídio hidroperóxido, em uma reação em cadeia. É também provável que outras reações ocorram, gerando outras espécies de lipídios oxidados. Na maioria dos casos, o fotossensibilizador age por meio do tipo 1 e do tipo 2. Assim, os hidroperóxidos formados pelo $^1\text{O}_2$ podem reagir com radicais livres, iniciando a formação de radicais lipídicos, e dando continuidade à cadeia de peroxidação. Isso também pode ocorrer na presença de metais (Fe^{2+} , por exemplo). (8, 25)

Figura 5 – Reação eno entre o oxigênio singlete e a dupla ligação de uma cadeia de hidrocarboneto de um lipídio, localizada entre os carbonos 9 e 10. Com a formação do hidroperóxido, a ligação é movida para um carbono adjacente.
Fonte: Adaptada de ITRI (25)

1.5 OS FOTOSSENSIBILIZADORES

A estrutura dos fotossensibilizadores é apresentada na Figura 6. A curcumina e o azul de metileno são estudados para o tratamento antimicrobiano. (26-29) A curcumina é extraída do rizoma do açafrão-da-terra, ou gengibre-amarelo, de nome científico *Curcuma longa*. Sua fórmula molecular é (1E,6E)-1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona (29), apresentando um pico de absorção em 430 nm. (28) São atribuídas à curcumina atividades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antiglicêmica, antimutagênica e anticâncer (29-30). O azul de metileno é um corante da classe das fenotiazinas, com pico de absorção em 664 nm. O espectro de absorção depende da concentração de azul de metileno, devido à formação de dímeros, os quais passam a absorver em 590 nm. (14)

Figura 6 - Estrutura dos fotossensibilizadores: (a) azul de metileno e (b) curcumina, na sua forma enólica.
Fonte: Elaborada pela autora

1.6 MICROSCOPIA CONFOCAL

A microscopia confocal, ou microscopia de fluorescência confocal, é um avanço enorme à microscopia com luz, permitindo a visualização de um objeto em profundidade. As vantagens dessa técnica são: o seccionamento óptico da amostra, permitindo a reconstrução 3D da imagem; uma resolução excelente, com um limite teórico de 0,1 a 0,2 μm ; o uso de luz em comprimentos de onda específicos; alta sensibilidade, sendo capaz de detectar a fluorescência de uma única molécula; a obtenção de imagens digitais, facilitando sua análise, e o controle por meio de um computador. (31) O diferencial de um microscópio confocal em relação ao de fluorescência simples é que a luz fora de foco é eliminada da imagem por meio de um orifício (*pinhole*, ou íris), como ilustra a Figura 7. Geralmente, o microscópio confocal é invertido (amostra é iluminada por baixo), e a imagem é formada pela lente objetiva, como num microscópio convencional.

Figura 7 – Funcionamento do pinhole, eliminando a luz fora de foco (representada pelas linhas em laranja claro), num microscópio confocal.
Fonte: Elaborada pela autora

O microscópio confocal de varredura a laser, esquematizado na Figura 8, utiliza um laser para fazer a varredura da amostra, de forma sequencial. Como o laser é capaz de iluminar apenas uma porção quase pontual da amostra, o contraste e a resolução da imagem são melhorados. Isso, somado à presença do *pinhole*, garante à técnica uma alta resolução. A luz de excitação reflete num espelho dicróico em direção à amostra. É gerada fluorescência,

que passa por esse espelho, e apenas os feixes do plano focal passam pela íris e chegam ao detector. Além disso, há um filtro posicionado antes da íris para filtrar a reflexão do próprio laser. (31-32)

Figura 8 – Representação esquemática de um microscópio confocal de varredura a laser, com o raio emitido pelo laser representado em azul, e o emitido pela amostra depois de excitada, em verde.

Fonte: ROMANO (32)

1.6.1 Recuperação de fluorescência depois de *photobleaching* (FRAP)

A técnica baseada na recuperação de fluorescência depois de fotoclareamento (*photobleaching*) (FRAP, do inglês *fluorescence recovery after photobleaching*) e sua técnica relacionada, perda de fluorescência por *photobleaching* (FLIP – *Fluorescence Loss In Photobleaching*) são valiosas para entender a dinâmica e a interação molecular. O fotoclareamento é a alteração química da molécula de fluoróforo após ser irradiada, por exemplo, por um pulso intenso de laser, causando a permanente perda de sua capacidade de emissão. Uma vez em um estado excitado tripleto -com tempo de vida relativamente longo (comparado com o estado excitado singleto)-, o fluoróforo pode interagir com outra molécula no meio, sofrendo alterações covalentes irreversíveis, e perdendo a capacidade de emissão. As principais formas de ocorrer o fotoclareamento são as reações com o oxigênio molecular ou com EROs. (33-34) O laser atinge uma região pequena da imagem - uma vez que seus raios de luz são colimados -, danificando apenas as moléculas de fluoróforo ali presentes. Esse procedimento leva um intervalo de tempo tipicamente na ordem de segundos. (35) A velocidade com que a fluorescência emitida por essa região é recuperada fornece informação

sobre a velocidade de difusão das moléculas de fluoróforo. Mais de uma iteração de *bleaching* (seguido de recuperação) pode ser realizada em um mesmo experimento de FRAP. Assim, é possível avaliar a natureza da interação entre uma molécula de um substrato, e outra em solução. Quanto mais fraca a interação, mais rapidamente haverá a troca de moléculas de fluoróforo em solução, e mais rapidamente a fluorescência é recuperada. A variação de fluorescência de uma outra região próxima não afetada pelo laser de alta intensidade é usada como controle.

2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.1 REAGENTES

Os fosfolipídios DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), POPG (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)), 18:1 cardiolipina (1',3'-bis[1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo]-sn-glicerol ou tetraoleoil cardiolipina), DMPA - ácido dimiristoilfosfatídico (1,2- ditetradecanoil-sn-glicero-3-fosfato - sal de sódio), 06:0-06:0 NBD PC (1-hexanoil-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoil}-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DPPG (1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glycerol)), representados na Figura 9, e o extrato lipídico total de *E. coli* foram comprados da Avanti Polar Lipids Inc. De acordo com o site da empresa (36), o perfil da composição lipídica de *E. coli* é de 57,5% de L- α -fosfatidiletanolamina (PE), 15,1% de L- α -fosfaditilglicerol (PG), 9,8% de cardiolipina (CL), e uma porção com 17,6% é desconhecida. Nesta há uma mistura de lipídios, com diferentes configurações de caudas apolares. Uma vez que a foto-oxidação apenas ocorre em lipídios insaturados, escolhemos trabalhar com os lipídios insaturados sintéticos disponíveis no mercado, com as cabeças polares mais abundantes em uma membrana de *E. coli*. A vantagem de trabalhar com os sintéticos é que os lipídios naturais disponíveis são uma mistura de lipídios com a mesma cabeça polar e diferentes caudas apolares, encontrados em um dado organismo. Além disso, quanto maior o grau de insaturação do lipídio, maior a taxa de formação do radical obtido pela abstração de um hidrogênio alílico pelos radicais resultantes do mecanismo de tipo 1 da TFD (8). Por isso, escolhemos a cardiolipina tetra-insaturada.

Os FSs foram gentilmente cedidos pela Prof^a Carla Raquel Fontana, da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP. A curcumina foi sintetizada de acordo com Wichitnithad e colaboradores (37) e o azul de metileno foi comprado da Sigma (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA). Outros reagentes, DMSO (dimetilsulfóxido), NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ (grau P.A.), para a preparação da solução tampão, e o clorofórmio (grau HPLC), para a diluição dos lipídios, foram adquiridos da Panreac, da Sigma-Aldrich, da J.T.Baker ou da Synth.

Figura 9 – Estrutura molecular dos lipídios sintéticos: (a) DOPE; (b) POPG; (c) 18:1 CL, (d) DMPA, (e) 06:0-06:0 NBD PC, (f) DPPG e (g) DPPE.

Fonte: PHOSPHOLIPIDS (36)

2.2 FILMES DE LANGMUIR

Os filmes de Langmuir foram preparados em cubas de Langmuir da empresa KSV Instruments (Finlândia) modelos minitrough (área superficial de $75 \times 323 \text{ mm}^2$ e volume de 250 mL) e micro minitrough (área superficial de $50 \times 318,3 \text{ mm}^2$ e volume de 70mL). As cubas encontram-se em uma sala limpa classe 10.000, com temperatura controlada em $22 \pm 1^\circ\text{C}$, e estão equipadas com a prova de Wilhelmy para medir a pressão superficial. A prova de Kelvin para a medida do potencial de superfície só foi usada na primeira cuba, pois a cuba micro é muito rasa para comportar o contra-eletródo na subfase. Uma imagem da cuba KSV minitrough equipada com as provas de Wilhelmy e de Kelvin é apresentada na Figura 10.

Para a obtenção do filme, um volume de 10 a $30 \mu\text{L}$ de solução de 1 mg/mL do lipídio ou do extrato lipídico (em clorofórmio) é espalhado na superfície do líquido, usando uma microseringa. Antes de iniciar as medidas, esperam-se 10 min para permitir que o solvente evapore. A subfase utilizada foi o tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) pH 7,4 (próximo ao pH fisiológico), preparado de acordo com o protocolo da Cold Spring Harbor Protocols. (38) A água ultrapura foi obtida por um purificador Milli-RO, acoplado a um Milli-Q (Millipore), tendo resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ e pH 5,8. Foi preparada uma solução estoque concentrada 10X, diluída antes de ser adicionada à cuba. Nos experimentos com os FSs, foram diluídos 0,25; 0,5; 2,5 ou $5 \mu\text{mol/L}$ de curcumina ou de azul de metileno ao tampão. Antes de diluir no tampão, foram preparadas soluções estoques de 2,5

mmol/L em água (azul de metileno) ou em DMSO (curcumina, pouco solúvel em água). Para evitar a fotoativação dos FSs, os experimentos foram conduzidos no escuro. Um pano preto foi usado para cobrir a caixa que protege as cubas.

Figura 10 – Cuba KSV minitrough equipada com as provas de Wilhelmy (para medida da pressão superficial) e de Kelvin (para medida do potencial de superfície). É possível notar o pano preto cobrindo o box.
Fonte: Elaborada pela autora

Uma vez espalhados os lipídios, e evaporado o clorofórmio, foram deixados 20 min de espera (além dos 10 min para a evaporação) antes do início da compressão das barreiras, para permitir a interação entre os lipídios e os FSs da subfase. Mesmo que não houvesse FS na subfase, o tempo de espera foi usado em todas as medidas, por coerência. Após a espera, as barreiras foram comprimidas numa velocidade de 10 mm/min, até que a pressão de 30 mN/m fosse atingida. Nessa pressão, o grau de empacotamento dos lipídios corresponde ao de uma membrana biológica. (39) A partir daí, a pressão foi mantida constante, através da variação da área superficial controlada pelo software. Pode haver perda do material para a subfase, ou modificações moleculares induzidas pela oxidação, por exemplo, mudando a densidade molecular na superfície, e, por isso, a pressão. Ajustando-se a área superficial disponível, é possível controlar a pressão, mantendo-a no valor desejado até que as barreiras fechem até seu máximo. Quanto mais estável o filme, menor será a variação de área para manter-se a pressão determinada.

Ressalte-se que o extrato lipídico de *E. coli* é uma mistura com composição exata desconhecida, e portanto não possui massa molar definida. Assim, as curvas de pressão são plotadas em função da área média por massa, e não da área média por molécula.

2.2.1 Técnicas de caracterização

2.2.1.1 Isotermas de pressão superficial

As cubas de Langmuir são compostas de um material inerte, possuem duas barreiras móveis para variar a área superficial disponível, e a pressão superficial é medida pelo método de Wilhelmy. Uma eletrobalaça mede a força devida à tensão superficial exercida em uma placa de platina, vidro, mica, quartzo, ou papel filtro. O sensor usado nos experimentos aqui descritos foi o de papel filtro, cujas dimensões estão representadas na Figura 11. Ele possui um formato retangular, com comprimento l , largura w , espessura t , altura imersa na água h , e densidade ρ . Sobre ele, atuam as seguintes forças: o peso (P) e a tensão superficial (γ) para baixo, se o menisco estiver para baixo, como mostra a Figura 11, e o empuxo (ξ) para cima. O módulo da resultante das forças é apresentado na equação 1. Podemos escrever as forças em termos da aceleração da gravidade (g), das dimensões e da densidade do sensor, e da tensão superficial (γ_a) e da densidade (ρ_a) da água, como mostram as equações 2, 3 e 4. Obtemos assim a equação 5 para a força resultante sobre o sensor. (18, 22)

$$F = P + \gamma - \xi \quad (1)$$

$$P = \rho g l w t \quad (2)$$

$$\gamma = 2(w + t)\cos\theta\gamma_a \quad (3)$$

$$\xi = h w t \rho_a g \quad (4)$$

$$F = \rho g l w t + 2(w + t)\cos\theta\gamma_a - h w t \rho_a g \quad (5)$$

Se o papel estiver completamente molhado pela água, o ângulo de contato $\theta = 0$ na ausência de um filme na superfície, e seu cosseno será $\cos \theta = 1$. Podemos ainda aproximar o perímetro do papel para $2w$, uma vez que a espessura do papel filtro, t (na ordem de 0,1 mm), é insignificante se comparada a sua largura, w (na ordem de 1 cm). Considerando que o sensor esteja em equilíbrio estacionário, seu peso e o empuxo são constantes. Então, a única grandeza que varia durante a medida é a tensão superficial. Lembrando que a pressão superficial é a diferença entre a tensão superficial em um dado momento em relação à do

líquido puro (água), podemos escrevê-la como função da variação da força sobre o papel (18, 22):

$$\pi = -\Delta\gamma = -\Delta F/2w \quad (6)$$

Figura 11 – Sensor de Wilhelmy parcialmente imerso na água.
Fonte: BIOLIN SCIENTIFIC (22)

A partir da isoterma de pressão, pode-se avaliar a elasticidade do filme calculando-se a sua compressibilidade (C_s). Geralmente, é usado o módulo de compressibilidade, que é o inverso da compressibilidade (C_s^{-1}), e tem a mesma unidade da pressão superficial, mN/m. (18) Seu cálculo se dá por:

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T,$$

onde A é a área por molécula, π é a pressão superficial, e T a temperatura. Como a curva é uma isoterma (a temperatura é mantida constante), muitas vezes suprime-se a indicação de T constante, e usa-se a notação de derivada simples.

O módulo de compressão é plotado em função da área molecular ou da pressão, e indica a rigidez do filme. Quanto maior o módulo, maior a rigidez. É útil para determinar as regiões de transição da isoterma: quando há um patamar, na curva de C_s^{-1} vai aparecer um valor próximo a 0 mN/m. (18) Além disso, pode-se determinar as fases da isoterma pelos valores de C_s^{-1} . Valores entre 12 e 100 mN/m correspondem à fase LE, entre 100 e 250 mN/m correspondem à LC, e maiores que isso correspondem à sólida. (40)

2.2.1.2 Potencial de superfície

O potencial de superfície é uma grandeza que mede a diferença de potencial acima e abaixo do filme de Langmuir. Ela é sensível à soma de todos os momentos de dipolo individuais das moléculas. No equipamento usado nos experimentos aqui descritos, da KSV NIMA, é utilizado o método de capacitor vibrante, representado na Figura 12. O potencial de superfície é obtido pela diferença de potencial entre a placa vibrante, posicionada logo acima da superfície do filme, e o contra-eletrodo, imerso na subfase. (41)

Figura 12 – Representação do sensor de potencial de superfície da KSV NIMA.
Fonte: BIOLIN SCIENTIFIC (41)

A interpretação do potencial de superfície não é muito intuitiva, e alguns modelos foram criados a fim de relacionar o potencial medido com os momentos de dipolo das moléculas no filme. Um modelo bastante usado para filmes não-ionizados é o de Demchack-Fort (42), que divide o potencial em três contribuições diferentes, sendo conhecido como capacitor de três camadas. Ele é um desdobramento da equação de Helmholtz, sendo o potencial dado por:

$$\Delta V = 4\pi n \left(\frac{\mu_1}{\epsilon_1} + \frac{\mu_2}{\epsilon_2} + \frac{\mu_3}{\epsilon_3} \right),$$

onde n é o número de moléculas/cm², μ_1 , μ_2 e μ_3 são as componentes verticais dos momentos de dipolo das moléculas (μ_1 é devido à reorientação das moléculas da subfase induzida pelas moléculas do filme, μ_2 é devido às cabeças polares das moléculas do filme, e μ_3 é devido às caudas apolares), e ϵ_1 , ϵ_2 e ϵ_3 são as constantes dielétricas efetivas em cada uma das 3 regiões. (42)

No caso de as moléculas na interface ar-água serem parcial ou totalmente ionizadas, aparece a contribuição da dupla camada elétrica de Gouy-Chapman, ψ_0 . (43) A equação de Gouy-Chapman é obtida resolvendo-se a equação não-linear de Poisson-Boltzman (44):

$$\psi_0 = \frac{2kT}{e} \sinh^{-1} \left[\frac{e\alpha}{(A(5,88 \times 10^{-7} c \epsilon T)^{1/2})} \right],$$

onde k é a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta, e a carga do elétron, α o grau de dissociação das cabeças polares na monocamada, c a concentração iônica em mol/L, A a área média por cabeça polar e ϵ a permissividade relativa (ou constante dielétrica) da subfase.

De acordo com Taylor (44), o modelo de Demchack-Fort não é muito realista ao tratar a monocamada como três camadas separadas e independentes. Uma vez que os momentos das cabeças polares estão sobre ou na subfase, espera-se que ocorram fortes interações entre elas e as moléculas de água adjacentes. Dessa forma, μ_1 , μ_2 , ϵ_1 , ϵ_2 não poderiam ser tratados de maneira independente. Assim, ele sugere que um outro modelo (de Vogel e Möbius) seja mais apropriado. Esse modelo divide as contribuições para o momento de dipolo (μ) em duas, como um capacitor de duas camadas, e não colocam uma dependência explícita com a permissividade elétrica do meio. A camada α representa a contribuição das cabeças polares - incluindo toda a contribuição da hidratação das cabeças, da reorientação das molécula de água devida à presença do filme e da formação da dupla camada de Gouy-Chapman- e ω representa a contribuição das caudas apolares. O momento de dipolo efetivo seria então (45):

$$\mu = \mu_\alpha + \mu_\omega$$

Pode-se estabelecer uma comparação entre esses dois modelos, já que:

$$\mu_\alpha = \frac{\mu_1}{\epsilon_1} + \frac{\mu_2}{\epsilon_2} + \frac{\epsilon_0 \psi_0}{n}, e$$

$$\mu_\omega = \frac{\mu_3}{\epsilon_3}$$

2.2.2 Irradiação de luz *in situ*

Para avaliar o efeito da fotoativação da curcumina e do azul de metileno, foi realizada a irradiação da monocamada com um LED azul e um vermelho, respectivamente. O LED azul

possui emissão máxima em 460 nm, e sua potência nominal é de 77,1 mW/cm² e a de trabalho é de 1,3 mW/cm². Já o LED vermelho possui emissão máxima em 634 nm, com potência nominal de 55,9 mW/cm² e potência de trabalho de 2,6 mW/cm². O LED foi posicionado a alguns centímetros da superfície do líquido, como mostra a Figura 13. As monocamadas foram irradiadas na pressão superficial de 30 mN/m durante 30 s, para o extrato lipídico de *E. coli*, ou 10 min, para os lipídios isolados.

Figura 13 – Fotografia da cuba KSV minitrough com os LEDs azul (a) e vermelho (b) posicionados para a irradiação da monocamada.

Fonte: Elaborada pela autora

2.3 FILMES LB

Os filmes LB foram depositados em cubas de Langmuir da *KSV Instruments* (Finlândia) dos modelos minitrough (área superficial de 75 x 323 mm² e volume de 250 mL) e KSV5000 (área superficial de 150 x 530 mm² e volume de 1200 mL), em subfase aquosa com e sem curcumina. Não foi usado o PBS na subfase porque os sais do tampão também se depositavam no filme, e prejudicavam a visualização no microscópio confocal. A velocidade do dipper (dispositivo imersor) foi de 4 mm/min. Devido à instabilidade do filme do extrato *E. coli*, foi transferida uma primeira camada de filme de DMPA com 10⁻⁵ mol/L de acetato de zinco na subfase, na cuba KSV5000. Então, na *minitrough*, foi transferida a segunda camada do filme, de extrato de *E. coli* com 1% de 06:0-06:0 NBD PC. Este último foi adicionado por ser um lipídio com uma sonda fluorescente, que poderia ser visualizado ao microscópio.

2.4 MICROSCOPIA CONFOCAL

Para os experimentos com microscopia confocal, foi utilizado o microscópio confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido) do laboratório multi-usuário de microscopia confocal do Instituto de Física de São Carlos (IFSC - USP). Para tanto, contamos com a colaboração do Prof. Francisco Guimarães. As amostras foram excitadas por um laser de argônio, com linhas de emissão em 458 nm, 488 nm e 514 nm, e por um de 405 nm. O primeiro está dentro dos espectros de absorção da curcumina e do 06:0-06:0 NBD PC, enquanto que o segundo está apenas no espectro da curcumina. O feixe de laser de argônio passa por filtros, para selecionar um comprimento de onda desejado dentre os três em que emite. No entanto, uma pequena intensidade nos outros dois pode passar pelos filtros. Uma vez que o laser de argônio possui também uma emissão em 514 nm, que se sobrepõe com a emissão do marcador fluorescente do 06:0-06:0 NBD PC, com pico em 531 nm, não foi possível diferenciar a emissão deste do reflexo do próprio laser no substrato de vidro, sendo necessária uma quantidade maior do marcador no filme, para ser detectado. Portanto apenas a curcumina é visualizada nas imagens.

Foram coletadas imagens por dois tipos de fotodetecção diferentes: espectral e por canal. No primeiro, usamos o laser de 405 nm e todos os 32 canais de detecção. O resultado é um espectro de fluorescência das diferentes regiões da imagem. Já no segundo, apenas um canal é usado, e o que se obtém é a intensidade de fluorescência em uma determinada região de comprimento de onda, escolhida de acordo com a molécula a ser observada. Utilizamos a detecção entre 492 e 735 nm, na região de emissão da curcumina. Com este modo, realizamos o fotoclareamento (*photobleaching*), no qual o laser incidiu em uma potência de 60% do seu máximo, em uma região determinada, por 40 s. Antes de iniciar a medida, adicionamos uma gota de curcumina, na concentração de 0,5 $\mu\text{mol/L}$, sobre a superfície do filme. Por ser mais potente, o laser de argônio foi usado em 488 nm. Por mais que fora previamente constatado uma emissão em 514 nm, ela foi muito fraca, e não se compara à intensidade de emissão da curcumina. Realizamos um experimento com 4 iterações de fotoclareamento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 FILMES DE LANGMUIR DO EXTRATO LIPÍDICO DE *E. COLI*

Em testes iniciais, estabelecemos uma concentração de 0,5 $\mu\text{mol/L}$ dos FSs na subfase, e deixamos interagindo por 30 min, 1 h e 2 h antes do início da compressão das barreiras. As curvas para a curcumina estão na Figura 14, enquanto as do azul de metileno (AM) estão na Figura 15. Para ambos os FSs, ocorreu deslocamento das isotermas de $\pi \times A$ para maiores áreas. Isso indica que as moléculas de FS da subfase foram incorporadas ao filme.

Figura 14— Isotermas de $\pi \times A$ de extrato lipídico de *E. coli* em subfases de PBS puro e PBS com 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina, em três tempos de espera diferentes: 30 min (a), 1 h (b) e 2 h (c). Em (d), tem-se a superposição dessas curvas, na presença de curcumina. Em todos os gráficos a curva em subfase de PBS, para o tempo de espera de 10 min (para evaporação do solvente), é plotada. Nota-se que a pressão é plotada em função da área por mg de lipídio, pois não é conhecida sua massa molar. Fonte: Elaborada pela autora

Figura 15 – Isotermas de $\pi \times A$ de extrato lipídico de *E. coli* em subfases de PBS puro e PBS com 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de azul de metileno (AM), em três tempos de espera diferentes: 30 min (a), 1 h (b) e 2 h (c). Em (d), tem-se a superposição dessas curvas, na presença de AM. Em todos os gráficos a curva em subfase de PBS, para o tempo de espera de 10 min (para evaporação do solvente) é plotada.
Fonte: Elaborada pela autora

Além de observar a incorporação dos FSs, merece destaque também o formato da isoterma do extrato de *E. coli* (Figura 16 (a)). Ela não contém transições de fase que tivessem patamares bem definidos, ao contrário da isoterma da Figura 2. Há uma pequena curvatura em uma pressão próxima a 30 mN/m. Do módulo de compressibilidade (Cs^{-1}) na Figura 16 (b), nota-se claramente que há de fato uma mudança na inclinação da curva de pressão-área, em que se altera o sinal da derivada em torno de 30 mN/m. De acordo com Sandrino et al. (46) há uma transição da fase líquido-expandida para a líquido-condensada em 25–28 mN/m, confirmada por imagens de BAM (microscopia de ângulo de Brewster, do inglês *Brewster angle microscopy*), apresentadas na Figura 17(a). As medidas foram feitas em subfase aquosa, mas, de acordo com os autores, o perfil da isoterma em PBS pH 7,4 é o mesmo. O módulo máximo de compressibilidade obtido foi de $56,2 \pm 1,2$ mN/m (Figura 17(b)), o que indica alta fluidez da monocamada. No entanto, como mencionado na seção 2.2.1.1, para valores entre 12 e 100 mN/m é atribuída a fase LE. Por se tratar de uma mistura de lipídios

com caudas de diferentes tamanhos, saturadas e insaturadas, o empacotamento é dificultado, o que pode explicar tamanha fluidez do filme. A formação de domínios também é comum em membranas, de forma a agrupar certos tipos de lipídios. Por exemplo, é descrita na literatura a formação de domínios de CL em membranas de bactérias e de mitocôndrias (47). De acordo com Phan e Shin (48), a adição de CL em filmes de Langmuir de DPPC (dipalmitoil-fosfatidilcolina) faz com que o patamar da transição LE–LC desapareça com o aumento da concentração de CL, sugerindo que a CL tenha preferência pela fase LE, e causa uma expansão no filme.

Figura 16 – (a) Isoterma de π xA e (b) módulo da compressibilidade em função da pressão superficial para o extrato de *E. coli*.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 17 – (a) Isoterma de π xA e imagens de BAM e (b) módulo da compressibilidade para o extrato de *E. coli* (em vermelho) em subfase aquosa. As demais curvas de C_s^{-1} fogem ao interesse deste trabalho.

Fonte: SANDRINO (46)

Isotermas sem FS na subfase foram usadas como controle (Figura 14 e Figura 15). Percebe-se que, após 2 h de espera, as isotermas apenas em PBS também sofrem deslocamento para maiores áreas, indicativo de alguma alteração na conformação dos lipídios após um longo tempo. Tal alteração gerou um rearranjo no filme, responsável pelo deslocamento da curva. A causa precisa desse deslocamento não é conhecida, e não foram encontradas na literatura curvas com tempos de espera longos em comparação com tempos de espera mais curtos. Após um tempo muito longo, espera-se que espécies reativas presentes no ar oxidem o filme contendo lipídios insaturados, de forma a perder material para a subfase. Entretanto, Liljeblad et al. (49) observaram um aumento da área relativa nos primeiros minutos de experimento. Como a quantidade de vinila diminui, o processo de oxidação já se iniciou nesse tempo. Então, eles atribuem o aumento a duas causas: a um maior número de espécies na superfície devido à clivagem dos fosfolipídios insaturados (que se misturam à monocamada ainda inteira) e à formação de alguma espécie polar associada à oxidação dos lipídios (aproximando as caudas às cabeças polares). Podemos especular que essa seja a causa, e que em tempos de espera menores, ainda não tenha se iniciado a oxidação. Para verificar se a causa está relacionada com espécies oxidativas no ar, pode-se realizar o experimento em uma atmosfera de N_2 e verificar se ainda ocorre o deslocamento.

O aumento de área não ocorreu para os tempos de espera de 30 min e 1 h. Resultados similares foram observados entre estes últimos, e, portanto, fixamos o tempo de espera mais baixo, de 30 min, que se mostrou suficiente para a incorporação dos FSs no filme (Figura 14 (a) e Figura 15(a)).

3.1.1 Irradiação do filme na presença de curcumina

Uma irradiação por apenas 30 s da monocamada em subfase de PBS com $0,5 \mu\text{mol/L}$ de curcumina aumentou significativamente a estabilidade do filme. Uma curva da área relativa àquela em que a pressão de 30 mN/m é atingida do filme de extrato de *E. coli* com curcumina, com e sem irradiação, além do controle, sem curcumina e sem irradiação, é apresentada na Figura 18 (a). A irradiação se deu durante 30 s, após cerca de 4 min de a pressão de 30 mN/m ter sido atingida. A diferença de área relativa (Δ), entre as monocamadas irradiada e não irradiada, é também plotada em função do tempo na Figura 18 (b). Nesta última, nota-se que até 20 min há um aumento relativo de área crescente, após o que é revertido. Uma hipótese

para tal comportamento seria que espécies reativas do ar também oxidam o filme irradiado. Então, inicialmente, quando o LED irradia a monocamada há uma rápida geração de oxigênio singleto, e a formação de hidroperóxidos, o que não ocorre sem a irradiação. Quando o $^1\text{O}_2$ gerado é todo consumido, isso cessa, e o aumento relativo pára de crescer. E, com mais tempo (além dos 40 min mostrados nos gráficos), esse filme também vai se perdendo, e as barreiras fecham totalmente. É importante ressaltar que isso ocorre em um tempo maior do que no filme não irradiado.

Figura 18 – (a) Variação da área relativa (A/A_0) em filmes de Langmuir do extrato lipídico de *E. coli* sem e com curcumina, irradiado por um LED azul por 30 s ou não, mantidos em uma pressão de 30 mN/m. A_0 é a área na qual essa pressão foi atingida. (b) Curva do aumento relativo de área entre as curvas com curcumina irradiada e não irradiada, mostradas em (a).

Fonte: Elaborada pela autora

Um fenômeno similar foi observado por Aoki et al. (11), em um filme de DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) com eritrosina (10 $\mu\text{mol/L}$ em sufase aquosa). Eles atribuem o aumento da área à formação de hidroperóxidos de lipídios pela ação do oxigênio singleto. O hidroperóxido criado torna a cauda do lipídio mais polar, devido ao grupo $-\text{OOH}$ inserido, o que gera uma mudança conformacional para aproximar esse grupo da superfície da água. Quando não há irradiação, há um decréscimo maior de área pela perda do material para a subfase, provavelmente relacionada à degradação dos lipídios causada pela oxidação por espécies reativas presentes no ar. Essa diferença na variação de área entre as curvas irradiada e não irradiada não foi verificada para seu análogo saturado, o DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina).

Podem-se encontrar outros trabalhos com irradiação ultravioleta (UV) em filmes de Langmuir de lipídios (50, 51), que indicam a oxidação destes. Um trabalho de Gomes et al.

(52) avalia a ação da irradiação UV em filme de DPPG, um lipídio saturado, na presença de DNA na subfase aquosa. Apesar de que este trabalho também utiliza irradiação, ela não é feita com luz visível, mas sim com UV. A luz UV é de alta energia, e pode danificar várias moléculas, rompendo ligações químicas, como no caso do estudo. Em filmes com apenas DPPG (sem DNA na subfase), ocorre a clivagem das ligações C—O, C=O e —PO²⁻. A luz visível não tem energia suficiente para romper ligações. Assim, ela não deve causar danos ao filme, na ausência de FSs. Quando na presença do DNA na subfase, a perda de área com o tempo é retardada, de início (depois de um tempo de aproximadamente 2500 s esse efeito desaparece, e as curvas voltam a coincidir). Tal fenômeno é explicado de duas formas: o dano ao DNA pela luz UV gera produtos iônicos que estabilizam o DPPG intacto e seus subprodutos, e o DNA adsorvido pode agir como uma barreira, retendo os produtos da irradiação. Isso provavelmente não é o que ocorre quando a estabilidade do filme aumenta na presença de FSs, mas sim a formação de hidroperóxidos, pelo oxigênio singlete, como descrito. Além disso, a oxidação só ocorre em lipídios insaturados. Já foi verificado que em filmes com apenas lipídios saturados a estabilidade é alta sempre, independentemente da presença de FSs. (11)

3.2 FILMES DE LANGMUIR DOS LIPÍDIOS ISOLADOS

Uma vez verificada a ação da foto-oxidação do filme com o extrato lipídico de *E. coli* e a curcumina, estudamos os lipídios separadamente, com espécies sintéticas insaturadas, disponíveis comercialmente. Para obter informação mais completa da formação de espécies oxidadas, utilizamos a cuba minitrough, com o sensor de potencial de superfície acoplado. Ocorrendo uma reação de oxidação, haverá uma mudança na estrutura molecular do filme, havendo também uma mudança no momento de dipolo, e, portanto, do potencial medido.

3.2.1 DOPE

A isoterma de $\pi \times A$ do DOPE puro da Figura 19 pode ser comparada com outras da literatura. Ela está de acordo com a obtida por Moghaddam et al. (53), em PBS. Outra curva obtida para a água pura deuterada é bastante próxima à em PBS (Figura 20). A partir da curva que obtivemos, plotamos o módulo de compressibilidade. Ele pode ser comparado com o obtido para o extrato de *E. coli* (já que o PE é o fosfolipídio mais abundante em membrana *E.*

coli) e com uma espécie similar, saturada, o DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, usado apenas a título de comparação), como mostra a Figura 21. Vale ressaltar que o DOPE possui uma cauda de 18 carbonos, enquanto que o DPPE tem uma cauda de 16. Ainda assim, é interessante estabelecer uma comparação, pois a quantidade de carbono é próxima, e o efeito mais aparente na compressibilidade será o da insaturação. O extrato de *E. coli* possui o menor módulo de compressibilidade, o que indica maior fluidez do filme, como esperado por conta de sua composição heterogênea de lipídios com caudas de extensões variadas, saturadas e insaturadas, dificultando o empacotamento.

Figura 19 – Isotermas de $\pi \times A$ do DOPE e do DPPE em subfase de PBS.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 20 – Isotermas de $\pi \times A$ do DOPE (traço pontilhado) em D₂O (a) e em PBS (b). As demais curvas não são de interesse para comparação neste trabalho.

Fonte: MOGHANDDAM (53)

Figura 21 – Módulo da compressibilidade em função da pressão superficial dos filmes de DOPE, DPPE e extrato de *E. coli*.

Fonte: Elaborada pela autora

Os módulos de compressibilidade para o DPPE e o DOPE encontrados na literatura divergem entre si, mesmo em subfases iguais. Por mais que se controlem as condições experimentais, pequenas diferenças entre a temperatura e o pH da subfase podem gerar diferenças nos perfis da isoterma, e, conseqüentemente, no módulo de compressibilidade. O C_s^{-1} do DOPE é próximo ao descrito por Wydro e Witkowska (54), obtido em subfase aquosa (Figura 22). Entretanto o módulo da compressibilidade para o DPPE é bastante diferente à obtida pelos autores. A curva aproxima-se à obtida por Nowotarska et al. (55), também em água, apresentada na Figura 23.

Figura 22 – Módulos de compressibilidade para o DPPE e o DOPE. As demais curvas não são de interesse direto para comparação com este trabalho.

Fonte: WYDRO; WITKOWSKA (54)

Figura 23 – Módulo de compressibilidade para o DPPE em água (1). As demais curvas não são de interesse para comparação com este trabalho.
Fonte: NOWOTARSKA (55)

Pode-se verificar a incorporação de curcumina ao filme de DOPE, havendo um deslocamento na isoterma de pressão e uma redução no potencial de superfície atingido na pressão de 30 mN/m. Porém, a irradiação do filme não produziu qualquer efeito na estabilidade ou no potencial do filme. Por isso, utilizamos um tempo maior de irradiação (10 min) e variamos a concentração de curcumina (0,25; 0,5; 2,5 e 5 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina na subfase), como mostram as curvas na Figura 24. É importante ressaltar que a irradiação se deu cerca de 4 min após atingir a pressão de 30 mN/m. Após os 10 min de irradiação, continuamos medindo o potencial de superfície, até que as barreiras se fechassem por completo. O aumento em área é proporcional ao aumento da concentração até atingir 2,5 $\mu\text{mol/L}$, em que parece ocorrer uma saturação de curcumina incorporada ao filme.

Figura 24 – Isotermas de $\pi \times A$ do DOPE em subfases com ou sem curcumina, em várias concentrações, sendo irradiada ou não com o LED azul, por 10 min.
Fonte: Elaborada pela autora

O potencial de superfície, descrito na seção 2.2.2.2, mede a diferença de potencial entre a interface, com o filme, e a subfase. Ele é muito mais sensível à organização do filme do que a pressão superficial, e por isso sua isoterma se inicia em áreas maiores. Um comportamento típico de uma isoterma de potencial é o seguinte: inicialmente, em grandes áreas, as moléculas estão bastante espaçadas e quase não interagem. O potencial de superfície nessas grandes áreas é zero. Dando-se início à compressão, existe uma área crítica na qual há um aumento íngreme da curva. (20) Como tínhamos interesse em manter a pressão em 30 mN/m por um período de tempo suficiente para perceber mudanças na variação de área ou do potencial, a quantidade de moléculas espalhadas não podia ser muito pequena, haja vista a instabilidade de lipídios insaturados. Por isso, o potencial de superfície inicial já estava acima de 0 V quando foi iniciada a compressão. Além disso, durante os 20 min de espera para permitir a interação entre os FSs na subfase e o filme na superfície, dados foram coletados. A variação do valor do potencial foi grande, e houve tendência de aumento durante esse período. As isotermas de potencial para o filme na presença de curcumina estão na Figura 25.

Figura 25 – Isotermas de potencial de superfície para os filmes de DOPE com ou sem curcumina, em várias concentrações, sendo irradiada ou não com o LED azul, por 10 min. (a) 0,25 μM de curcumina; (b) 0,5 μM de curcumina; (c) 2,5 μM de curcumina e (d) 5 μM de curcumina.

Fonte: Elaborada pela autora

Para facilitar a comparação entre os potenciais medidos para cada filme, curvas em função do tempo também foram plotadas. Observou-se uma redução quando na presença de curcumina no filme (Figura 26). Essa redução é também dependente da concentração de curcumina na subfase, e parece saturar em torno de $2,5 \mu\text{mol/L}$. No entanto, a irradiação não produziu efeito nem para maiores concentrações.

Figura 26 – Potencial de superfície em função do tempo dos filmes de DOPE com ou sem curcumina, em várias concentrações, sendo irradiada ou não com o LED azul, por 10 min. (a) $0,25 \mu\text{M}$ de curcumina; (b) $0,5 \mu\text{M}$ de curcumina; (c) $2,5 \mu\text{M}$ de curcumina; (d) $5 \mu\text{M}$ de curcumina e (e) combinação de todas as curvas. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min.

Fonte: Elaborada pela autora

Outros estudos para a interação de curcumina em monocamadas lipídicas podem ser encontrados na literatura. (56-57) Eles têm por objetivo estudar a interação entre curcumina e fosfolipídios para uso no tratamento de câncer e como agente anti-inflamatório. Neles, a curcumina é co-espalhada com os lipídios na superfície aquosa, diferentemente do nosso trabalho no qual ela é dissolvida na subfase. Xu et al. (56) estudaram a interação com o DPPC a fim de obter informações sobre o mecanismo de ação da curcumina em uma célula cancerígena, inibindo sua proliferação e causando apoptose. Os autores sugerem que os grupos hidroxila da curcumina formem ligações de hidrogênio com o grupo amina do DPPC. A curcumina aumentou a compressibilidade dos filmes, e em uma fração molar maior do que 0,4, a interação com o DPPC foi mais atrativa do que entre as moléculas das duas espécies isoladas. A comparação com os resultados de DOPE desta dissertação não é trivial porque a organização de um filme de DPPC difere consideravelmente de um de DOPE, principalmente por causa da insaturação e do tamanho diferente das caudas no DOPE. O efeito da curcumina no DPPC (56) é contrário ao observado para o DOPE, pois neste último caso a curcumina causou expansão do filme de Langmuir. No que concerne à simulação de membranas de células cancerígenas, os resultados em DPPC não são ideais para inferir implicações biológicas, pois tais células têm grande conteúdo de lipídios carregados (o DPPC é neutro). Já a semelhança dos resultados de filmes de DOPE e de *E. coli* indicam que o DOPE pode ser representativo da membrana lipídica da bactéria.

No trabalho de Karewicz et al. (57), foi estudada a interação da curcumina com lipídios para seu encapsulamento em lipossomos para liberação controlada de fármacos (*drug delivery*). Em uma monocamada mista com EYPC (Egg yolk fosfatidilcolina), a curcumina aumentou a condensação do filme. Não foram encontrados trabalhos em monocamadas de Langmuir para a aplicação da curcumina na TFD.

Para o azul de metileno, nenhuma mudança no comportamento das isotermas de pressão e de potencial de superfície foi observada. Esse fato indica que não há interação entre os lipídios do filme e os FSs na subfase, o que pode parecer surpreendente porque AM se incorporava nos filmes de *E. coli*. Ou seja, no que tange a interação com AM, o DOPE não parece ser modelo adequado para representar a membrana lipídica de *E. coli*. A ausência de interação pode ser explicada pela presença de carga positiva na molécula de azul de metileno (Figura 6 (a)). Provavelmente, os íons de sal da subfase competem pelas moléculas de AM, solvatando-as. Como esse FS é carregado, há interação mais forte entre ele e o tampão do que

para a curcumina. Na Figura 27 são apresentadas as isotermas de potencial de superfície para a concentração mais alta, de 5 $\mu\text{mol/L}$ de AM. As isotermas de πxA não são mostradas.

Figura 27 – Isotermas de potencial vs área (a) e potencial vs tempo (b) para DOPE em subfase de PBS puro ou com 5 $\mu\text{mol/L}$ de azul de metileno, irradiado ou não. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min.

Fonte: Elaborada pela autora

A interação de monocamadas lipídicas de DOPC e de cardiolipina com o azul de metileno foram estudadas por Schmidt et al. (12) Em subfase de água pura, verificou-se um deslocamento das isotermas para maiores áreas para a CL, ao passo que houve deslocamento para áreas menores para o DOPC. Medidas de PM-IRRAS sugeriram uma interação do azul de metileno com as cabeças polares dos lipídios, afetando os grupos carbonila e o empacotamento da cadeia alquílica.

3.2.2 POPG

A isoterma de POPG e o módulo de compressibilidade calculado a partir dela estão representados na Figura 27. Os resultados estão de acordo com os encontrados por Liu et al. (58), cujas isotermas de DOPG e POPG e módulo de compressibilidade estão na Figura 28. Assim como para as isotermas de DOPE e de DPPE, a isoterma de POPG é mais expandida do que a de DPPG, devido à insaturação na cauda de hidrocarboneto.

Figura 28 – Isotherma de $\pi \times A$ (a) e módulo de compressibilidade (b) do POPG, em PBS.
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 29 – Isothermas de $\pi \times A$ (a) e módulo de compressibilidade (b) do DPPG e do POPG encontradas na literatura. As demais curvas fogem ao interesse deste trabalho.
Fonte: LIU (58)

Para o POPG e a cardiolipina (resultados na seção seguinte), empregamos uma concentração de 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de FSs na subfase, e tempo de irradiação de 10 min, da mesma forma descrita para o DOPE. Similarmente ao DOPE, não foi verificado efeito algum sobre a estabilidade ou o potencial de superfície uma vez irradiados os filmes. Além disso, o AM também não se incorporou ao filme. Na Figura 30, mostramos as isothermas de $\pi \times A$ do POPG com curcumina, irradiada ou não. Usamos com controle, além da isoterma sem curcumina não irradiada, a irradiada. Pode-se perceber um pequeno aumento de pressão no início da isoterma, justamente durante o tempo de espera de 20 min para a interação. Tal aumento deve ser causado por um envelhecimento mecânico do filme lipídico.

Figura 30 – Isotermas de πxA do POPG em subfase de PBS puro ou com 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina, irradiada ou não.

Fonte: Elaborada pela autora

As curvas de potencial de superfície em função da área e do tempo são apresentadas na Figura 31. Pode-se observar uma redução no seu valor até uma área de aproximadamente 75 $\text{\AA}^2$, ou um tempo de 75 min, quando na presença de curcumina, mas a irradiação não produz efeito.

Figura 31 – Potenciais de superfície em função da área (a) e do tempo (b) do POPG em subfase de PBS puro ou com 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina, irradiada ou não. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min.

Fonte: Elaborada pela autora

Para o azul de metileno, nenhuma alteração foi verificada no perfil das isotermas. Mostramos as de potencial de superfície na Figura 32.

Figura 32 – Potenciais de superfície em função da área (a) e do tempo (b) do POPG em subfase de PBS puro ou com 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de azul de metileno, irradiado ou não. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min.

Fonte: Elaborada pela autora

3.2.3 Cardiolipina

Como esperado, a isoterma da cardiolipina (CL) é bastante fluida, estando na fase líquido-expandida, como já descrito na seção 3.1. O formato de sua isoterma na Figura 33 e do módulo de compressibilidade são bastante parecidos com os obtidos para o DOPE (Figura 19 e Figura 21) e o POPG (Figura 28). Pode-se notar, no entanto, que a área média por molécula é maior do que a do DOPE e do POPG, o que se deve às quatro caudas de hidrocarboneto da CL (Figura 9).

Figura 33 - Isoterma de $\pi \times A$ (a) e módulo de compressibilidade (b) da CL, em PBS.

Fonte: Elaborada pela autora

Com a cardiolipina os resultados foram similares aos descritos para o POPG e DOPE. Houve incorporação de curcumina, e isso produziu deslocamento para maiores áreas na isoterma de pressão, e uma redução no valor máximo do potencial de superfície. A irradiação não produziu efeito. Na Figura 34 são mostradas as curvas de $\pi \times A$, e na Figura 35 as de potencial de superfície em função da área e do tempo.

Figura 34 – Isotermas de $\pi \times A$ (CL) em subfase de PBS puro ou com 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina, irradiada ou não.
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 35 - Potenciais de superfície em função da área (a) e do tempo (b) da cardiolipina (CL) em subfase de PBS puro ou com 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina, irradiada ou não. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min.
Fonte: Elaborada pela autora

Da mesma forma, as isotermas com AM mostram que não houve incorporação desse ao filme de cardiolipina. As curvas de potencial de superfície estão na Figura 36. Como mencionado, Schmidt et al. (12) estudaram a interação entre azul de metileno e CL em subfase aquosa, tendo observado um deslocamento da isoterma de pressão para maiores áreas,

confirmando a incorporação do FS. Em nosso trabalho, a presença de sais na subfase de PBS devem competir pelas moléculas de AM, de forma a não permitir que adsorvam na interface.

Figura 36 – Potenciais de superfície em função da área (a) e do tempo (b) da cardiolipina (CL) em subfase de PBS puro ou com 2,5 µmol/L de azul de metileno, irradiado ou não. A irradiação iniciou-se em torno dos 34 min, e estendeu-se por 10 min.

Fonte: Elaborada pela autora

3.3 MICROSCOPIA CONFOCAL

Não há muitos trabalhos na literatura sobre a visualização de filmes LB por microscopia confocal. No entanto, ela pode ser valiosa para a análise, quando combinada com microscopia de força atômica (AFM). (59) As duas técnicas de microscopia fornecem informações complementares para a caracterização de filmes LB. A AFM possui alta resolução espacial, mas não fornece informação química. Já a microscopia confocal possui resolução espacial menor que AFM, mas fornece informação química. É, todavia, sujeita a artefatos quanto ao particionamento da sonda fluorescente entre as diferentes fases do filme (LE e LC). O filme na fase LC pode expelir o marcador fluorescente, e dar uma falsa ideia de que não há fluorescência naquela região por outro motivo (como pela presença de uma outra molécula). Medidas de FRAP visualizadas por microscopia confocal em filmes LB não foram encontradas na literatura, e a FRAP se mostrou útil para avaliar a natureza de uma interação entre moléculas do substrato e em solução.

Para verificar se o filme havia sido depositado no substrato, fizemos uma varredura até a borda do vidro, onde não teria filme (pois era a região do suporte para montar o LB) obtendo a Figura 37. Essa imagem confirmou a presença do filme com curcumina com certa regularidade (região circulada em vermelho), uma vez que a região sem emissão (circulada em azul) é o vidro sem curcumina. A região intermediária, irregular, do final do filme,

aparece com uma fluorescência não tão intensa (circulada em verde). Como mencionado, não há imagens com a emissão do lipídio devido à sua baixa intensidade e à sobreposição com a linha espectral de 514 nm do laser de argônio usado na medida. Assim, trabalhamos apenas com o filme que continha curcumina incorporada. É importante salientar que as imagens obtidas pelo microscópio não são coloridas, mas são coloridas artificialmente pelo software, de acordo com o espectro de emissão coletado.

Figura 37 - Imagem do final do filme LB com curcumina. A região circulada em vermelho mostra o filme com curcumina, a região em verde mostra a borda do filme, e a em azul (sem emissão) mostra o substrato sem filme.

Fonte: Elaborada pela autora

Depositou-se uma gota de curcumina no filme LB também com curcumina, na mesma concentração usada na subfase do filme de Langmuir. A Figura 38 (a) mostra deslocamento para o verde com o aumento da concentração de curcumina. Conforme a gota secou (Figura 38 (b)), aumentou a concentração de curcumina no plano da superfície deslocando o espectro de emissão para o amarelo, característico da curcumina, e em concordância com relatos de uma comunicação pessoal com o Prof. Francisco Guimarães, em biofilmes. Da literatura infere-se que a emissão da curcumina depende de sua concentração, tanto em sua forma livre, quanto acoplada a uma proteína RCMj-CN (*reduced and carboxymethylated j-casein*) ou em um lipossomo. (60-61)

Figura 38 – Imagens de microscopia confocal do filme LB com curcumina, com a gota antes (a) e depois de seca (b).

Fonte: Elaborada pela autora

Antes da secagem por completo, foram realizados ciclos de fotoclareamento para analisar se a interação da curcumina com o filme era forte ou fraca. Aqui, foi utilizado um canal de detecção, na região de emissão da curcumina, para comparar a intensidade de luz coletada a cada instante de tempo. Na Figura 39 é possível ver que após o tratamento na região marcada em vermelho há diminuição na intensidade de emissão no verde, mostrando de fato a degradação da curcumina.

Figura 39 – Imagem de microscopia confocal da superfície do filme na gota antes (a) e depois (b) do fotoclareamento. Ele foi realizado na região marcada com um quadrado vermelho. A região circulado em verde foi usada como controle.

Fonte: Elaborada pela autora

O gráfico da Figura 40 mostra a intensidade de fluorescência em função do tempo. Observa-se que a interação é fraca uma vez que a fluorescência é retomada em minutos. É importante notar que depois do primeiro ciclo a intensidade que retorna é maior que a original, indicativo de que ocorreu modificação na camada de lipídios de tal forma que alojou uma maior quantidade de curcumina. O mesmo fenômeno foi observado numa medida em duplicata. Os resultados corroboram os das monocamadas, nas quais houve aumento da estabilidade com a irradiação do filme lipídico com curcumina. O fotoclareamento produz EROs, que interagem com a camada de lipídios tornando-os mais hidrofílicos, alterando, assim, o empacotamento e a quantidade de curcumina que pode interagir com a cadeia apolar.

Figura 40 – Gráfico da intensidade fluorescência (u.a.) por tempo, dado quatro ciclos de fotoclareamento (região 1). A região 2 foi usada como controle.

Fonte: Elaborada pela autora

4 CONCLUSÕES

A partir da série de resultados apresentados, conclui-se que os FSs curcumina e azul de metileno interagem com a monocamada lipídica do extrato de *E. coli*. Além disso, verificou-se que, com a curcumina incorporada ao filme, há um efeito da foto-oxidação quando o filme é irradiado com LED azul. Tal efeito foi constatado pelo aumento na estabilidade do filme, da mesma forma que Aoki et al. (11) observaram para o filme de DOPC com eritrosina incorporada. O fotoclareamento visualizado com um microscópio confocal de varredura a laser confirmou a alteração química do filme LB, de modo a comportar mais curcumina após a primeira interação. Tais dados indicam a formação de hidroperóxidos de lipídios, polares devido ao grupo –OOH adicionado à sua cadeia de hidrocarboneto. Isso faz com que haja uma mudança conformacional nas caudas dos fosfolipídios, de modo a aumentar a área de contato com o líquido na subfase ou com a solução de curcumina da gota pingada sobre o filme LB. De acordo com Baccelar et al. (8), em uma bicamada lipídica, a adição do grupo –OOH é estabilizada pela interação deste com as cabeças polares dos fosfolipídios. Há um aumento na área ocupada pelos lipídios devido à curvatura causada em suas caudas, o que gera aumento em área e diminuição em espessura na bicamada. Para o extrato lipídico total de *E. coli*, não foi realizada a irradiação do filme com o azul de metileno incorporado. Portanto, nada se pode afirmar sobre a ação deste na monocamada. Apenas foi verificada a ocorrência de interação. Um passo futuro será o estudo da foto-ativação desse FS na monocamada lipídica.

Nos estudos com os lipídios puros, verificou-se incorporação da curcumina aos filmes. Porém, isso não ocorreu com o AM, ao que atribuímos à presença de carga neste último. Os sais do tampão provavelmente competem pelas moléculas do AM, não permitindo que se adsorvam ao filme. A irradiação não produziu nenhum efeito observável, nem à estabilidade dos filme à pressão de 30 mN/m, nem ao potencial de superfície. Isso indica que, se houver oxigênios singletos formados pela TFD, eles não chegaram a atacar as moléculas dos fosfolipídios no filme. Pode ter ocorrido oxidação por espécies reativas presentes no ar, que afetou a todos os filmes, havendo ou não FSs e irradiação. Assim, não conseguimos uma resposta para qual fosfolipídio responderia melhor à TFD.

Uma vez que houve efeito para o filme do extrato de *E. coli* mas não houve para os lipídios isolados, pode-se cogitar que a organização do filme possa ser importante para o ataque pelos oxigênios singletos. A mistura lipídica presente no extrato, com diversos

tamanhos de caudas e graus de insaturação e diferentes cabeças polares, confere ao filme uma fluidez mais elevada (como verificado pelas curvas do módulo de compressibilidade), e podem-se formar “ilhas” com diferentes composições lipídicas no filme. Tal hipótese pode ser testada, e comparada com os resultados obtidos por Aoki et al. (11) para filmes de DOPC e DPPC com eritrosina, em subfase aquosa. No trabalho de Aoki et al (11), percebeu-se o efeito da irradiação nos filmes, o que pode ter ocorrido por causa do FS utilizado, ou também por ter sido usada água pura na subfase.

Devido à complexidade das interações e dependência das propriedades dos filmes de Langmuir com a subfase e composição lipídica, constata-se que são necessários mais estudos para avaliar a ação dos 2 FSs em modelos de membrana de bactéria. Podemos utilizar misturas de lipídios para verificar se a formação de domínios afeta a ação da TFD, por exemplo. Podemos também mudar a subfase, pois em PBS não houve sequer a interação do AM com os lipídios sintéticos isolados. Técnicas de espectroscopia podem ser utilizadas para acrescentar informações sobre a forma de interação entre os lipídios e os FSs. Outro estudo interessante seria da interação dos FSs com o LPS da membrana externa das Gram-negativas, já que primeiramente eles precisam infiltrar pela parede celular para chegar à membrana plasmática. Apesar de os resultados apresentados aqui terem fornecido informações relevantes sobre FSs interagindo com um mimético de membrana plasmática de bactérias Gram-negativas, sendo também consistentes com a literatura, é inevitável concluir que muito ainda precisa ser estudado para obter informações em nível molecular. E isso é essencial para determinar a ação de diferentes FSs, e com isso poder desenvolver fármacos eficazes e seguros, que utilizem da IFD para o tratamento de infecções bacterianas.

REFERÊNCIAS

- 1 KASHEF, N.; HAMBLIN, M. R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? **Drug Resistance Updates**, v. 31, p. 31–42, 2017. doi.org/10.1016/j.drug.2017.07.003
- 2 VERA, D. M. A. et al. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 499–511, 2012.
- 3 WAINWRIGHT, M. et al. Photoantimicrobials—are we afraid of the light? **Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. e49–e55, 2017.
- 4 DAI, T.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3–4, p. 170–188, 2009.
- 5 WORLD HEALTH ORGANIZATION. The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44812/1/9789241503181_eng.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2017.
- 6 AWAD, M. M. et al. Important cellular targets for antimicrobial photodynamic therapy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7679–7688, 2016.
- 7 ALVES, E. et al. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 141–64, 2014.
- 8 BACELLAR, I. O. L. et al. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20523–20559, 2015.
- 9 LOPES, D. et al. Evaluation of the interplay among the charge of porphyrinic photosensitizers, lipid oxidation and photoinactivation efficiency in Escherichia coli. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 141, n. 1, p. 145–153, 2014.
- 10 JOHNSON, G. A. et al. Photoinduced membrane damage of E. coli and S. aureus by the photosensitizer-antimicrobial peptide conjugate eosin-(KLAKLAK)2. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 7–10, 2014.
- 11 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.
- 12 SCHMIDT, T. F. et al. Binding of methylene blue onto langmuir monolayers representing cell membranes may explain its efficiency as photosensitizer in photodynamic therapy. **Langmuir**, v. 31, n. 14, p. 4205–4212, 2015.
- 13 SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. a000414, 2010.

- 14 CHATTERJEE, S. N.; CHAUDHURI, K. Gram-negative bacteria: the cell membranes. In:_____. **Outer membrane vesicles of bacteria**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. cap. 2, p. 15-34.
- 15 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Anatomia funcional de células procarióticas e eucarióticas. In:_____. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 4, p. 76-112.
- 16 SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720–731, 1972.
- 17 FENDLER, J. H. Interactions and kinetics in membrane mimetic systems. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 137–157, 1984.
- 18 PAVINATTO, F. J. **Interação entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)**. 2010. 161p. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 19 TABOR, D. Babylonian Lecanomanancy: an ancient text on the Spreading of oil on water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 75, n. 1, p. 240-245, 1980.
- 20 OLIVEIRA, R. F. et al. M. Filmes nanoestruturados: técnicas de Langmuir-Blodgett (LB) e layer-by-layer (LbL). In: DA RÓZ, A. L. et al. (Ed.). **Nanoestruturas: princípios e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. cap. 4, p. 121-145.
- 21 BREZESINSKI, G.; MÖHWALD, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100–102, p. 563–584, 2003. doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00071-4
- 22 BIOLIN SCIENTIFIC. Langmuir and Langmuir-Blodgett devices – KSV NIMA Software Manual. revision 1.4. 2013. Disponível em: <http://www.ccmr.cornell.edu/wp-content/uploads/sites/2/2015/11/KSV-NIMA-LB-Software-Manual_v1.4.pdf>. Acesso em 22 dez. 2017
- 23 MENDELSON, R.; MAO, G.; FLACH, C. R. Infrared reflection-absorption spectroscopy: principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. **Biochimica et Biophysica Acta - biomembranes**, v. 1798, n. 4, p. 788–800, 2010.
- 24 CASELI, L. et al. Enzymatic activity of alkaline phosphatase adsorbed on dimyristoylphosphatidic acid Langmuir-Blodgett films. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 25, n. 2, p. 119–128, 2002.
- 25 ITTRI, R. et al. Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 47–61, 2014.
- 26 TARDIVO, J. P. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175–191, 2005.

- 27 RAGHAVENDRA, M.; KOREGOL, A.; BHOLA, S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. **Australian Dental Journal**, v. 54, p. S102–S109, 2009. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01148.x
- 28 ARAÚJO, N. C. et al. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 2, p. 96–101, 2012.
- 29 CHEN, G. et al. Interaction between curcumin and mimetic biomembrane. **Science China Life Sciences**, v. 55, n. 6, p. 527–532, 2012.
- 30 SORIA-LOZANO, P. et al. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 187, 2015.
- 31 HIBBS, A. R. What is confocal microscopy? In:_____. **Confocal microscopy for biologists**. New York: Springer, 2004. cap. 1, p 1-29.
- 32 ROMANO, R. A. **Aumento da eficiência da inativação fotodinâmica pela incorporação de fotossensibilizador induzida por luz em *Candida Albicans***. 2016. 115 p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 33 MURPHY, D. B. **Fundamentals of light microscopy and electronic imaging**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- 34 HIBBS, A. R. Confocal microscopy techniques. In:_____. **Confocal microscopy for biologists**. New York: Springer, 2004. cap. 10, p 239-257.
- 35 VOET, D.; VOET, J. G. PRATT, C. W. Lipídios e membranas biológicas. In:_____. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. cap. 9, p. 233-283.
- 36 PHOSPOLIPIDS. Disponível em: <<https://avantilipids.com/product-category/products/phospholipids/>>. Acesso em: 22 dez. 2017.
- 37 WICHITNITHAD, W. et al. Effects of different carboxylic Ester spacers on chemical stability, release characteristics, and anticancer activity of mono-PEGylated curcumin conjugates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 12, p. 5206–5218, 2011.
- 38 PHOSPHATE-buffered saline (PBS). **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, n. 1, 2006. doi:10.1101/pdb.rec8247.
- 39 PEETLA, C.; STINE, A.; LABHASETWAR, V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1264–1276, 2009.
- 40 BRONIATOWSKI, M.; FLASIN, M.; DYNAROWICZ-ŁA, P. Grazing incidence diffraction and x-ray reflectivity studies of the interactions of inorganic mercury salts with

membrane lipids in Langmuir monolayers at the air / water interface. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 29, p. 9474–9484, 2010.

41 BIOLIN SCIENTIFIC – KSV NIMA surface potential sensor. Disponível em: <https://cdn2.hubspot.net/hubfs/516902/Pdf/KSV%20NIMA/Brochures/KN_P_Spot_Brochure.pdf>. Acesso em 22 dez. 2017

42 DEMCHAK, R. J.; FORT, T. Surface dipole moments of close-packed un-ionized monolayers at the air-water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 46, n. 2, p. 191–202, 1974.

43 OLIVEIRA, O. N.; BONARDI, C. The surface potential of Langmuir monolayers revisited. **Langmuir**, v. 13, n. 22, p. 5920–5924, 1997.

44 TAYLOR, D. M. Developments in the theoretical modelling and experimental measurement of the surface potential of condensed monolayers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 187, n. 2-3, p. 183–203, 2000.

45 VOGEL, V.; MÖBIUS, D. Local surface potentials and electric dipole moments of lipid monolayers : contributions of the water / lipid and the lipid / air interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 126, n. 2, p. 408–420, 1988.

46 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.

47 MILEYKOVSKAYA, E.; DOWHAN, W. Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 10, p. 2084–2091, 2009.

48 PHAN, M. D.; SHIN, K. Effects of cardiolipin on membrane morphology: a Langmuir monolayer study. **Biophysical Journal**, v. 108, n. 8, p. 1977–1986, 2015.

49 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.

50 MORANDAT, S. et al. Plasmalogens protect unsaturated lipids against UV-induced oxidation in monolayer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - biomembranes**, v. 1616, n. 2, p. 137–146, 2003.

51 ORTIAL, S. et al. PBN derived amphiphilic spin-traps. II/study of their antioxidant properties in biomimetic membranes. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 113, n. Supplement C, p. 384–393, 2014.

52 GOMES, P. J. et al. Radiation damage on Langmuir monolayers of the anionic 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (sodium salt)(DPPG) phospholipid at the air-DNA solution interface. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 576–579, 2016. doi: 10.1016/j.msec.2015.09.017.

- 53 MOGHADDAM, B. et al. Exploring the correlation between lipid packaging in lipoplexes and their transfection efficacy. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 4, p. 848–864, 2011.
- 54 WYDRO, P.; WITKOWSKA, K. The interactions between phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamines in model bacterial membranes: the effect of the acyl chain length and saturation. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 72, n. 1, p. 32–39, 2009.
- 55 NOWOTARSKA, S. W.; NOWOTARSKI, K. J.; FRIEDMAN, M.; SITU, C. Effect of structure on the interactions between five natural antimicrobial compounds and phospholipids of bacterial cell membrane on model monolayers. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7497–7515, 2014.
- 56 XU, G.; HAO, C.; ZHANG, L.; SUN, R. Investigation of surface behavior of DPPC and curcumin in Langmuir monolayers at the air-water interface. **Scanning**, v. 2017, p. 6582019, 2017.
- 57 KAREWICZ, A. et al. Interaction of curcumin with lipid monolayers and liposomal bilayers. **Colloids and surfaces B: biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 231–239, 2011.
- 58 LIU, W. et al. Lipid compositions modulate fluidity and stability of bilayers: characterization by surface pressure and sum frequency generation spectroscopy. **Langmuir**, v. 29, n. 48, p. 15022–15031, 2013.
- 59 EFTAIHA, A.; M. K. BRUNET, S.; F. PAIGE, M. A comparison of atomic force microscopy, confocal fluorescence microscopy and brewster angle microscopy for characterizing mixed monolayer surfactant films. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current microscopy contributions to advances in science and technology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2012. v. 2, p. 1438–1447.
- 60 HUDSON, S. A. et al. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. **FEBS Journal**, v. 276, n. 20, p. 5960–5972, 2009.
- 61 NIU, Y. et al. Effects of curcumin concentration and temperature on the spectroscopic properties of liposomal curcumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 1865–1870, 2012.