

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

KEVIN FIGUEIREDO DOS SANTOS

Influência do Citocromo P450 3A4 e da composição lipídica da membrana para
atividade da Doxorubicina

São Carlos

2023

KEVIN FIGUEIREDO DOS SANTOS

Influência do Citocromo P450 3A4 e da composição lipídica da membrana para
atividade da Doxorrubicina

Tese 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 Doutor em Ciências.

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

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2023

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.

Santos, Kevin Figueiredo dos
Influência do Citocromo P450 3A4 e da composição lipídica da membrana para atividade da Doxorubicina / Kevin Figueiredo dos Santos; orientador Osvaldo Novais de Oliveira Junior - versão corrigida -- São Carlos, 2023.
119 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Citocromo P450 3A4. 2. Doxorubicina. 3. Resistência a quimioterápicos. 4. Monocamadas de Langmuir. 5. Modelos de membrana. I. Oliveira Junior, Osvaldo Novais de, orient. II. Título.

Aos meus pais, Gildo e Juscineide,
por todo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Chu, pela oportunidade, paciência e todo o suporte. Sou grato a liberdade para o desenvolvimento desse projeto, por todas as discussões e ensinamentos. Também por me conectar com pessoas que foram fundamentais no meu doutoramento, como a Elsa (coorientadora não oficial), que contribuiu em todas as etapas desse trabalho, desde sua idealização, participando de todas as discussões, ajudando na aquisição de reagentes, e ainda não me deixando desamimar perante aos desafios. Ao Juan pelos ensinamentos em dinâmica molecular, que mesmo no final de seu doutorado conseguiu encontrar tempo e paciência para ajudar um iniciante na área. Aos professores que tive o privilégio de conhecer durante o doutoramento e membros da minha banca de qualificação, que contribuíram para o meu crescimento e melhora desse trabalho.

Ao grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross”, as secretárias (Rosângela e Simone), e ao corpo técnico por todo suporte. Em especial, agradeço a Débora B. pelo treinamento experimental, paciência e ajuda mesmo quando não era sua atribuição. Aos pesquisadores (as) que trabalharam na sala limpa, pelas discussões, ideias e companhia. Era sempre bom ter outras opiniões e desabafar quando os “mistérios da sala limpa” aconteciam. A todos os amigos (as) que passaram pelo grupo, pelos momentos de confraternização, pelos cafés, e parceria mesmo em momentos turbulentos como durante a pandemia.

Sou grato a minha família, Gildo, Juscineide, Ariel, Kimberly e Thamirys, por todo o carinho, positividade e incentivo. Não foi fácil “acostumar” ficar longe de vocês, perdendo momentos importantes, como o nascimento das nossas pequenas Emanuelle e Alice. Obrigado por entenderem.

Agradeço a Universidade de São Paulo e o Instituto de Física de São Carlos por permitir a realização desse trabalho. Também aos órgãos de fomento, FAPESP (2016/00991-5, 2018-22214-6), INEO, CNPq, e ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de financiamento 001.

RESUMO

SANTOS, K. F. **Influência do Citocromo P450 3A4 e da composição lipídica da membrana para atividade da Doxorrubicina.** 2023. 119 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

A resistência a quimioterápicos é a principal causa para o insucesso da quimioterapia. Essa resistência surge de vários mecanismos, incluindo alterações na atividade dos Citocromos P450, responsáveis pelo metabolismo de diversos medicamentos. Essas enzimas estão predominantemente localizadas nas membranas do retículo endoplasmático (ER). Por isso, uma estratégia para estudar os efeitos desses citocromos é usar modelos de membrana. Neste trabalho, investigamos a influência do sistema do citocromo P450 3A4 (CYP3A4) e da composição lipídica de monocamadas de Langmuir na interação do quimioterápico Doxorrubicina (DOX). Empregou-se um modelo de membrana do ER com a mistura de colesterol (Chol), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) e L- α -fosfatidilinositol (PI). Para mimetizar membranas de células cancerosas, variamos o conteúdo de colesterol e fosfatidilinositol. A incorporação do CYP3A4 causou maiores alterações na monocamada mais condensada e com maior quantidade de Chol. Foram observadas menores variações no modelo de membrana mais expandido contendo maior fração de PI. A adsorção da DOX provocou expansão e aumento da fluidez nas monocamadas. Assim como para o CYP3A4, as interações da DOX foram mais pronunciadas na monocamada contendo maior concentração de Chol, e menos intensas para o modelo com maior conteúdo de PI. Essas diferenças entre as monocamadas destacam a importância da composição lipídica para as atividades do CYP3A4 e da DOX. As alterações provocadas pela DOX foram consideravelmente reduzidas quando o CYP3A4 foi incorporado nas monocamadas. Essa atenuação pode estar associada à formação de complexos CYP3A4-DOX (enzima-substrato) como sugerem os espectros de espectroscopia no infravermelho. O resultado é consistente com a hipótese de que o CYP3A4 pode estar envolvido na resistência à DOX. A atuação do CYP3A4 e a importância da composição lipídica da membrana, observadas nesta tese, podem ser exploradas no desenvolvimento de estratégias para melhorar a eficácia da quimioterapia.

Palavras-chave: Citocromo P450 3A4. Doxorrubicina. Resistência a quimioterápicos. Monocamadas de Langmuir. Modelos de membrana.

ABSTRACT

SANTOS, K. F. **Influence of Cytochrome P450 3A4 and membrane lipid composition on Doxorubicin activity.** 2023. 119 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Drug resistance is the principal cause of chemotherapy failure owing to mechanisms such as alterations in the activity of Cytochrome P450 enzymes responsible for the metabolism of many drugs. As these enzymes are mainly located in the endoplasmic reticulum (ER) membranes, one strategy to investigate this failure is to employ membrane models. In this study, we investigated the influence of the Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) system and the lipid composition of Langmuir monolayers on the interaction with Doxorubicin (DOX). We employed an ER membrane model with a mixture of cholesterol (Chol), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE), and L- α -phosphatidylinositol (PI). To mimic cancer cell membranes, we varied the content of cholesterol and phosphatidylinositol. The incorporation of CYP3A4 caused larger changes in the more condensed monolayer with a higher amount of Chol. Smaller variations were observed in the more expanded membrane model containing a higher fraction of PI. The adsorption of DOX resulted in expansion and increased fluidity in the monolayers. Similar to CYP3A4, DOX interactions were more pronounced in the monolayer with a higher concentration of Chol and less intense for the model with higher PI content. These differences between the membrane models highlight the importance of lipid composition in the activities of CYP3A4 and DOX. The alterations induced by DOX were considerably reduced when CYP3A4 was incorporated into the monolayers. This attenuation may be associated with the formation of CYP3A4-DOX complexes (enzyme-substrate), as supported by infrared spectroscopy measurements. These results are consistent with the hypothesis of CYP3A4 being involved in DOX resistance. The role of CYP3A4 and the importance of membrane lipid composition reported in this study may be exploited to develop strategies for enhancing chemotherapy efficacy.

Keywords: Cytochrome P450 3A4. Doxorubicin. Anticancer drug resistance. Langmuir monolayers. Membrane models.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação dos mecanismos de resistência de células cancerosas à quimioterapia.....	25
Figura 2-	Esquema da transferência de elétrons do NADPH para o citocromo P450 mediada pela proteína POR. O NADPH se liga à proteína POR ancorada no retículo endoplasmático, e doa elétrons para a FAD. Alterações na conformação da proteína POR permitem a transferência de elétrons entre a FAD e a FMN, que interage com o citocromo P450, transferindo elétrons para seu sítio ativo e habilitando sua atividade catalítica.....	28
Figura 3-	Ilustração dos principais componentes de uma biomembrana.....	30
Figura 4-	Representação da distribuição dos principais lipídios [bis-monoacilglicerol-fosfato (BMP), colesterol (Chol), cardiolipina (CL), esfingomiéline (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), e fosfatidilserina (PS)] presentes em organelas de mamíferos.....	30
Figura 5-	Ilustração esquemática do transporte passivo e ativo de moléculas em biomembranas.....	32
Figura 6-	Representação esquemática das principais diferenças na composição lipídica e no pH extracelular (pHe), associadas as biomembranas de células normais e cancerosas.....	34
Figura 7-	Representação das arquiteturas dos principais modelos de membrana: as vesículas, as monocamadas lipídicas e as bicamadas em suportes sólidos.....	35
Figura 8-	Isoterma π -A do DPPC em PBS pH 7,4 com temperatura em 22 °C, e a representação esquemática do arranjo molecular nas fases: gasosa (G), líquido-expandida (LE) e líquido-condensada (LC).....	38
Figura 9-	Representação das principais caracterizações das monocamadas de Langmuir, e as informações obtidas.....	39
Figura 10-	Ilustração dos métodos experimentais para adição de BSA nas monocamadas de SOPC. As proteínas dissolvidas na subfase são representadas por esferas verdes, quando interagem com a parte polar dos lipídios em esferas azuis, e as presentes na interface ou interagindo com a cadeia apolar dos lipídios em esferas vermelhas.....	41
Figura 11-	Representação esquemática do deslocamento da DOX nas membranas de células sensíveis e resistentes ao quimioterápico. O menor empacotamento e a maior fluidez das membranas de células sensíveis, contribuem para difusão da DOX. Em contraste, as membranas de células resistentes são mais condensadas e menos fluidas, dificultando o deslocamento da droga para o ambiente intracelular.....	43
Figura 12-	Esquema da formação de espécies reativas de oxigênio associada a redução da DOX pela proteína P450 oxidorreductase.....	45
Figura 13-	Estrutura química do Chol (a), DPPC (b), DPPE (c) e PI (d).....	47
Figura 14-	Representação gráfica da distribuição percentual de lipídios nos modelos M1, M4 e M7.....	48
Figura 15-	Ilustração esquemática das etapas para obtenção das isotermas dos modelos de membrana (M1, M4 e M7) + CYP3A4 + NADPH + DOX. Primeiro, espalhou-se a solução de lipídios (1 mmol/L) na interface (1). Após 20 minutos para evaporação do solvente, foram adicionados 25 μ L do CYP3A4 (50 nmol/L) na interface (2). Para incorporação do CYP3A4, aguardou-se 120 minutos, e seguiu-se com a injeção de 200 μ L do NADPH (3 mmol/L) na subfase (3). Após 60 minutos de interação com o NADPH, 200 μ L de DOX (1 mmol/L) foram injetados na subfase (4). Depois de 60 minutos de interação com a DOX, foram obtidas as isotermas de pressão superficial-área (5).....	50
Figura 16-	Ilustração do aparato experimental (A) e do princípio da microscopia no ângulo de Brewster (B).....	51

Figura 17-	Isotermas π -A do Chol, DPPC, DPPE e PI em PBS pH 7,4 com temperatura em 22 °C. A figura inserida mostra os respectivos módulos de compressibilidade superficial.	55
Figura 18-	Isotermas π -A do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não CYP3A4 em PBS pH 7,4 com temperatura em 22 °C. As figuras inseridas mostram os respectivos módulos de compressibilidade superficial.	56
Figura 19-	Imagens de microscopia no ângulo de Brewster do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não CYP3A4 em PBS pH 7,4 a 22 °C, para diferentes pressões superficiais. A barra de escala representa 50 μ m.	59
Figura 20-	IDMAP das isotermas do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não CYP3A4. Cada círculo representa uma isoterma na faixa de 3 - 30 mN/m, com o cluster indicando a triplicata. A barra de escala retrata a referência para o cálculo da distância relativa entre os clusters, apresentada no quadro superior.	60
Figura 21-	IDMAP dos módulos de compressibilidade superficial do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não CYP3A4. Cada círculo representa o módulo de compressibilidade na faixa de 3 - 30 mN/m, e o cluster a triplicata do sistema. A barra de escala retrata a referência para o cálculo da distância relativa, mostrada no quadro.	61
Figura 22-	Isotermas π -A do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não DOX em PBS pH 7,4 a 22 °C. As figuras inseridas mostram os respectivos módulos de compressibilidade superficial. Ao lado, estão as imagens de BAM dos respectivos sistemas em 30 mN/m, com a barra de escala representando 50 μ m.	62
Figura 23-	Principais domínios da DOX: o anel dihidroxiantraquinona e o grupo daunosamina.	64
Figura 24-	IDMAP das isotermas do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não DOX. Cada círculo representa uma isoterma na faixa de 4 - 35 mN/m, com o cluster indicando a triplicata. A barra de escala retrata a referência para o cálculo da distância entre os clusters, apresentada no quadro.	66
Figura 25-	Espectros PM-IRRAS dos lipídios contendo ou não DOX em PBS pH 7,4 a 22 °C na pressão superficial de 30 mN/m.	67
Figura 26-	IDMAP dos espectros PM-IRRAS dos lipídios contendo ou não DOX em 30 mN/m. Cada círculo representa um espectro na região de 1000 - 1800 cm^{-1} . A barra de escala possui unidade arbitrária, sendo apenas uma referência para o cálculo da distância entre os pontos, mostrada no quadro.	69
Figura 27-	IDMAP dos espectros PM-IRRAS (2800 - 3000 cm^{-1}) dos lipídios com e sem DOX em 30 mN/m. No quadro estão as distâncias relativas entre os pontos, com a barra de escala como referência.	69
Figura 28-	Isotermas π -A dos modelos de membrana em PBS pH 7,4 com temperatura em 22 °C. A figura inserida mostra os respectivos módulos de compressibilidade superficial.	71
Figura 29-	IDMAP das isotermas dos modelos de membrana e seus componentes lipídicos. Cada círculo representa uma isoterma (região de 105 - 25 \AA^2), com o cluster indicando a triplicata. A barra de escala é referência para o cálculo da distância relativa entre os clusters, apresentada no quadro superior.	71
Figura 30-	Área (ΔA_{exc}) e energia livre de Gibbs (ΔG_{exc}) em excesso dos modelos de membrana para diferentes pressões de superfície.	73
Figura 31-	Cinética de adsorção do CYP3A4 ao modelo de membrana M1, mediante sua adição na subfase e interface.	74
Figura 32-	Isoterma π -A e o módulo de compressibilidade superficial do CYP3A4 em PBS pH 7,4 com temperatura em 22 °C.	75
Figura 33-	Isotermas π -A do modelo M1 em PBS pH 7,4 a 22 °C com diferentes concentrações do CYP3A4, e seus respectivos módulos de compressibilidade superficial.	76

Figura 34-	Isotermas π -A e módulos de compressibilidade superficial dos modelos de membrana com e sem CYP3A4 e/ou NADPH em PBS pH 7,4 a 22 °C.....	78
Figura 35-	IDMAP das isotermas dos modelos de membrana com e sem CYP3A4 e/ou NADPH. As distâncias relativas entre os clusters são apresentadas no quadro superior, com a barra de escala como referência.	79
Figura 36-	Espectros PM-IRRAS dos modelos de membrana com e sem CYP3A4 e/ou NADPH em 30 mN/m. Na parte superior são mostrados os espectros do CYP3A4 em PBS pH 7,4 na ausência de lipídios em 10 e 30 mN/m.	80
Figura 37-	Cinética de adsorção da DOX ao modelo de membrana M1 em PBS pH 7,4 a 22 °C.	82
Figura 38-	Isotermas π -A dos modelos M1, M4 e M7 contendo ou não DOX em PBS pH 7,4 a 22 °C. As figuras inseridas mostram os respectivos módulos de compressibilidade superficial. Ao lado, estão as imagens de BAM dos respectivos sistemas em 30 mN/m, com a barra de escala representando 50 μ m.	84
Figura 39-	IDMAP das isotermas dos modelos M1, M4 e M7 contendo ou não DOX. As distâncias entre os clusters são apresentadas no quadro, com a barra de escala como referência.	86
Figura 40-	Espectros PM-IRRAS dos modelos de membrana contendo ou não DOX em PBS pH 7,4 a 22 °C para pressão superficial de 30 mN/m.	88
Figura 41-	IDMAP dos espectros PM-IRRAS (1000 - 1800 cm^{-1}) dos modelos de membrana contendo ou não DOX. As distâncias relativas são apresentadas no quadro, com a barra de escala como referência.	89
Figura 42-	IDMAP dos espectros PM-IRRAS (2800 - 3000 cm^{-1}) dos modelos de membrana contendo ou não DOX. As distâncias relativas são apresentadas no quadro, com a barra de escala como referência.	90
Figura 43-	Isotermas π -A dos modelos de membrana com CYP3A4, na presença ou ausência de NADPH e/ou DOX, em PBS pH 7,4 a 22 °C. As figuras inseridas mostram os módulos de compressibilidade superficial. Ao lado, estão as imagens de BAM dos sistemas correspondentes na pressão de 30 mN/m, com a barra de escala representando 50 μ m.	93
Figura 44-	Ilustração do aumento da área ocupada por moléculas de POPC, associado à oxidação das cadeias alifáticas por espécies reativas de oxigênio.	94
Figura 45-	IDMAP das isotermas dos modelos de membrana contendo ou não CYP3A4, NADPH e DOX. As distâncias relativas entre os clusters são apresentadas no quadro, com a barra de escala como referência.	96
Figura 46-	Espectros PM-IRRAS dos modelos de membrana com CYP3A4, contendo ou não NADPH e/ou DOX, em PBS pH 7,4 a 22 °C, a uma pressão superficial de 30 mN/m.	98
Figura 47-	Espectros de UV-Vis das soluções de CYP3A4 (1 μ mol/L), DOX (1 mmol/L), e NADPH (3 mmol/L). Ao lado, são mostrados os espectros de UV-Vis da mistura dessas soluções (1:6:6, v/v) para diferentes tempos de interação (0, 15 e 30 minutos).	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Concentração de esfingomielina (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA), cardiolipina (CL), lipídios neutros (NL), diacilglicerol (DAG), colesterol (Chol), triglicerídeos (TG) e ésteres de colesterol (CE) nas células sensíveis (MCF-7) e resistentes ao quimioterápico Doxorubicina (MCF-7/DOX).	34
Tabela 2-	Porcentagem dos componentes lipídicos nos modelos de membrana.	48
Tabela 3-	Área média por lipídio (A) e módulo de compressibilidade superficial (C_s^{-1}) do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não CYP3A4, nas pressões (π) de 10 e 30 mN/m.	57
Tabela 4-	Área média por lipídio (A) e módulo de compressibilidade superficial (C_s^{-1}) do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não DOX, nas pressões (π) de 10 e 30 mN/m.	63
Tabela 5-	Atribuição das bandas na região da amida I com a estrutura secundária de proteínas.	81
Tabela 6-	Área média por lipídio e módulo de compressibilidade superficial dos modelos M1, M4 e M7 contendo ou não DOX, nas pressões de 10 e 30 mN/m.	83
Tabela 7-	Área média por lipídio e módulo de compressibilidade superficial de M1, M4 e M7 contendo CYP3A4, na presença ou ausência de NADPH e DOX, nas pressões de 10 e 30 mN/m.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAM	Microscopia no ângulo de Brewster
BMP	Bis-monoacilglicerol-fosfato
BSA	Albumina de soro bovino
CDDP	Cisplatina
CE	Ésteres de colesterol
Chol	Colesterol
CL	Cardiolipina
CYPs	Citocromos P450
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DAG	Diacilglicerol
DLOPE	1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DMPS	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNR	Daunorrubicina
DOC	Docetaxel
DOX	Doxorrubicina
DOPC	1,2-dioloil-sn-glicero-3-fosfocolina
DOPE	1,2-dioloil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOPG	1,2-dioloil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol
DOPS	1,2-dioloil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPPA	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DPPE	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DPPG	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol
DPPS	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DSPC	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPE	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Retículo endoplasmático
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo

FMN	Flavina mononucleotídeo
GSH	Glutaciona
GST	Glutaciona S-transferase
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293</i>
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i>
IDA	Idarrubicina
IDMAP	<i>Interactive Document Mapping</i>
LC	Líquido-condensada
LE	Líquido-expandida
LB	Langmuir-Blodgett
LS	Langmuir-Schaefer
LUMO	<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>
MCF-7	Linha celular de câncer de mama
MCF-7/DOX	Linha celular de câncer de mama resistente à Doxorubicina
MD	<i>Molecular dynamics</i>
MRPs	<i>Multidrug resistance proteins</i>
MV	Vesícula multilamelar
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NL	Lipídios neutros
OS	Osteossarcomas
PA	Ácido fosfatídico
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PE _x	Plataforma <i>Projection Explorer</i>
PG	Fosfatidilglicerol
P-gp	Glicoproteína-P
pHe	pH extracelular
PI	Fosfatidilinositol
PLPC	1-palmitoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
PM-IRRAS	Espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com modulação de polarização
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
POR	Proteína P450 oxidoredutase

PS	Fosfatidilserina
PTFE	Politetrafluoretileno
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SM	Esfingomielina
SOPC	1-estearoil-2-oleoil-sn-glicerol-3- fosfocolina
TG	Triglicerídeos
THP	Pirarrubicina
UV	Vesícula unilamelar
VC	Vancomicina

LISTA DE SÍMBOLOS

RH	Substrato
ROH	Produto hidroxilado
$[C_{\text{ext}} - C_{\text{int}}]$	Gradiente de concentração da droga na membrana
D	Coefficiente de difusão
h	Espessura da membrana
P	Coefficiente de partição
γ_0	Tensão superficial da subfase
γ	Tensão superficial da subfase contendo as moléculas anfifílicas
π	Pressão de superfície
A	Área molecular média
C_S^{-1}	Módulo de compressibilidade superficial
T	Temperatura
A_{ideal}	Área molecular ideal
X_i	Fração molar de cada componente da mistura
A_i	Área molecular de cada componente da mistura
ΔA_{exc}	Área em excesso
A_{exp}	Área molecular medida experimentalmente
ΔG_{exc}	Energia livre de Gibbs em excesso
N	Constante de Avogadro
θ_B	Ângulo de Brewster
$S_{(d)}$	Espectro PM-IRRAS na presença da monocamada
$S_{(0)}$	Espectro PM-IRRAS na ausência da monocamada
$\delta(x_i, x_j)$	Distância Euclidiana (dissimilaridade) entre as instâncias i e j no espaço original
$d(y_i, y_j)$	Distância Euclidiana (dissimilaridade) entre as instâncias i e j no espaço reduzido
$\delta_{\text{máx}}$	Distância máxima no espaço original
$\delta_{\text{mín}}$	Distância mínima no espaço original
$A_{\pi>0}$	Área molecular inicial (<i>lift-off</i>)
π_c	Pressão de colapso
v_s	Estiramento simétrico
v_a	Estiramento assimétrico
δ	Deformação angular

ΔI_R	Intensidade relativa
$I_{v_s}CH_2$	Intensidade do estiramento simétrico do grupo metileno
$I_{v_a}CH_2$	Intensidade do estiramento assimétrico do grupo metileno
λ_{max}	Comprimento de onda de máxima absorção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Citocromos P450.....	27
1.2	Biomembranas.....	29
1.3	Modelos de membrana	35
1.3.1	Monocamadas de Langmuir	37
1.4	Doxorrubicina (DOX)	44
2	MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.1	Reagentes e soluções.....	47
2.2	Modelos de membrana	48
2.3	Isotermas de pressão superficial-área.....	49
2.4	Cinética de adsorção	50
2.5	Microscopia no ângulo de Brewster.....	50
2.6	Espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com modulação de polarização.....	51
2.7	Técnica de Visualização de Informações IDMAP (<i>Interactive Document Mapping</i>)	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1	Lipídios puros	55
3.2	Lipídios com CYP3A4.....	56
3.3	Lipídios com Doxorrubicina (DOX).....	61
3.4	Modelos de membrana	70
3.5	Modelos de membrana com CYP3A4 e NADPH	73
3.6	Modelos de membrana com DOX.....	82
3.7	Modelos de membrana com CYP3A4, NADPH e DOX	90
4	CONCLUSÕES	103
5	PERSPECTIVAS	105
	REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

A quimioterapia é a principal forma de combate ao câncer, porém sua efetividade é limitada pela resistência intrínseca ou adquirida de células cancerosas.¹ Diversos mecanismos podem estar associados à resistência, incluindo: (I) alterações nas taxas de influxo e efluxo do quimioterápico; (II) mudanças no metabolismo da droga; (III) sequestro do quimioterápico; (IV) modificações nos sítios alvo; (V) ativação das vias de reparo do DNA; (VI) modulação da morte celular; e (VII) o impacto do microambiente tumoral.² A Figura 1 ilustra alguns desses mecanismos.

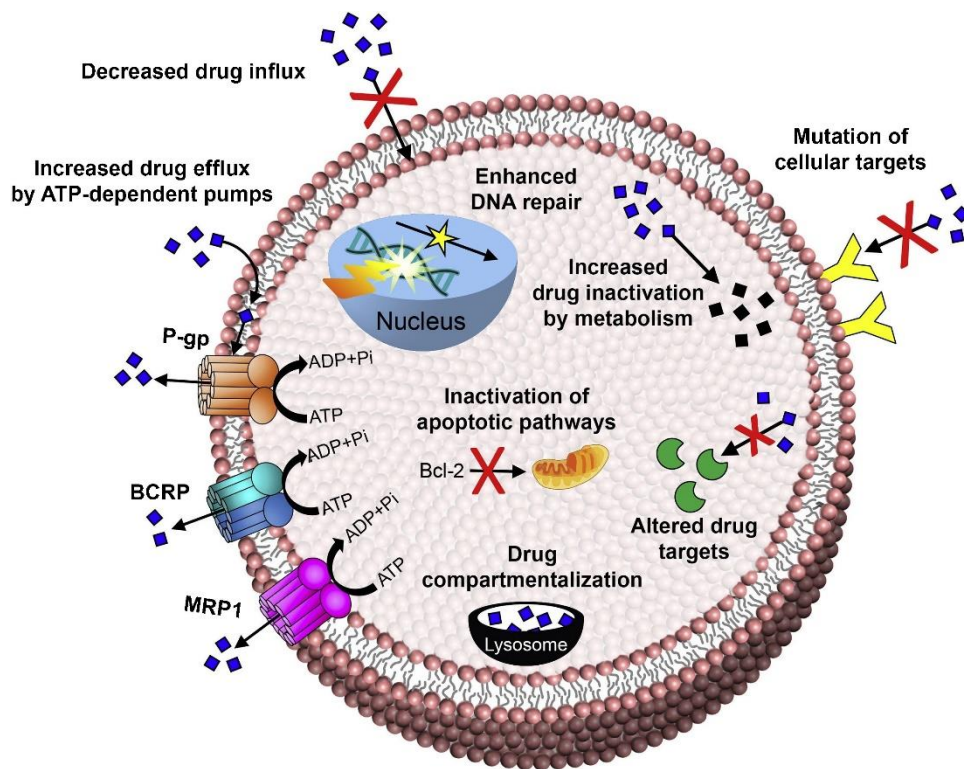


Figura 1 - Representação dos mecanismos de resistência de células cancerosas à quimioterapia.
Fonte: BAR-ZEEV.³

O metabolismo de xenobióticos (drogas e outras substâncias impróprias ao sistema biológico) envolve sua biotransformação para facilitar a excreção.⁴ Esse processo pode ser dividido em duas etapas principais: na Fase 1 há introdução ou modificação de grupos químicos mediante reações de oxidação, redução e hidrólise, que geralmente aumenta a hidrofiliabilidade do composto; a Fase 2 é associada à conjugação de xenobióticos ou metabólitos da Fase 1 com moléculas endógenas, como o ácido glicurônico, ácido sulfônico, glutatona e outros aminoácidos, aumentando sua polaridade.⁴⁻⁵ Os citocromos P450 (CYPs) são as principais enzimas da Fase 1, responsáveis pelo metabolismo de diversos quimioterápicos.⁶⁻⁷ Múltiplos

fatores podem regular a atividade dos CYPs, resultando na variabilidade metabólica e em diferentes respostas farmacológicas.⁸ A sobreexpressão de CYPs pode induzir atenuação dos efeitos citotóxicos de quimioterápicos em células cancerosas.⁹⁻¹⁰ Já a inibição dessas enzimas pode aumentar a concentração de seus substratos, resultando em toxicidade.⁸ Compreender esse caráter multifatorial da ação de CYPs é importante para a eficácia da quimioterapia. Os CYPs são ancorados majoritariamente em biomembranas do retículo endoplasmático (ER).¹¹ Membranas biológicas são estruturas fluidas e heterogêneas que afetam a localização, orientação, e interação dos CYPs com seus substratos.¹²⁻¹⁴ A interação dos CYPs com biomembranas de células cancerosas, que possuem perfis lipídicos diferentes comparados aos de células saudáveis,¹⁵⁻¹⁶ pode afetar a atividade dessas enzimas.

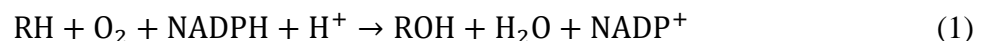
A mimetização parcial de biomembranas por sistemas artificiais possibilita obter informações dificilmente extraídas em sistemas reais.¹⁷⁻¹⁸ Os modelos de membrana mimetizam a estrutura lipídica, permitindo a descrição molecular de interações entre lipídios, proteínas e fármacos.^{17,19} Os principais modelos são as vesículas ou lipossomos, as monocamadas lipídicas, e as bicamadas em suportes sólidos.²⁰ As monocamadas lipídicas são sistemas bidimensionais formados na interface ar-água pela técnica de Langmuir.¹⁸ Esses modelos reproduzem uma camada da membrana, onde moléculas de interesse podem ser adicionadas e suas interações com os lipídios avaliadas.¹⁷ Diversos fenômenos biológicos têm sido investigados com monocamadas de Langmuir,²¹ tornando a técnica adequada para esta pesquisa.

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do sistema do citocromo P450 3A4 (CYP3A4) e da composição lipídica de monocamadas de Langmuir na interação do quimioterápico Doxorrubicina (DOX). Alterações no perfil lipídico são expressas por biomembranas de células cancerosas, e buscou-se demonstrar seu impacto na incorporação de microsomas contendo CYP3A4 e na interação com a Doxorrubicina, o que pode estar ligado à resistência à quimioterapia. Um modelo de membrana do retículo endoplasmático foi desenvolvido com os lipídios colesterol (Chol), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) e L- α -fosfatidilinositol extraído de fígado bovino (PI). Variou-se o conteúdo de Chol e PI para mimetizar alterações na composição esperada em células cancerosas.²²⁻²³ Foi investigada a incorporação do CYP3A4, com sua atividade avaliada adicionando o cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e substrato DOX. A interação do NADPH e da DOX com os modelos de membrana foi também analisada com isotermas de pressão superficial em função da área molecular (isotermas π -A), microscopia no ângulo de Brewster (BAM) e espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com modulação de polarização (PM-IRRAS).

1.1 Citocromos P450

Os citocromos P450 são hemoproteínas responsáveis pelo metabolismo de diversos compostos endógenos e exógenos.²⁴ O termo “P450” é oriundo da máxima absorção em 450 nm dessas proteínas em sua forma reduzida e ligada ao CO.²⁵ Devido à grande variedade, os CYPs são nomeados conforme sua semelhança na sequência de aminoácidos. Os CYPs que exibem $\geq 40\%$ de similaridade pertencem à mesma família, identificados por um número. Se possuírem $\geq 55\%$ de equivalência fazem parte também da mesma subfamília, e são caracterizados por uma letra. Os membros da subfamília são diferenciados por um número.²⁴⁻²⁵ Portanto, o termo CYP3A4 se refere ao membro da família 3, subfamília A e isoforma 4. A localização celular e os parceiros redox permitem agrupar os CYPs em duas classes. A classe I inclui CYPs de mitocôndrias e bactérias, que dependem das proteínas adrenodoxina e adrenodoxina redutase para sua atividade catalítica. A classe II engloba CYPs microssomais localizados no retículo endoplasmático, que recebem elétrons por intermédio da proteína P450 oxidorreductase (POR). No corpo humano foram identificados 57 CYPs, sendo 50 do tipo II predominantemente ligados às membranas do ER.¹¹

Para exercer sua atividade catalítica o CYP precisa de uma molécula doadora de elétrons. No entanto, o CYP não recebe elétrons de maneira direta, ele necessita de uma proteína auxiliar para transferir os elétrons ao seu sítio ativo.²⁶ O mecanismo geral de catálise dos CYPs microssomais pode ser descrito pela equação:



O substrato (RH) sofre hidroxilação a partir de um átomo de oxigênio da molécula de O_2 , formando o produto oxidado (ROH). Nessa reação, uma molécula de água é liberada. Em cada ciclo de oxidação, dois elétrons são fornecidos à proteína P450 oxidorreductase pela molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), e transferidos ao sítio ativo do CYP.²⁶ A proteína POR é formada por três regiões funcionais, as quais envolvem a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a flavina mononucleotídeo (FMN) e um segmento flexível que une estes domínios.²⁶ Esse segmento permite à POR alterar sua conformação, contribuindo para o transporte de elétrons na reação redox. A Figura 2 ilustra a transferência de elétrons do NADPH para o citocromo P450 mediada pela proteína POR.

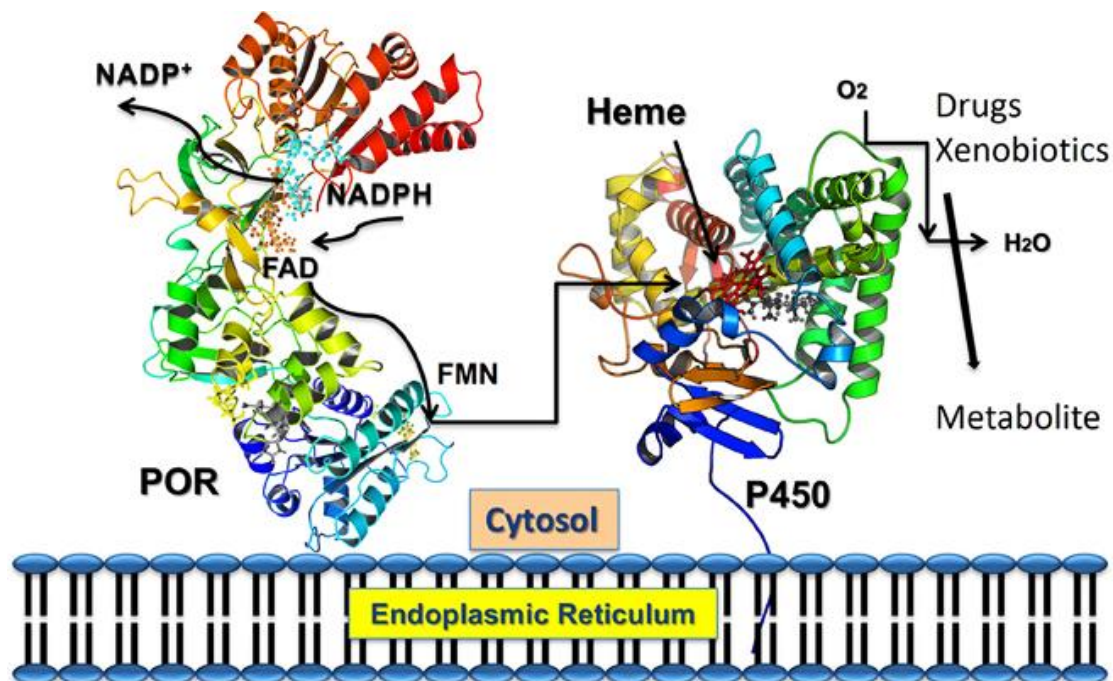


Figura 2 - Esquema da transferência de elétrons do NADPH para o citocromo P450 mediada pela proteína POR. O NADPH se liga à proteína POR ancorada no retículo endoplasmático, e doa elétrons para a FAD. Alterações na conformação da proteína POR permitem a transferência de elétrons entre a FAD e a FMN, que interage com o citocromo P450, transferindo elétrons para seu sítio ativo e habilitando sua atividade catalítica.

Fonte: PANDEY.²⁷

A capacidade de promover transformações químicas e a existência de múltiplos substratos²⁸ demonstram a versatilidade dos CYPs. O CYP3A4 é o mais abundante do corpo humano, e fundamental para o metabolismo de xenobióticos. Ele se localiza prioritariamente no fígado e intestino, sendo responsável pela biotransformação de aproximadamente 50% dos medicamentos.²⁹ Essas enzimas também são encontradas em outras partes do corpo humano, sendo sua expressão intratumoral relevante devido à capacidade de os CYPs afetarem a eficácia de quimioterápicos.³⁰ De forma geral, a atividade metabólica do CYP3A4 associada aos quimioterápicos envolve: a transformação de pró-fármacos (substâncias com mínima ou nenhuma atividade contra o alvo farmacológico na sua forma primária, como o Tamoxifeno) em metabólitos ativos ou mais ativos, o que pode resultar em maior toxicidade; ou a inativação de quimioterápicos relacionada à formação de metabólitos inativos pelo CYP3A4 (por exemplo, o Paclitaxel e a Doxorubicina).³¹

Dhaini *et al.*¹⁰ analisaram a expressão de Citocromos P450 em biópsias de osteossarcomas (OS). Seus resultados mostram uma elevada frequência de expressão de CYP3A4/5 (80%), o que pode ser utilizado para identificar prognóstico desfavorável e auxiliar na seleção de um tratamento apropriado desses tumores. A variação da expressão e atividade de CYPs, seja por fatores genéticos, fisiológicos ou ambientais, pode provocar problemas

terapêuticos.³² A ação excessiva dessas enzimas pode diminuir a biodisponibilidade de fármacos no plasma ou sítio alvo, resultando na redução de sua efetividade. Rodríguez-Antona *et al.*³³ investigaram a influência da expressão do CYP3A4 na toxicidade da Doxorubicina. A concentração de DOX necessária para causar a morte de 50% de células HEK293, concentração inibitória média (IC50), foi 7,5 vezes maior para as células com alta expressão de CYP3A4. Em outras palavras, o aumento da concentração de CYP3A4 reduziu a toxicidade da DOX, estabelecendo uma possível via de resistência. Esse resultado é semelhante ao reportado por Miyoshi *et al.*,⁴ onde a expressão do CYP3A4 em células de câncer de mama afetou significativamente a resposta ao tratamento por Docetaxel (DOC). Os autores sugerem que a inativação intratumoral do DOC pelo CYP3A4 pode estar associada à aquisição de resistência ao quimioterápico. Já a atenuação de CYPs pode gerar um aumento da toxicidade devido à maior permanência do medicamento no organismo, com a redução de sua eliminação.^{29,35} A interação medicamentosa também pode alterar a atividade dos CYPs. A coadministração de medicamentos que são indutores ou inibidores³⁶ dos citocromos é importante para o tratamento, podendo afetar a eficácia e segurança terapêutica.³⁷

Em mamíferos os citocromos P450 estão majoritariamente ancorados nas membranas do retículo endoplasmático (ER), com seu domínio catalítico localizado no lado citosólico do ER.³⁸ Os segmentos transmembrana da α -hélice no terminal N dos CYPs têm aminoácidos hidrofóbicos que contribuem para a interação com a membrana.^{12,39} As propriedades da membrana podem afetar o arranjo molecular dos CYPs, como sua localização e orientação, o que pode ser determinante para a atividade dessas enzimas.¹²⁻¹³

1.2 Biomembranas

Membranas biológicas ou biomembranas delimitam as fronteiras entre as células e o ambiente extracelular, e dos compartimentos intracelulares para o adequado funcionamento de organelas. A manutenção dessa organização exige que as membranas permitam a comunicação e o transporte seletivo de moléculas entre os ambientes.⁴⁰⁻⁴¹ A composição da biomembrana depende da organela e sua função, exibindo uma bicamada lipídica com proteínas associadas, como ilustrado na Figura 3. A bicamada lipídica é formada essencialmente por três classes de lipídios: fosfoglicerídios, esfingolipídios e esteróis. O grupo predominante é o dos fosfoglicerídios, que possuem o fosfato ligado ao glicerol e um grupo polar, como a colina, a etanolamina, a serina ou o inositol. A parte apolar é formada por dois ácidos graxos esterificados nos grupos hidroxila do glicerol.⁴⁰⁻⁴¹ Os esfingolipídios são semelhantes, mas

possuem a esfingosina ($C_{18}H_{37}NO_2$) como pilar de sua estrutura.⁴² Os esteróis em tecidos animais são majoritariamente representados pelo colesterol, uma molécula rígida capaz de interagir com os demais lipídios e regular a fluidez da membrana.^{15,43} A Figura 4 ilustra a distribuição dos principais lipídios em organelas de mamíferos.

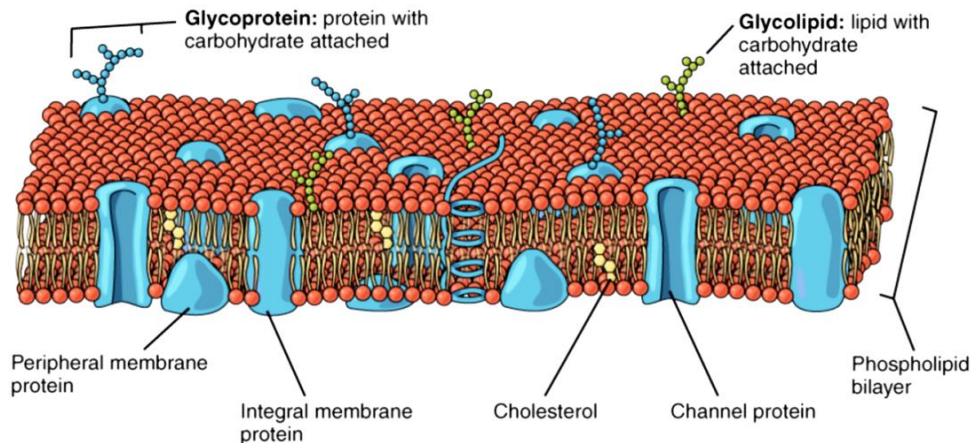


Figura 3 - Ilustração dos principais componentes de uma biomembrana.
Fonte: BETTS.⁴⁴

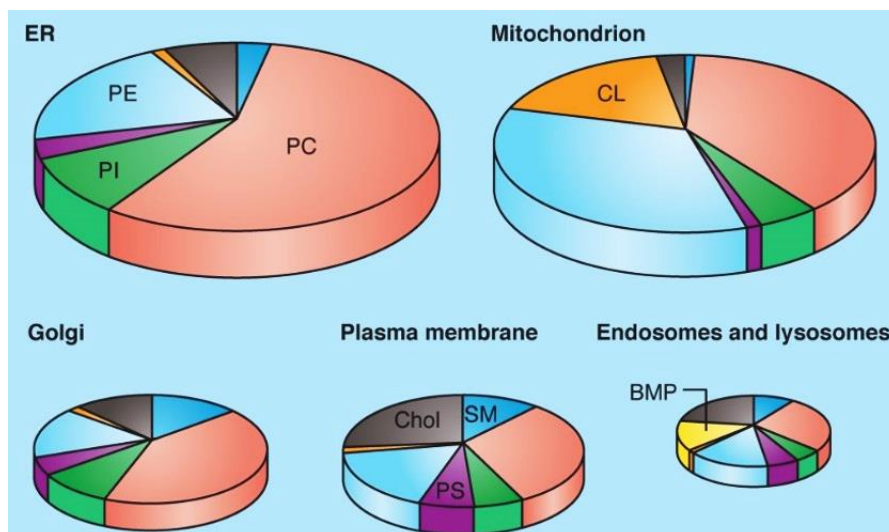


Figura 4 - Representação da distribuição dos principais lipídios [bis-monoacilglicerol-fosfato (BMP), colesterol (Chol), cardiolipina (CL), esfingomielina (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), e fosfatidilserina (PS)] presentes em organelas de mamíferos.
Fonte: MEER; KROON.⁴⁵

Os lipídios se organizam de forma assimétrica e podem estabelecer domínios que diferem dos entornos da membrana.⁴² As jangadas lipídicas ou *lipid rafts* são um exemplo.⁴⁶ Essas jangadas são pequenos domínios com alta concentração de colesterol e esfingolipídios, relevantes para transdução de sinais, transporte de moléculas, e arranjo de proteínas na membrana.^{20,46} As propriedades e a distribuição dos lipídios podem influenciar a incorporação e atividade de proteínas na membrana.^{20,47} A quantidade e os tipos de proteínas dependem da

localização e função celular. Cada membrana exibe um conjunto de proteínas para exercer determinadas atividades.⁴⁸⁻⁴⁹ Essas proteínas podem ser classificadas em três categorias: integrais, ancoradas a lipídios, e periféricas. As proteínas integrais ou proteínas transmembranas atravessam a bicamada lipídica e exibem segmentos em ambos os lados da membrana (interno e externo). As proteínas ancoradas a lipídios são ligadas covalentemente às moléculas lipídicas, mas não atravessam a bicamada. As proteínas periféricas se ligam por interações com outras proteínas da membrana ou com os grupos polares dos lipídios.⁴⁸⁻⁴⁹

As biomembranas exercem papel fundamental na atividade de fármacos, impactando suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas.⁵⁰ Independentemente da via de administração (tais como, tópica, oral, nasal, intravenosa, intramuscular ou subcutânea), para exercer sua atividade a droga deve interagir com biomembranas.⁵¹ O mecanismo de ação da maioria dos medicamentos envolve sua ligação ou difusão na membrana celular, isto é, os principais alvos terapêuticos estão presentes em membranas biológicas (majoritariamente proteínas) ou no ambiente intracelular (por exemplo, o DNA).⁵⁰ Para atuar no alvo intracelular, a droga deve penetrar a membrana celular e outras biomembranas.²⁰ A permeabilidade da membrana depende de suas características e das propriedades físico-químicas da droga, como suas dimensões, carga elétrica e lipofilicidade.²⁰ O deslocamento de moléculas através de biomembranas pode ser classificado em dois grupos principais: o transporte passivo, um processo espontâneo que não requer energia celular, onde as moléculas se deslocam conforme o gradiente de concentração, isto é, da região de maior concentração para a de menor concentração; e o transporte ativo, que envolve o movimento de moléculas contra seu gradiente de concentração, necessitando de energia celular no processo.⁵¹⁻⁵³ A Figura 5 ilustra essas categoriais. Algumas moléculas pequenas (por exemplo, o oxigênio, dióxido de carbono, cafeína e etanol) podem penetrar rapidamente a membrana celular via difusão passiva. A taxa de difusão de uma droga na membrana é proporcional ao seu gradiente de concentração, conforme a primeira lei de Fick:

$$\text{Taxa de difusão (mg. s}^{-1}\text{)} = \frac{D(\text{cm. s}^{-1})P}{h(\text{cm})} [C_{\text{ext}} - C_{\text{int}}](\text{mg}) \quad (2)$$

Onde D é o coeficiente de difusão da droga na membrana, P o coeficiente de partição, determinado pela razão entre a concentração da droga na fase orgânica e aquosa, h a espessura da membrana, e $[C_{\text{ext}} - C_{\text{int}}]$ o gradiente de concentração da droga na membrana.^{20,53} No entanto, a maioria das moléculas não é capaz de atravessar biomembranas, necessitando de proteínas transportadoras (categorizadas em carreadores ou canais) para mediar seu deslocamento ao interior (influxo) e exterior da célula (efluxo). Este processo é denominado de

difusão facilitada, podendo envolver ou não o consumo de energia celular.⁵¹⁻⁵³ Outros mecanismos, como osmose e endocitose/exocitose, também podem estar envolvidos no transporte de moléculas em biomembranas, incluindo a combinação entre eles.⁵¹

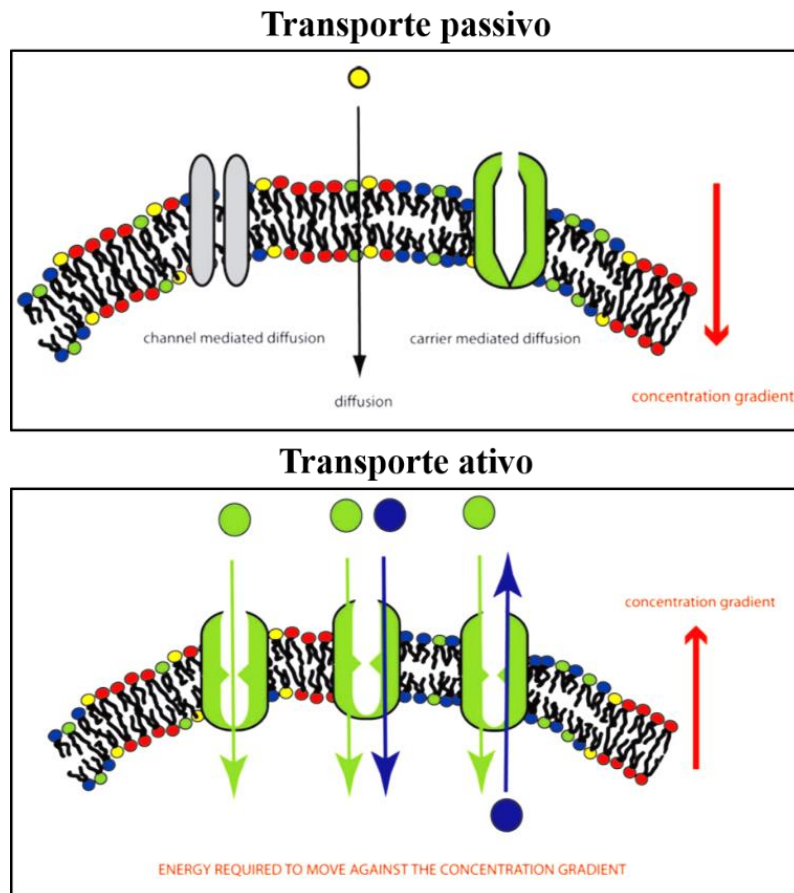


Figura 5 - Ilustração esquemática do transporte passivo e ativo de moléculas em biomembranas.
Fonte: SEDDON.⁵³

As funções celulares estão normalmente relacionadas às atividades de proteínas e ácidos nucleicos. Por isso, a maioria dos medicamentos possui como alvo terapêutico essas macromoléculas, em busca de reverter seu mau funcionamento com a condição patológica. No entanto, as bicamadas lipídicas são também relevantes, pois afetam a localização e atividade de proteínas na membrana. As interações entre drogas e lipídios podem modificar a conformação e mobilidade lipídica, carga superficial, densidade e fluidez das biomembranas. Por meio desses efeitos, os fármacos podem regular funções celulares, combatendo doenças.^{18,50,54} Essa abordagem terapêutica, conhecida como *Membrane-lipid therapy*, fundamenta-se no desenvolvimento de medicamentos capazes de alterar a composição e estrutura lipídica de biomembranas, para modular funções celulares.⁵⁴

Alterações no conteúdo lipídico de biomembranas são observadas em diversas doenças, incluindo câncer, diabetes, e desordens cardiovasculares.⁴² O câncer é caracterizado por uma proliferação celular descontrolada, que requer a demanda de diversas biomoléculas, incluindo ácidos graxos e lipídios de membrana para sustentar sua progressão.¹⁸ Conseqüentemente, as células cancerosas normalmente apresentam diferentes perfis lipídicos comparados aos das células saudáveis, que variam conforme o tipo de câncer (localização) e estágio da doença. Devido à sua natureza heterogênea, as células cancerosas não apresentam um perfil lipídico característico e único.¹⁵ Os trabalhos de Bandu *et al.*,⁵⁵ Hilton *et al.*²³ e Perrotti *et al.*⁵⁶ reúnem descrições dessas alterações envolvendo diferentes tipos de câncer. Preetha *et al.*²² quantificaram a composição lipídica de tecidos cervicais saudáveis e cancerosos. As concentrações de colesterol, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG), esfingomiéline (SM) e fosfatidilserina (PS) encontradas nos tecidos tumorais foram 1,5, 3,6, 2,0, 2,3, 4,7, 1,7, e 2,2 vezes maiores do que nos tecidos cervicais saudáveis, respectivamente.

Mudanças no conteúdo lipídico também foram observadas em células resistentes a quimioterápicos. Peetla *et al.*¹⁶ verificaram distintos perfis lipídicos para células de câncer de mama sensíveis (MCF-7) e resistentes ao quimioterápico Doxorubicina (MCF-7/DOX). As células resistentes exibiram um grande aumento nas concentrações de colesterol (Chol), esfingomiéline (SM) e fosfatidilinositol (PI), como mostra a Tabela 1. Outra diferença entre as biomembranas de células normais e cancerosas está na distribuição assimétrica de lipídios na bicamada.¹⁸ Para células normais (saudáveis), a parte externa da bicamada lipídica é formada majoritariamente por fosfatidilcolina (PC) e esfingomiéline (SM), enquanto os lipídios fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) estão restritos normalmente à camada interna.⁵⁷ Por outro lado, há perda dessa simetria em diversos tipos de câncer com a externalização de PS nas biomembranas.⁵⁸ O microambiente tumoral, região que circunda as células cancerosas, também sofre alterações que contribuem para o desenvolvimento e progressão do câncer. Uma das características desse meio é um pH extracelular (pHe) mais ácido.¹⁸ Em condições normais e saudáveis o pHe varia entre 7,3 e 7,4, mas nos tecidos tumorais esse valor está na faixa de 6,4 - 7,0.⁵⁹ Isso pode afetar o estado de ionização de quimioterápicos, relevante para seu deslocamento na biomembrana.¹⁸ A Figura 6 ilustra as principais diferenças na composição lipídica e no pH extracelular (pHe) de biomembranas de células normais (saudáveis) e cancerosas.

Tabela 1 - Concentração de esfingomiéline (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA), cardiolipina (CL), lípidios neutros (NL), diacilglicerol (DAG), colesterol (Chol), triglicerídeos (TG) e ésteres de colesterol (CE) nas células sensíveis (MCF-7) e resistentes ao quimioterápico Doxorubicina (MCF-7/DOX).

Lípidios	Células sensíveis	Células resistentes
SM	0,72	4,12
PC	32,73	21,8
PI	0	2,03
PS	16,96	12,38
PE	7,7	3,59
PA	0,52	1,58
CL	2,57	1,15
NL	38,79	51,27
Lípidios neutros	Células sensíveis	Células resistentes
DAG	15,17	0
Chol	52,43	78,67
TG	12,31	3,1
CE	4,93	13,53

Fonte: PEETLA.¹⁶

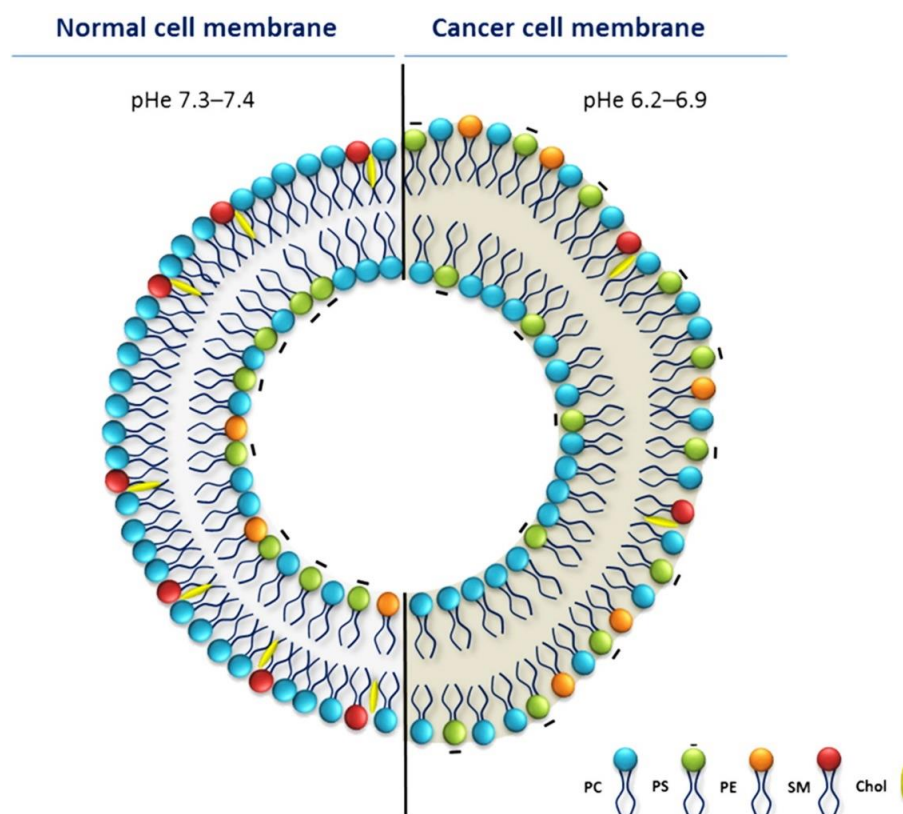


Figura 6 - Representação esquemática das principais diferenças na composição lipídica e no pH extracelular (pHe), associadas as biomembranas de células normais e cancerosas.

Fonte: ALVES.¹⁸

1.3 Modelos de membrana

A complexidade estrutural e o comportamento dinâmico das biomembranas tornam desafiadora a investigação de interações nesses sistemas. Experimentos envolvendo células ou membranas biológicas naturais são limitados por requisitos de viabilidade celular, altos custos, e geralmente não permitem uma descrição molecular detalhada. Uma estratégia é a utilização de modelos simplificados que reproduzem parcialmente a estrutura de biomembranas reais.^{42,60} Esses modelos são formados pelos principais componentes de membranas biológicas, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, e permitem o controle de diversos parâmetros biofísicos, como o empacotamento molecular, pressão lateral, composição, pH, força iônica e temperatura. Por isso, são ferramentas relevantes para compreensão do comportamento de membranas biológicas reais.^{42,50,60} Os principais modelos de membrana são as vesículas ou lipossomos, as monocamadas lipídicas, e as bicamadas em suportes sólidos.²⁰ A Figura 7 ilustra as arquiteturas desses modelos.

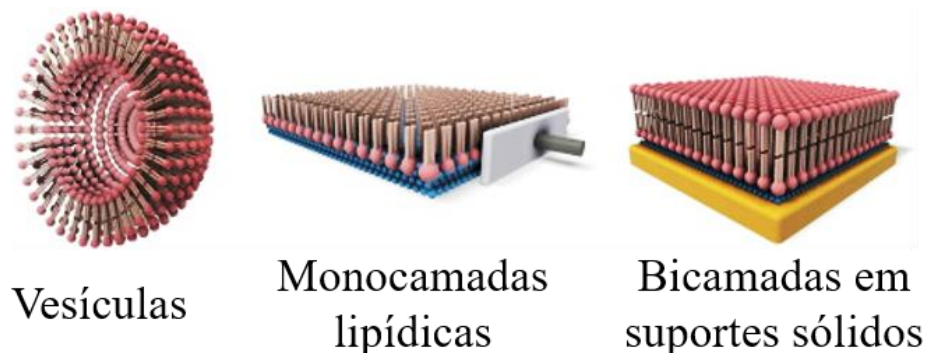


Figura 7 - Representação das arquiteturas dos principais modelos de membrana: as vesículas, as monocamadas lipídicas e as bicamadas em suportes sólidos.

Fonte: KNOBLOCH.⁶⁰

As vesículas ou lipossomos são estruturas esféricas (3D) formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas que envolvem um compartimento interno aquoso. As vesículas são classificadas conforme o número de bicamadas: em unilamelar (UV) ou multilamelar (MV), e de acordo com suas dimensões: em pequenas (S) com raios menores que 100 nm, grandes (L) com raios maiores que 100 nm, e gigantes (G) com raios maiores que 1000 nm. Diversos métodos podem ser utilizados no preparo de lipossomos (por exemplo, sonicação ou extrusão), que podem conter diferentes tipos de lipídios e componentes da membrana.^{19,50} Essas estruturas permitem a investigação de uma variedade de processos e interações envolvendo biomembranas, como o transporte de moléculas, a formação de poros, e a fusão de

membranas.⁵⁰ Apesar da sua versatilidade, a utilização de lipossomos como modelos de membrana apresenta limitações. Estas incluem a necessidade de condições experimentais apropriadas para sua estabilidade e integridade (por exemplo, de pH, temperatura e composição).^{50,61}

As monocamadas lipídicas são sistemas bidimensionais planares formados na interface ar-água através da técnica de Langmuir. Essas monocamadas de Langmuir podem ser compostas por diversas moléculas lipídicas, nas quais outros componentes de biomembranas podem ser incorporados. Dessa forma, a composição da monocamada e as propriedades da subfase aquosa, como temperatura, pH e força iônica podem ser ajustadas para mimetizar uma camada de membrana.^{18,42} Apesar de reproduzir apenas uma camada da biomembrana, as monocamadas podem contribuir para compreensão da ação fisiológica de moléculas e nanomateriais relevantes biologicamente. A combinação com técnicas de caracterização sofisticadas permite obter informações detalhadas das interações nas monocamadas.⁶² Esses modelos são utilizados no estudo de fenômenos biológicos,²¹ tornando essa abordagem apropriada para este trabalho. A próxima seção dedica-se a uma descrição mais detalhada dessa técnica.

As bicamadas em suportes sólidos são modelos de membrana formados pela fusão de vesículas em superfícies sólidas (substratos) ou pela transferência de monocamadas utilizando as técnicas de Langmuir-Blodgett (LB) e/ou Langmuir-Schaefer (LS). Na técnica de LB, um substrato hidrofílico é imerso na subfase antes da formação da monocamada na interface ar-água. Em seguida, o substrato é retirado verticalmente através da monocamada, transferindo-a para sua superfície. Na técnica de LS, um substrato hidrofóbico é posicionado horizontalmente, paralelo à subfase. Em seguida, o substrato é colocado em contato com a monocamada por um curto período, depositando-a em sua superfície.^{20,42} Para a formação da bicamada, duas monocamadas são depositadas sobre o substrato utilizando a técnica de LB e/ou LS. Os substratos podem apresentar variadas geometrias (planar, esférica e cilíndrica) e composições, como sílica, ouro e politetrafluoretileno (PTFE), aumentando a estabilidade da bicamada.⁵⁰ No entanto, as interações da bicamada com o suporte sólido restringem seus graus de liberdade, diferindo das condições reais de biomembranas.⁵⁰

Em geral, os modelos de membrana buscam simplificar a complexidade das biomembranas para compreender seu comportamento. Nenhum modelo reproduz completamente as características das membranas biológicas, e cada abordagem apresenta vantagens e desvantagens. Aumentar a complexidade do modelo pode torná-lo mais realista, porém, também pode limitar as informações extraídas. Além das vesículas, monocamadas

lipídicas e bicamadas em suportes sólidos, outros modelos de membrana têm sido utilizados, conforme discutido por Bunea *et al.*⁶¹ A combinação de diferentes modelos, envolvendo abordagens experimentais e teóricas, pode aprofundar a compreensão das propriedades e interações associadas às biomembranas.⁶³

1.3.1 Monocamadas de Langmuir

Os filmes de Langmuir, nomeados em homenagem ao americano Irving Langmuir, são formados por moléculas insolúveis em uma interface gás-líquido. Normalmente são constituídos por moléculas anfifílicas, com uma região polar (hidrofílica) e apolar (hidrofóbica), como os lipídios. Essas moléculas na interface ar-água se orientam para formar o filme de Langmuir.⁶⁴⁻⁶⁵ Para sua elaboração um pequeno volume da solução de moléculas anfifílicas em solvente volátil e imiscível em água (geralmente clorofórmio) é espalhado sobre a superfície da água contida em um recipiente (cuba de Langmuir) confeccionado de material inerte (normalmente Teflon PTFE). Após a evaporação do solvente, uma ou duas barreiras são usadas para aproximar as moléculas anfifílicas espalhadas e organizá-las, formando uma camada monomolecular com a parte polar das moléculas anfifílicas imersas na água (subfase) e a parte apolar direcionadas ao ar.⁶⁴⁻⁶⁵ A monocamada pode ser caracterizada com medidas tensiométricas, microscópicas e espectroscópicas.⁶⁶ As moléculas anfifílicas reduzem a tensão superficial da subfase de um valor γ_0 para γ . Essa diferença na tensão superficial é definida como a pressão de superfície (π):⁶⁶

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (3)$$

A pressão de superfície é normalmente medida utilizando uma eletrobalaça acoplada à cuba de Langmuir, por meio do método de Wilhelmy. Para isso, utiliza-se uma placa de material hidrofílico, como platina ou filtro de papel, parcialmente imersa na subfase, interceptando a interface ar-água, que atua como sensor. Por meio das forças que atuam na placa (força peso e tensão superficial no sentido descendente, e empuxo no sentido ascendente) na presença e ausência das moléculas anfifílicas, é estimada a pressão superficial.⁶⁵

A compressão induzida pelas barreiras reduz a área média ocupada por molécula na interface, aumentando as interações intermoleculares e a pressão de superfície. Assim, uma das principais caracterizações dos filmes de Langmuir é através do monitoramento da pressão de superfície em função da área molecular média (A). A curva obtida é conhecida como isoterma π - A , pois a temperatura é mantida constante. O perfil da isoterma depende da temperatura, estrutura química da molécula e propriedades da fase aquosa.⁶⁴ O arranjo molecular na

aquisição da isoterma pode ser comparado aos estados físicos e transições de fase no espaço tridimensional. Inicialmente as moléculas anfifílicas ocupam grandes áreas, com suas partes apolares também em contato com a água e com interações entre si desprezíveis, comportando-se como um gás bidimensional (G). Com a compressão, as moléculas anfifílicas começam a interagir, formando a fase líquida (L). O aumento da densidade superficial provoca grande compactação e orientação molecular, caracterizando a fase sólida (S). Por fim, a monocamada atinge um limite conhecido como colapso, desestabilizando-se e gerando estruturas tridimensionais.^{65,67} As transições de fase na monocamada podem ser identificadas pela presença de descontinuidades na isoterma π -A, como regiões de platô (por exemplo, no DPPC) ou curvaturas abruptas (por exemplo, no ácido esteárico), porém podem ocorrer também sem alterações na curva.⁶⁸ A Figura 8 ilustra as transições de fase exibidas pelo DPPC.

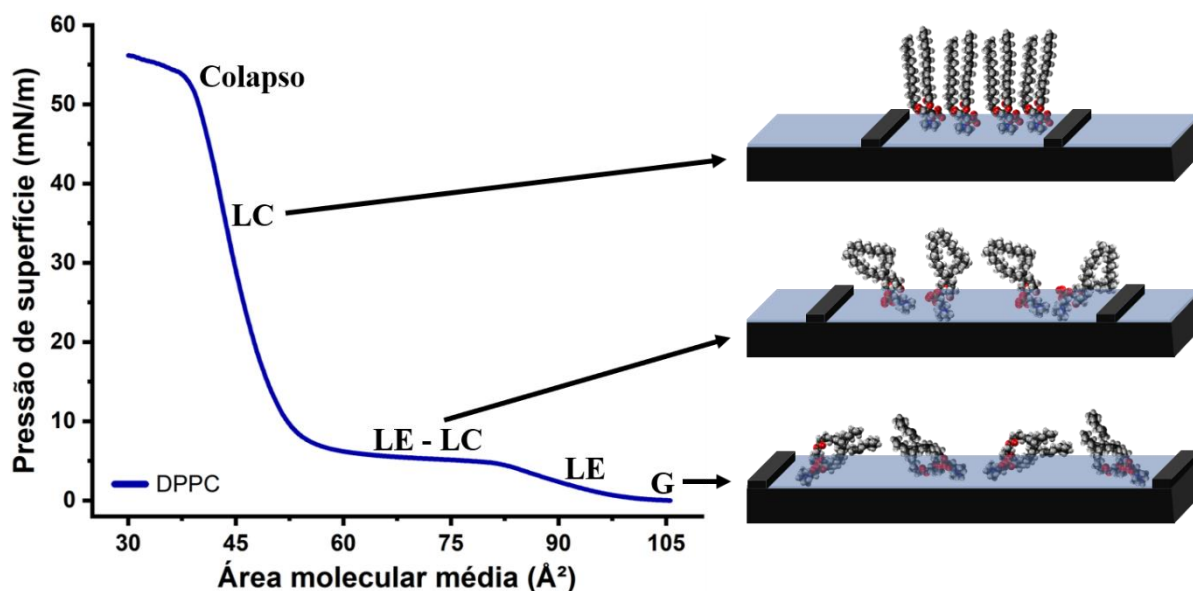


Figura 8 - Isoterma π -A do DPPC em PBS pH 7,4 com temperatura em 22 °C, e a representação esquemática do arranjo molecular nas fases: gasosa (G), líquido-expandida (LE) e líquido-condensada (LC).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A resposta da monocamada quando submetida a compressão pode também ser avaliada a partir do módulo de compressibilidade superficial (C_s^{-1}), definido por:⁶⁹

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T \quad (4)$$

Em que A é a área média ocupada por molécula na pressão de superfície (π), com a temperatura (T) constante. O módulo de compressibilidade retrata o empacotamento molecular, associado à elasticidade no plano ou elasticidade superficial.⁷⁰ Um elevado C_s^{-1} indica uma monocamada menos compressível, ou seja, que requer uma grande pressão superficial para redução da área molecular, de maneira semelhante à análise de tensão-deformação em materiais. Seu valor

permite estimar as fases da monocamada: Cs^{-1} entre 12 - 50 mN/m, 100 - 250 mN/m, e maiores do que 1000 mN/m correspondem respectivamente às fases LE, LC e S.⁶⁹ O módulo de compressibilidade superficial e as descontinuidades nas isotermas permitem estimar a ordem das transições de fase da monocamada. Uma transição de primeira ordem é caracterizada por um platô horizontal na isoterma π -A e um respectivo Cs^{-1} mínimo ($Cs^{-1} \approx 0$). Uma curvatura abrupta e um platô no Cs^{-1} correspondente, indicam uma transição de segunda ordem.⁷¹

A técnica de Langmuir permite o controle da composição e arquitetura molecular, podendo ser utilizada para mimetizar membranas celulares.⁶² Apenas uma camada da membrana pode ser reproduzida; porém, é possível correlacionar suas propriedades aos sistemas formados por bicamadas.⁷² O ambiente aquoso também pode ser regulado através da temperatura, pH e força iônica, o que permite adicionar moléculas de interesse biológico, como nanopartículas, fármacos, peptídeos e proteínas. A partir da caracterização da monocamada lipídica e análise das alterações provocadas pelas moléculas adicionadas ao sistema, informações podem ser extraídas a respeito dos mecanismos de interação, alvos moleculares e toxicidade.^{62,73} A Figura 9 ilustra algumas caracterizações frequentes nas monocamadas de Langmuir, e as informações extraídas. A interação de uma molécula de interesse biológico com a monocamada é uma das principais aplicações dos filmes de Langmuir como modelos de membrana. Esses estudos normalmente buscam compreender: (i) se a molécula penetra a membrana; (ii) como as propriedades da membrana afetam a molécula, e vice-versa; e (iii) quais grupos funcionais estão envolvidos na interação. Por fim, busca-se correlacionar essas informações com ação fisiológica da molécula.⁷⁰

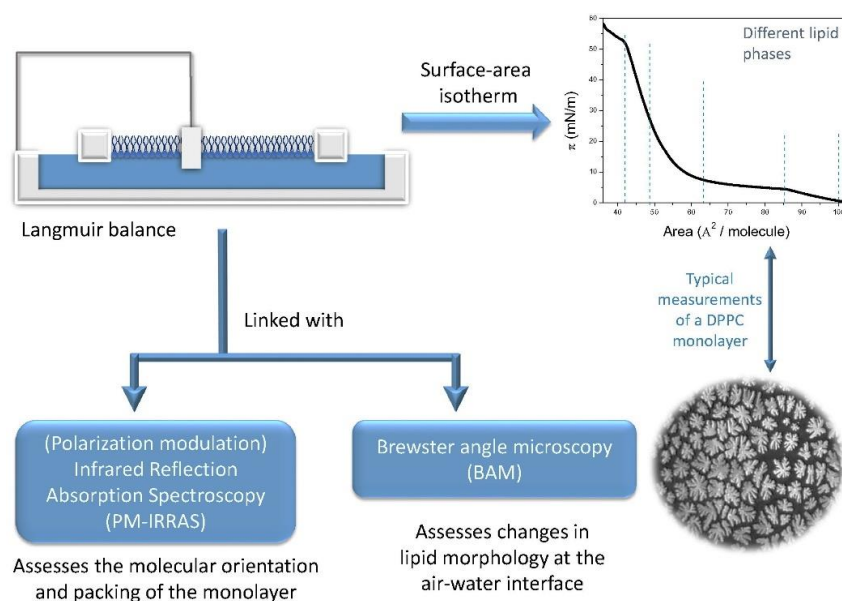


Figura 9 - Representação das principais caracterizações das monocamadas de Langmuir, e as informações obtidas. Fonte: ALVES.¹⁸

A interação com a molécula de interesse pode ser investigada em diferentes estágios de compressão da monocamada. Para se aproximar da situação real, a monocamada pode ser comprimida previamente em pressões superficiais (30 - 35 mN/m) que reproduzem o empacotamento e compressibilidade de membranas biológicas reais.^{72,74} Em seguida, a molécula é adicionada, normalmente via injeção na subfase, sendo monitoradas as mudanças na monocamada em função do tempo. Por meio desses estudos, a cinética de adsorção de um composto ao filme de Langmuir pode ser analisada. Um aumento na pressão superficial, mantendo-se a área da monocamada constante, indica a adsorção da molécula na monocamada. De maneira equivalente, pode-se fixar a pressão de superfície e avaliar a área molecular em função do tempo.⁷⁵ A incorporação da molécula na monocamada geralmente atinge um estado de saturação, indicado pela estabilização da monocamada (da pressão ou área molecular) com o tempo. O empacotamento da monocamada afeta a adsorção da molécula; tipicamente, quanto maior a densidade da monocamada (pressão ou área molecular inicial) menor a incorporação da molécula.⁷⁰ Por isso, frequentemente a molécula de interesse é adicionada antes da compressão, para avaliar seus efeitos nas diferentes fases da monocamada, comparando-se as isotermas π -A na presença e ausência da molécula. Deslocamentos na área molecular da monocamada refletem as interações com o composto adicionado.⁷⁰

A adição da molécula de interesse na monocamada pode ser realizada por diferentes metodologias, conforme suas propriedades e objetivos. A introdução de moléculas hidrossolúveis baseia-se na dissolução dessas substâncias na subfase aquosa. Para isso, esses compostos podem ser injetados na subfase abaixo da monocamada. Apesar dessa abordagem se aproximar da situação real, ela pode conduzir a uma distribuição não uniforme (gradientes de concentração) e elevados tempos de difusão. Uma alternativa é a dissolução prévia das moléculas solúveis na subfase, seguida pela formação da monocamada. Entretanto, o contato com o solvente orgânico das moléculas anfífilas pode provocar danos nas espécies presentes na subfase, por exemplo, pode ocasionar a desnaturação de proteínas. A adição de compostos não solúveis ou parcialmente solúveis na subfase pode ocorrer mediante ao coespalhamento na interface com as moléculas que compõem a monocamada. Alternativamente, para evitar danos associados ao solvente orgânico, as espécies de interesse podem ser espalhadas na interface ar-água após a evaporação do solvente orgânico. A desvantagem dessa metodologia é que os compostos adicionados na interface podem remover moléculas da monocamada para subfase.^{21,76} Glomm *et al.*⁷⁷ estudaram a incorporação da albumina de soro bovino (BSA) em monocamadas de 1-estearoil-2-oleoil-sn-glicerol-3- fosfolina (SOPC), utilizando diferentes métodos para adição da BSA, como ilustrado na Figura 10. As alterações na monocamada

causadas pela BSA dependeram do protocolo para introdução da proteína. Portanto, a definição da metodologia deve ser avaliada considerando as limitações mencionadas e buscando mimetizar um protocolo mais realista possível.

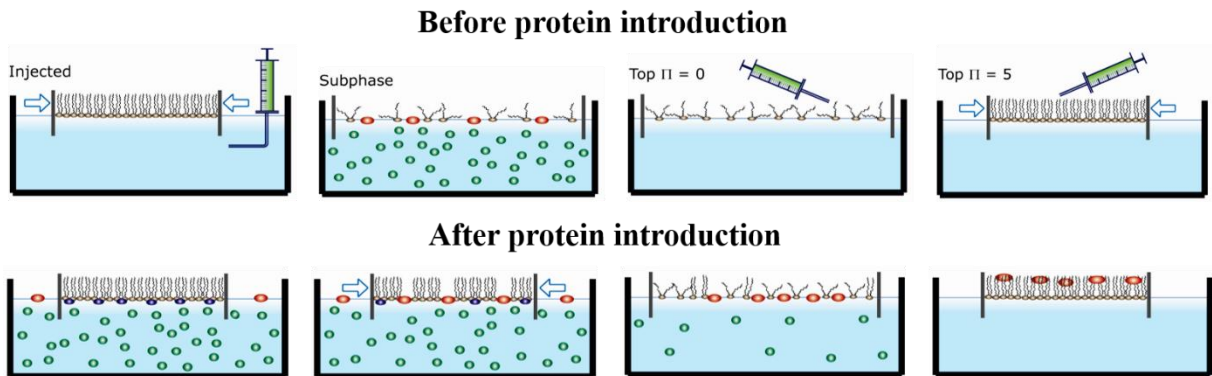


Figura 10 - Ilustração dos métodos experimentais para adição de BSA nas monocamadas de SOPC. As proteínas dissolvidas na subfase são representadas por esferas verdes, quando interagem com a parte polar dos lipídios em esferas azuis, e as presentes na interface ou interagindo com a cadeia apolar dos lipídios em esferas vermelhas.

Fonte: GLOMM.⁷⁷

A complexidade da membrana pode ser parcialmente reproduzida com a adição de múltiplos componentes na monocamada de Langmuir, como proteínas e lipídios, tornando o modelo mais realístico.¹⁸ O emprego de misturas lipídicas ao invés de um único lipídio, por exemplo, permite descrever o impacto da formação e distribuição de domínios, importantes para as interações.⁷⁸ Monocamadas formadas pela mistura de moléculas lipídicas na interface ar-água podem ser analisadas com base no comportamento esperado pela miscibilidade ideal do sistema (regra de aditividade). O desvio dessa condição pode ser associado às interações entre as moléculas lipídicas, o que reflete na não linearidade entre as propriedades da monocamada e sua composição.^{74,79} A área molecular ideal (A_{ideal}) de uma monocamada mista é dada pela soma das áreas ocupadas pelos lipídios puros:

$$A_{ideal} = \sum_{i=1}^N X_i A_i \quad (5)$$

Onde X_i é a fração molar de cada componente da mistura ($i = 1, 2, \dots, N$), e A_i a área média por cada lipídio em pressão superficial π .⁸⁰

O desvio do comportamento ideal pode ser avaliado com parâmetros ou propriedades termodinâmicas que refletem as quantidades “em excesso” (positivas ou negativas) nos sistemas reais em comparação aos sistemas ideais.⁸¹ A área em excesso (ΔA_{exc}) é calculada pela diferença entre a área medida experimentalmente e a área ideal para uma mesma pressão superficial:

$$\Delta A_{\text{exc}} = A_{\text{exp}} - A_{\text{ideal}} \quad (6)$$

Para uma monocamada mista ideal ou se os componentes lipídicos forem completamente imiscíveis, a área em excesso será zero ($\Delta A_{\text{exc}} = 0$).^{74,82} Outra função importante é a energia livre de Gibbs em excesso (ΔG_{exc}), obtida por:

$$\Delta G_{\text{exc}} = N \int_{\pi^0}^{\pi} \Delta A_{\text{exc}} d\pi \quad (7)$$

O limite de integração inferior é usualmente considerado zero ($\pi^0 = 0$), enquanto o superior é a pressão de superfície (π) de interesse. N é a constante de Avogadro ($6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$). Valores negativos de ΔG_{exc} indicam que a mistura é termodinamicamente favorável e as interações entre os componentes energeticamente favorecidas em relação aos sistemas puros. Para $\Delta G_{\text{exc}} > 0$ as interações entre as moléculas da monocamada mista são desfavoráveis, isto é, a mistura exhibe menor afinidade comparada aos constituintes individuais. Se a energia livre de Gibbs em excesso é zero, a mistura é considerada ideal.^{74,81,83}

As monocamadas de Langmuir são utilizadas para mimetizar uma variedade de membranas biológicas, abrangendo células saudáveis e cancerosas de mamíferos, além de microrganismos como bactérias, protozoários, fungos e vírus. A composição desses modelos é baseada na análise dos lipídios dessas células, envolvendo desde um único lipídio até misturas complexas, como extratos naturais.⁷⁰ Por exemplo, Lemma *et al.*⁸⁴ investigaram o efeito do pesticida Picloram em monocamadas formadas pela mistura de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC), esfingomiéline (SM) e colesterol (Chol), que mimetizam membranas oculares humanas. O Picloram, previamente dissolvido na subfase aquosa a 1 mmol/L, provocou uma expansão nas áreas das monocamadas de DOPC:SM (1:1) e DOPC:SM:Chol (1:1:1), que foi atribuído a sua penetração nas monocamadas. A análise dos espectros de PM-IRRAS revelou que o pesticida interage tanto com as cadeias apolares quanto com os grupos polares dos lipídios. Essas alterações nas monocamadas indicam que o Picloram pode afetar as membranas celulares de mamíferos, ressaltando a importância do controle da exposição a pesticidas. Jochelavicius *et al.*⁸⁵ estudaram a interação da Quitosana (Ch35%) com monocamadas de DPPC, DPPE, DPPG e extrato lipídico de *E. coli*. A incorporação da Ch35% deslocou as isotermas para maiores áreas e reduziu os módulos de compressibilidade superficial, conforme a concentração da quitosana e o pH da subfase (4,5 ou 7,4). As monocamadas carregadas negativamente (DPPG) e o extrato de *E. coli* interagiram em menor intensidade com a Ch35%, comparado as monocamadas zwitteriônicas (DPPC e DPPE). Essa diferença foi atribuída ao grau de acetilação (35%) e à quantidade limitada de grupos carregados

na quitosana. Esses resultados podem contribuir para a compreensão da atividade bactericida da quitosana e dos fatores que a influenciam.

Peetla *et al.*¹⁶ analisaram a interação da Doxorubicina (DOX) com extratos lipídicos de células de câncer de mama sensíveis (MCF-7) e resistentes (MCF-7/DOX) ao quimioterápico. A monocamada formada pelo extrato resistente exibiu um caráter mais condensado em comparação ao extrato sensível, devido às diferenças na composição lipídica. Além disso, para uma pressão superficial de 30 mN/m, a monocamada das células resistentes apresentou um maior módulo de compressibilidade superficial, indicando uma menor fluidez da membrana, atribuída ao maior conteúdo de colesterol. Essas diferenças nas propriedades das monocamadas afetaram a interação com a DOX. As curvas de cinética de adsorção indicaram que a DOX tende a permanecer incorporada nas monocamadas resistentes, enquanto nas células sensíveis o quimioterápico parece se deslocar para a subfase aquosa ao longo do tempo. Isso sugere que o deslocamento da DOX nas membranas das células resistentes pode ser reduzido, afetando sua concentração intracelular e eficácia terapêutica. A Figura 11 ilustra o transporte da DOX nas membranas das células sensíveis e resistentes. Este estudo contribui para a compreensão dos possíveis mecanismos associados à resistência de células cancerosas à quimioterapia e para o desenvolvimento de estratégias para terapias mais eficazes. Outras aplicações das monocamadas de Langmuir como modelos de membrana podem ser encontradas no artigo de revisão de Oliveira *et al.*⁷⁰

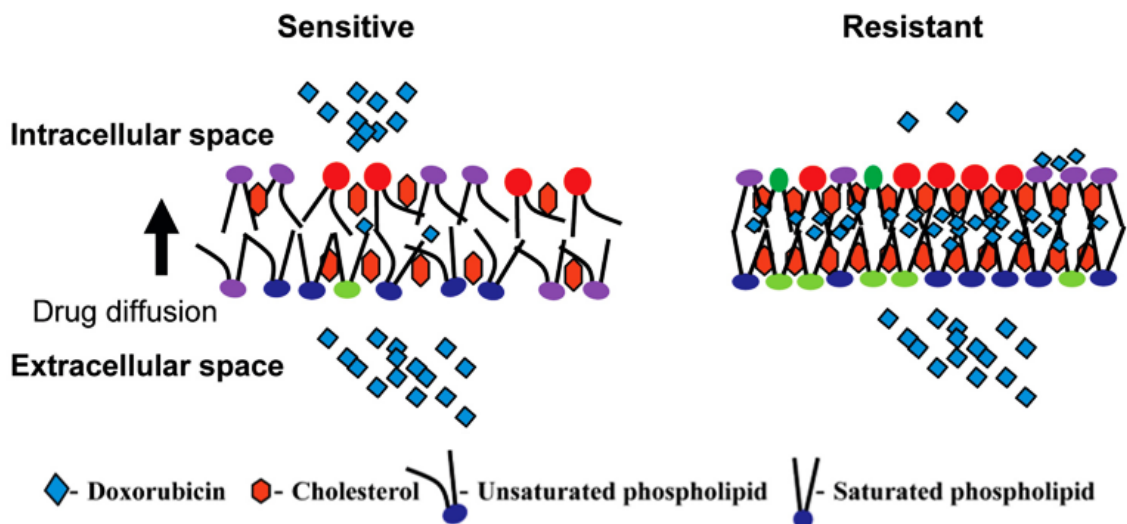


Figura 11 - Representação esquemática do deslocamento da DOX nas membranas de células sensíveis e resistentes ao quimioterápico. O menor empacotamento e a maior fluidez das membranas de células sensíveis, contribuem para difusão da DOX. Em contraste, as membranas de células resistentes são mais condensadas e menos fluidas, dificultando o deslocamento da droga para o ambiente intracelular.

Fonte: PEETLA.¹⁶

1.4 Doxorubicina (DOX)

A DOX é um quimioterápico pertencente à família das antraciclina, utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer.⁸⁶ Seu uso clínico é limitado devido à resistência por células cancerosas e sua capacidade de causar danos ou disfunções severas no sistema cardiovascular (cardiotoxicidade).⁸⁷ Para minimizar sua toxicidade, foram desenvolvidos compostos análogos, como a Daunorrubicina, Epirubicina e Idarrubicina. Além disso, são realizadas modificações na sua administração, como ajustes nas taxas de infusão e a combinação com outros medicamentos. A formulação lipossomal da DOX, conhecida como Doxil, é um exemplo dessas estratégias.⁸⁸

A atividade antitumoral da DOX é atribuída a dois modos de ação principais:⁸⁹ (1) intercalação no DNA e inibição da topoisomerase II, interrompendo o processo de divisão celular; e (2) geração de radicais livres que danificam a membrana celular, DNA e proteínas.^{87,90} A produção de radicais livres está associada à biotransformação da DOX por enzimas oxidorreduções, e por mecanismos não enzimáticos, como a formação de complexos da DOX com o ferro (Fe).⁹¹⁻⁹² Diversas enzimas estão envolvidas no metabolismo da DOX, incluindo a proteína P450 oxidorredução (POR), que pode reduzir a DOX diretamente ou mediar a atividade de citocromos P450.⁹³ Nessas reações induzidas pelo NADPH, o grupo p-quinona da DOX sofre redução de um elétron, formando o radical semiquinona. Esse radical pode reagir com o oxigênio molecular (O_2) e formar espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$), regenerando seu grupo p-quinona de origem.⁸⁸ A Figura 12 ilustra esse processo. O radical semiquinona também pode sofrer a quebra da ligação glicosídica com o açúcar daunosamina, formando deoxiagliconas.^{88,94} As agliconas exibem redução da polaridade, o que facilita sua difusão na membrana celular e formação de ROS em proximidade a moléculas mais sensíveis.⁹⁴ No entanto, a formação desses metabólitos é limitada a condições restritas de oxigênio e altas concentrações de DOX.^{91,94} A biotransformação da DOX não foi completamente elucidada, principalmente devido às diferentes metodologias e parâmetros empregados em seu estudo.⁸⁹ Por exemplo, Wang *et al.*⁹⁵ identificaram metabólitos em células tumorais resistentes que diferem dos metabólitos conhecidos da DOX *in vivo*, sugerindo a existência de rotas de metabolismo distintas nas células resistentes ao quimioterápico.

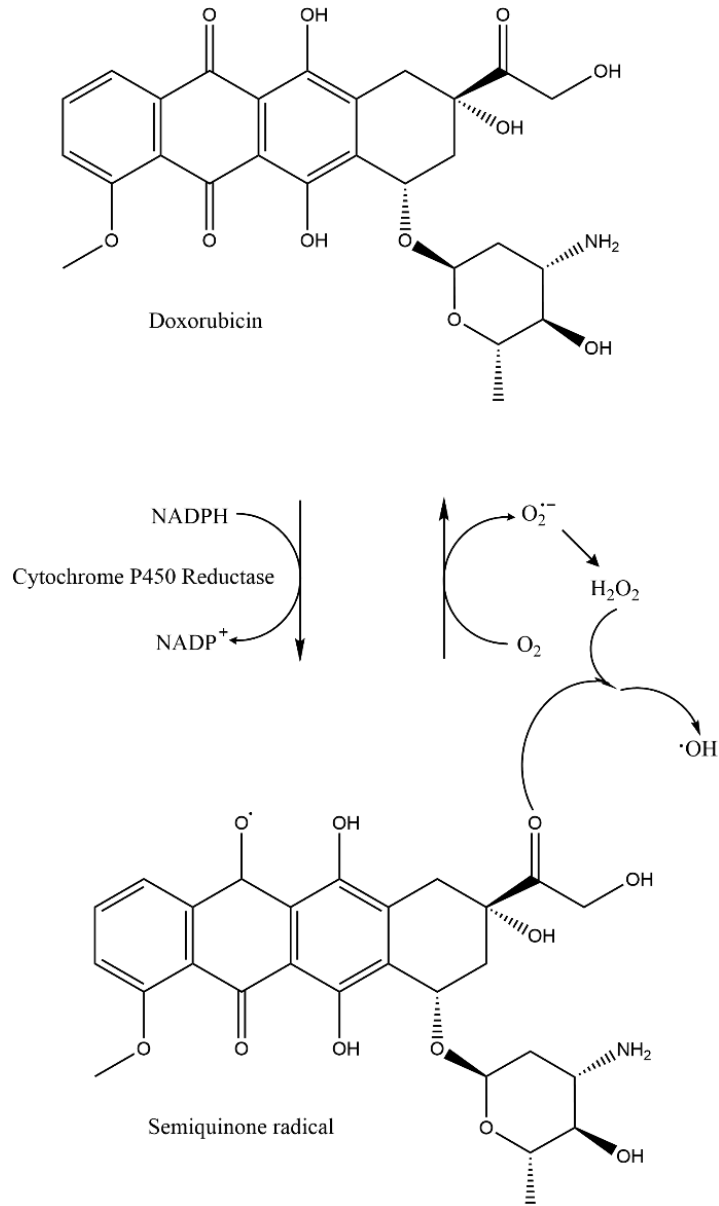


Figura 12 - Esquema da formação de espécies reativas de oxigênio associada a redução da DOX pela proteína P450 oxidorreductase.

Fonte: ZANGENEH.⁹⁶

A resistência à DOX está associada a vários mecanismos que comprometem a atividade do quimioterápico, principalmente sua capacidade de acumular-se no núcleo das células tumorais e/ou gerar radicais livres.⁹⁷ O deslocamento da DOX através de membranas celulares ocorre por difusão passiva ou por meio de proteínas transportadoras.⁹⁸ O aumento da expressão e atividade dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporters*), em especial a glicoproteína-P (P-gp) e as proteínas de resistência a múltiplas drogas (*Multidrug resistance proteins* - MRPs), afetam o influxo e efluxo de quimioterápicos nas células cancerosas, sendo um dos principais mecanismos de resistência à DOX.⁹⁷⁻⁹⁹ As propriedades biofísicas das membranas de células resistentes à DOX também influenciam a difusão do quimioterápico e

podem ser determinantes para a eficácia terapêutica.¹⁶ Além disso, alterações no metabolismo da DOX podem afetar a geração de radicais livres e, conseqüentemente, sua atividade antitumoral.

Neste trabalho, investigou-se a influência do sistema do Citocromo P450 3A4 e da composição lipídica de monocamadas de Langmuir (modelos de membrana) na interação da doxorubicina. A sobreexpressão de CYP3A4 em células HEK293 reduziu a toxicidade da DOX, sendo considerada uma potencial via de resistência à quimioterapia.³³

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e soluções

Os lipídios 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) e L- α -fosfatidilinositol (PI) foram obtidos da Avanti Polar Lipids. O PI é extraído de fígado bovino, e possui uma distribuição média de ácidos graxos de 46% C18:0, 8% C18:1, 6% C18:2, 13% C20:3, 17% C20:4, e 10% desconhecido. O colesterol (Chol) foi adquirido da Sigma-Aldrich. Na Figura 13 estão suas estruturas químicas. Foram preparadas soluções equimolares de 1 mmol/L em clorofórmio, exceto para o DPPE e PI, diluídos em uma mistura de clorofórmio e metanol (4:1, v/v). Microsossomos contendo citocromos P450 3A4, P450 oxidoredutases e citocromos b5 recombinantes humanos foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Este produto é fornecido em tampão fosfato (100 mmol/L e pH 7,4), denominado CYP3A4. O cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e o quimioterápico DOX foram obtidos da Sigma-Aldrich. As soluções com CYP3A4, NADPH e DOX foram preparadas em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 da Sigma-Aldrich. Os reagentes CH₃OH (Metanol), CHCl₃ (Clorofórmio), NaCl, KCl, Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ foram obtidos da Panreac, Synth ou Neon. Para subfases foi preparado tampão PBS com a mistura de 80 g de NaCl + 2 g de KCl + 2,4 g de KH₂PO₄ + 14,4 g de Na₂HPO₄ em 1 L de água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore) com resistividade de 18,2 M Ω cm. Dessa solução estoque, o PBS foi diluído em 10 vezes e teve seu pH ajustado em 7,4 para utilização na cuba de Langmuir.

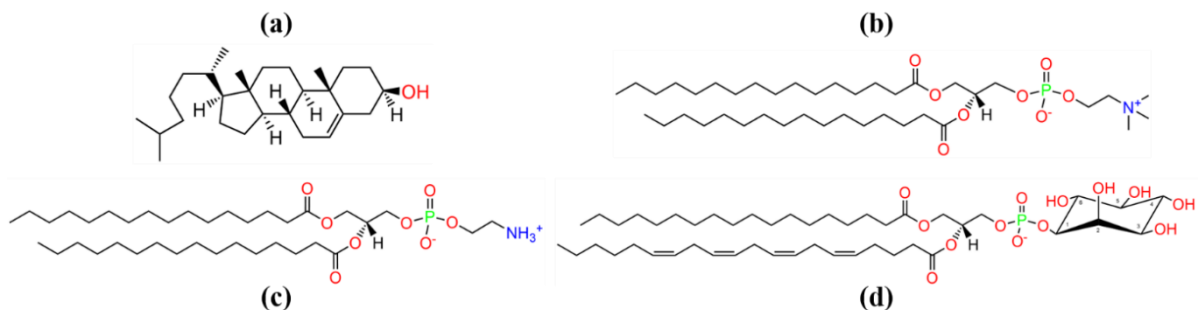


Figura 13 - Estrutura química do Chol (a), DPPC (b), DPPE (c) e PI (d).
Fonte: Elaborada pelo autor.

2.2 Modelos de membrana

Neste trabalho foi utilizado um modelo de membrana com os principais lipídios do retículo endoplasmático. O modelo foi nomeado de M1, com a fração molar baseada na distribuição de lipídios em células de mamíferos.^{43,100} Variou-se a fração de Chol (M2 - M4) e PI (M5 - M7) mantendo a proporção dos demais componentes conforme a Tabela 2. Por exemplo, para aumentar a porcentagem de Chol para 35%, reduziu-se o DPPC para 42,6% dos 65% associados aos outros lipídios do modelo, que é equivalente aos 60,9% de DPPC nos 93% correspondente aos demais componentes em M1 com 7% de Chol. O objetivo foi propor alterações na composição para mimetizar membranas de células cancerosas.^{22,23} A Figura 14 ilustra a composição dos principais modelos de membrana investigados.

Tabela 2 - Porcentagem dos componentes lipídicos nos modelos de membrana.

MODELOS	Chol	DPPC	DPPE	PI
M1	7,0%	60,9%	22,5%	9,6%
M2	15,0%	55,7%	20,5%	8,8%
M3	25,0%	49,1%	18,1%	7,8%
M4	35,0%	42,6%	15,7%	6,7%
M5	6,6%	57,3%	21,1%	15,0%
M6	5,8%	50,5%	18,7%	25,0%
M7	5,0%	43,8%	16,2%	35,0%

Fonte: Elaborada pelo autor.

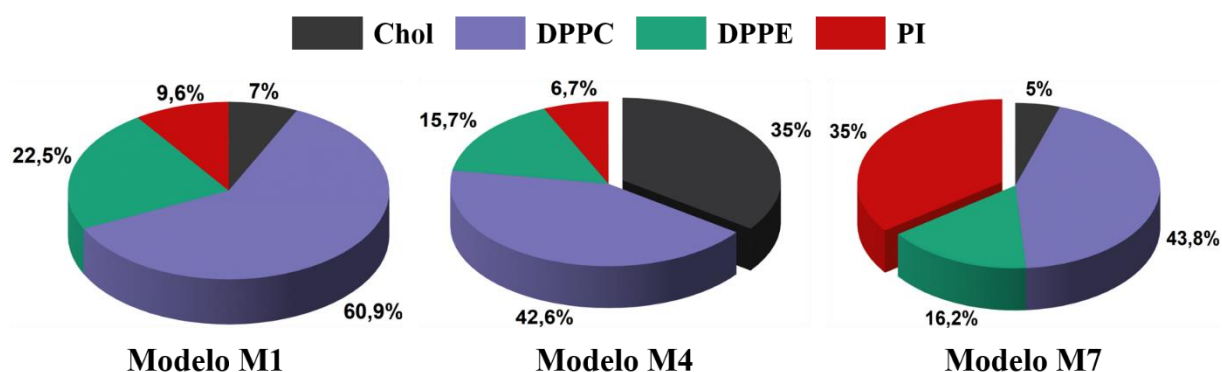


Figura 14 - Representação gráfica da distribuição percentual de lipídios nos modelos M1, M4 e M7.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.3 Isotermas de pressão superficial-área

As monocamadas foram preparadas em uma cuba de Langmuir (*homemade*) com área de 15.900 mm² acoplada a dispositivos da KSV NIMA Instruments, e subfase composta por 60 mL de PBS pH 7,4. As isotermas π -A foram obtidas em triplicatas, mediante ao espalhamento das soluções de lipídios na interface. Após 20 min para evaporação do solvente, seguiu-se com a compressão simétrica das barreiras a uma taxa constante de 10 mm/min, utilizando o método de Wilhelmy para medir a pressão de superfície. Esses experimentos foram realizados em sala limpa classe 10.000, com a temperatura controlada em 22 ± 1 °C. Após a obtenção das isotermas dos lipídios puros, os modelos de membrana foram estudados misturando-se as soluções dos componentes lipídicos conforme a Tabela 2.

Para investigar os modelos de membrana com o CYP3A4, estudou-se sua interação ao modelo M1 em diferentes concentrações (referente ao citocromo P450 3A4), e tempos de contato. Após estabelecer as condições ideais, seguiu-se para a caracterização com os demais modelos. Duas formas de adição do CYP3A4 foram testadas: (i) injeção de 25 μ L de CYP3A4 na subfase, e (ii) espalhamento de 25 μ L de CYP3A4 na interface. Em ambas o CYP3A4 foi adicionado após evaporação do solvente dos lipídios. Dos resultados iniciais, estabeleceu-se espalhar 25 μ L de CYP3A4 (50 nmol/L) na interface e 120 min de interação como ideal, obtendo as isotermas π -A com os principais modelos de membrana. Foram obtidas isotermas do CYP3A4 com os lipídios puros (Chol, DPPC, DPPE e PI) e na ausência de lipídios, para discriminar a contribuição do componente lipídico na interação e análise da atividade superficial do CYP3A4. A interação do cofator NADPH com os modelos de membrana + CYP3A4 também foi avaliada. Após a adição do CYP3A4, 200 μ L de NADPH a 3 mmol/L foram injetados na subfase, e depois de 60 min foram obtidas isotermas π -A. A influência do NADPH nas monocamadas foi estudada também na ausência do CYP3A4. O NADPH foi adicionado após a evaporação do solvente dos lipídios.

Para o estudo da interação da DOX, foi analisada sua adição ao modelo M1 em diferentes concentrações. Uma vez determinada a concentração ideal de DOX, foram obtidas isotermas com os demais modelos. Depois da evaporação do solvente dos lipídios, foram injetados 200 μ L de DOX a 1 mmol/L na subfase, e após 60 min de interação foram obtidas as isotermas. O efeito da DOX nos lipídios, Chol, DPPC, DPPE e PI também foi investigado. Para avaliar a influência do CYP3A4 na interação da DOX com os modelos de membrana, foram obtidas isotermas π -A com o sistema misto, ou seja, modelos de membrana + CYP3A4 + NADPH + DOX adicionados em sequência na cuba de Langmuir conforme a Figura 15. Esses

sistemas também foram investigados na ausência do cofator NADPH, fundamental para atividade catalítica do CYP3A4. O objetivo foi identificar alterações nas isotermas devidas à biotransformação da DOX pelo CYP3A4.

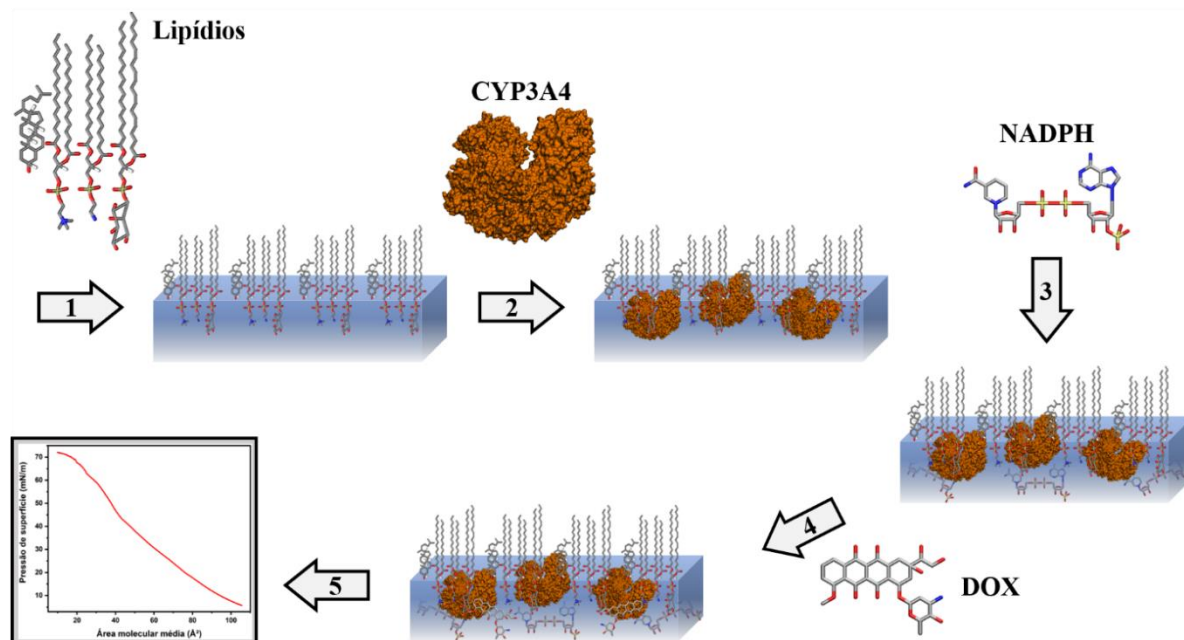


Figura 15 - Ilustração esquemática das etapas para obtenção das isotermas dos modelos de membrana (M1, M4 e M7) + CYP3A4 + NADPH + DOX. Primeiro, espalhou-se a solução de lipídios (1 mmol/L) na interface (1). Após 20 minutos para evaporação do solvente, foram adicionados 25 μ L do CYP3A4 (50 nmol/L) na interface (2). Para incorporação do CYP3A4, aguardou-se 120 minutos, e seguiu-se com a injeção de 200 μ L do NADPH (3 mmol/L) na subfase (3). Após 60 minutos de interação com o NADPH, 200 μ L de DOX (1 mmol/L) foram injetados na subfase (4). Depois de 60 minutos de interação com a DOX, foram obtidas as isotermas de pressão superficial-área (5).

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.4 Cinética de adsorção

Para estabelecer os tempos de interação entre os compostos adicionados às monocamadas, foi medida a cinética de adsorção ao modelo M1, mantendo os parâmetros experimentais descritos na seção 2.3. Foi monitorada a variação da pressão de superfície em função do tempo, sem comprimir as barreiras. Para o NADPH, foi definido um tempo de contato semelhante ao da DOX, pois sua adição não permitiu verificar saturação da adsorção (estabilização da pressão de superfície), como o CYP3A4 e a DOX.

2.5 Microscopia no ângulo de Brewster

Para caracterização da morfologia dos filmes de Langmuir, foi realizada a microscopia no ângulo de Brewster (BAM) com o elipsômetro Accurion Nanofilm_EP4, acoplado a uma

cuba de Langmuir. A Figura 16 ilustra os principais componentes para aquisição das imagens, e o princípio da microscopia no ângulo de Brewster. Quando um feixe de laser com polarização paralela ao plano de incidência atinge a interface ar-água no ângulo de Brewster ($\theta_B \approx 53^\circ$), não há reflexão. Porém, na presença da monocamada os índices de refração são alterados, e o feixe de laser incidido sofre reflexão, detectada pela câmera com imagens em tempo real da interface.¹⁰¹ A formação das imagens depende da densidade superficial, orientação molecular, e espessura da monocamada.⁷⁰ Foi realizada a microscopia no ângulo de Brewster das monocamadas em diferentes estágios de compressão (pressões de superfície).

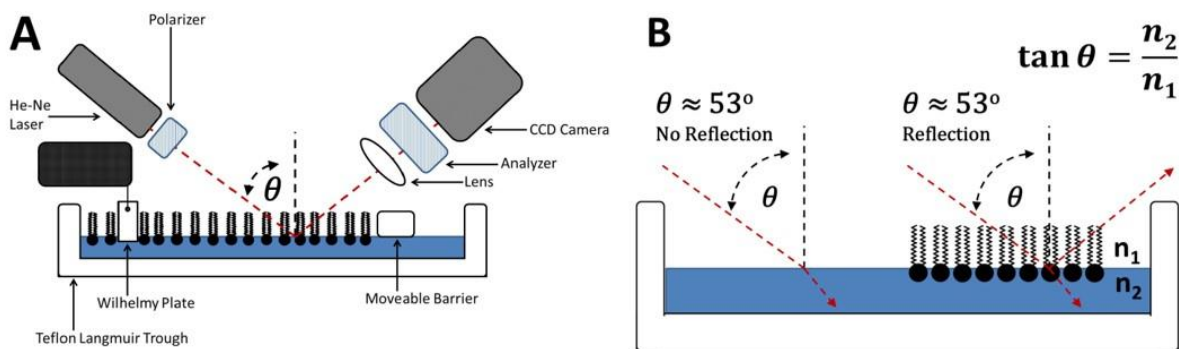


Figura 16 - Ilustração do aparato experimental (A) e do princípio da microscopia no ângulo de Brewster (B).
Fonte: DAEAR.¹⁰¹

2.6 Espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com modulação de polarização

Informações sobre o arranjo molecular na interface ar-água foram obtidas por espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com modulação de polarização (PM-IRRAS), com o equipamento KSV PMI 550 acoplado a uma cuba de Langmuir. Foram realizadas 6000 varreduras por espectro (10 minutos), em um ângulo de incidência de 81° e resolução de 8 cm^{-1} . Para esse ângulo de incidência, um momento de dipolo de transição paralelo à superfície resulta em uma banda de absorção orientada positivamente em relação à linha de base. Uma banda orientada negativamente à linha de base indica um momento de dipolo perpendicular à interface. Para uma orientação diferente desses casos extremos (paralelo ou perpendicular), há uma competição das contribuições positiva e negativa para formação da banda.¹⁰²⁻¹⁰³ A intensidade das bandas de absorção é proporcional à concentração e orientação do momento de dipolo de transição.¹⁰⁴ Devido à modulação do feixe infravermelho, o sinal PM-IRRAS é insensível a contribuições isotrópicas, reduzindo sinais interferentes do ambiente (CO_2 e vapor de água).¹⁰⁵ A diferença na absorção da luz infravermelho, com polarização

paralela e perpendicular ao plano de incidência por moléculas na interface, é a base do sinal PM-IRRAS, cujo espectro normalizado é dado por:

$$\frac{\Delta S}{S} = \frac{S_{(d)} - S_{(0)}}{S_{(0)}} \quad (8)$$

$S_{(d)}$ e $S_{(0)}$ são os espectros PM-IRRAS na presença e ausência da monocamada, respectivamente.

Além de informações sobre a orientação do momento de dipolo de transição, o PM-IRRAS permite obter indicativos de interações de hidrogênio, interações eletrostáticas e desidratação de grupos polares. Essas informações são obtidas pela análise dos modos de vibração, geralmente atribuídas a deslocamentos e alterações nas bandas dos espectros PM-IRRAS por moléculas adicionadas ao sistema.⁷⁰ Informações sobre a estrutura secundária de proteínas e sua orientação também podem ser obtidas.¹⁰⁶

2.7 Técnica de Visualização de Informações IDMAP (*Interactive Document Mapping*)

A análise de um conjunto de dados pode ser auxiliada por técnicas de visualização. Neste trabalho, foi empregada a técnica de projeção multidimensional *Interactive Document Mapping*¹⁰⁷ (IDMAP) através da plataforma *Projection Explorer*¹⁰⁸ (PEX), para comparação das isotermas π -A, módulos de compressibilidade superficial e espectros PM-IRRAS. Formalmente, cada instância (amostra) no espaço original é definida como um vetor de características $X = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ projetado em um espaço de menor dimensão $Y = \{y_1, y_2, \dots, y_n\}$. A função injetora $f = \frac{\delta(x_i, x_j) - \delta_{\min}}{\delta_{\max} - \delta_{\min}} - d(y_i, y_j)$ busca identificar o conjunto de pontos no espaço projetado de modo a minimizar a diferença entre $|\delta(x_i, x_j) - d(f(x_i), f(x_j))|$, sendo $\delta(x_i, x_j)$ e $d(y_i, y_j)$ as medidas de distância Euclidiana (dissimilaridades) entre as instâncias i e j no espaço original e reduzido, respectivamente. As distâncias δ_{\max} e δ_{\min} são as distâncias máxima e mínima no espaço original.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ O IDMAP baseia-se na combinação da técnica *FastMap*¹¹¹ para configuração inicial dos pontos, com a *Force Scheme*¹⁰⁹ que ajusta seus posicionamentos. As isotermas dos modelos de membrana (região de 105 - 25 Å²) foram convertidas em um conjunto de pontos no plano (2D). Para os lipídios puros, devido às diferentes áreas moleculares, foi utilizado um conjunto de pressões (em torno de 0 - 35 mN/m) para projeção. Para o PM-IRRAS, os espectros corrigidos por linha de base foram separados em uma região polar (1000 - 1800 cm⁻¹) e apolar (2800 - 3000 cm⁻¹), com os dados padronizados pela Equação 9 para minimizar problemas associados às diferentes escalas.¹¹²

$$\text{Padronização} = \frac{(\text{valor original} - \text{média})}{\text{desvio padrão}} \quad (9)$$

A partir dos mapas gerados foram calculadas as distâncias Euclidianas relativas entre os pontos utilizando o software *ImageJ*, para avaliar a correlação (similaridade) entre as amostras. Pontos próximos no espaço projetado indicam instâncias similares, enquanto os distantes, instâncias dissimilares.¹¹³

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Lipídios puros

A Figura 17 mostra as isotermas π -A do Chol, DPPC, DPPE e PI, e seus respectivos módulos de compressibilidade superficial. O Chol apresentou uma área inicial (*lift-off*) de $A_{\pi>0} \approx 40 \text{ \AA}^2$, e pressão de colapso ($\pi_c \approx 45 \text{ mN/m}$). O platô na isoterma e decréscimo abrupto no módulo de compressibilidade do DPPC indicam sua transição de fase líquido-expandida (LE) para líquido-condensada (LC). A isoterma do DPPE apresentou uma área inicial $A_{\pi>0} \approx 50 \text{ \AA}^2$ inferior ao DPPC, devido à diferença no grupo polar. O PI exibiu predominantemente uma fase LE pela dificuldade de empacotamento molecular por conter uma distribuição de ácidos graxos, com diferentes comprimentos e saturações. O maior volume ocupado pelo grupo inositol, comparado aos demais lipídios, também contribui para reduzir o empacotamento do PI. As isotermas dos lipídios puros são consistentes com a literatura,^{68,74,114,115} com pequenas diferenças associadas às condições experimentais. Ressalte-se que devido a mudanças em reagentes e aparatos experimentais (cuba de Langmuir) no decorrer deste trabalho, houve variações nas propriedades desses lipídios, principalmente do módulo de compressibilidade superficial do colesterol. Por isso, para as interações desses lipídios com o CYP3A4 e a DOX são apresentados os comportamentos reprodutíveis nas correspondentes condições experimentais, para correta comparações dos efeitos.

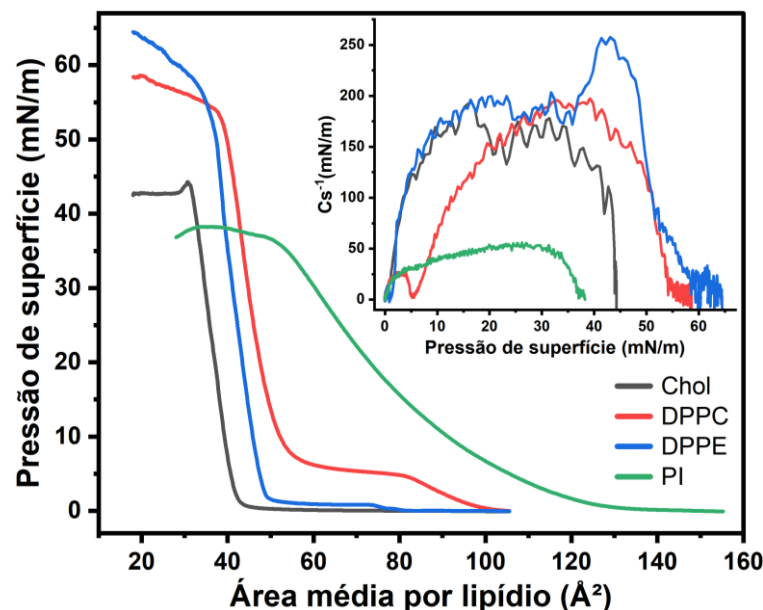


Figura 17 - Isotermas π -A do Chol, DPPC, DPPE e PI em PBS pH 7,4 com temperatura em 22 °C. A figura inserida mostra os respectivos módulos de compressibilidade superficial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Lipídios com CYP3A4

Para avaliar a influência dos componentes lipídicos na incorporação do CYP3A4 nos modelos de membrana, investigou-se a interação do CYP3A4 com o Chol, DPPC, DPPE e PI. A Figura 18 mostra as isotermas π -A e módulos de compressibilidade superficial. A adição do CYP3A4 provocou um aumento da área molecular de 13,5 e 6,7 Å² ao Chol, 18,6 e 4,1 Å² ao DPPC, 10,7 e 5,0 Å² ao DPPE, e 24,1 e 4,5 Å² ao PI, nas pressões de 10 e 30 mN/m, respectivamente. Os módulos de compressibilidade superficial reduziram em 157,5 mN/m para o Chol, 92,8 mN/m para o DPPC, 105,8 mN/m para o DPPE, e 24,1 mN/m para o PI na pressão de 30 mN/m, como mostra a Tabela 3. Essas alterações indicam a adsorção do CYP3A4, que varia com a composição da monocamada.

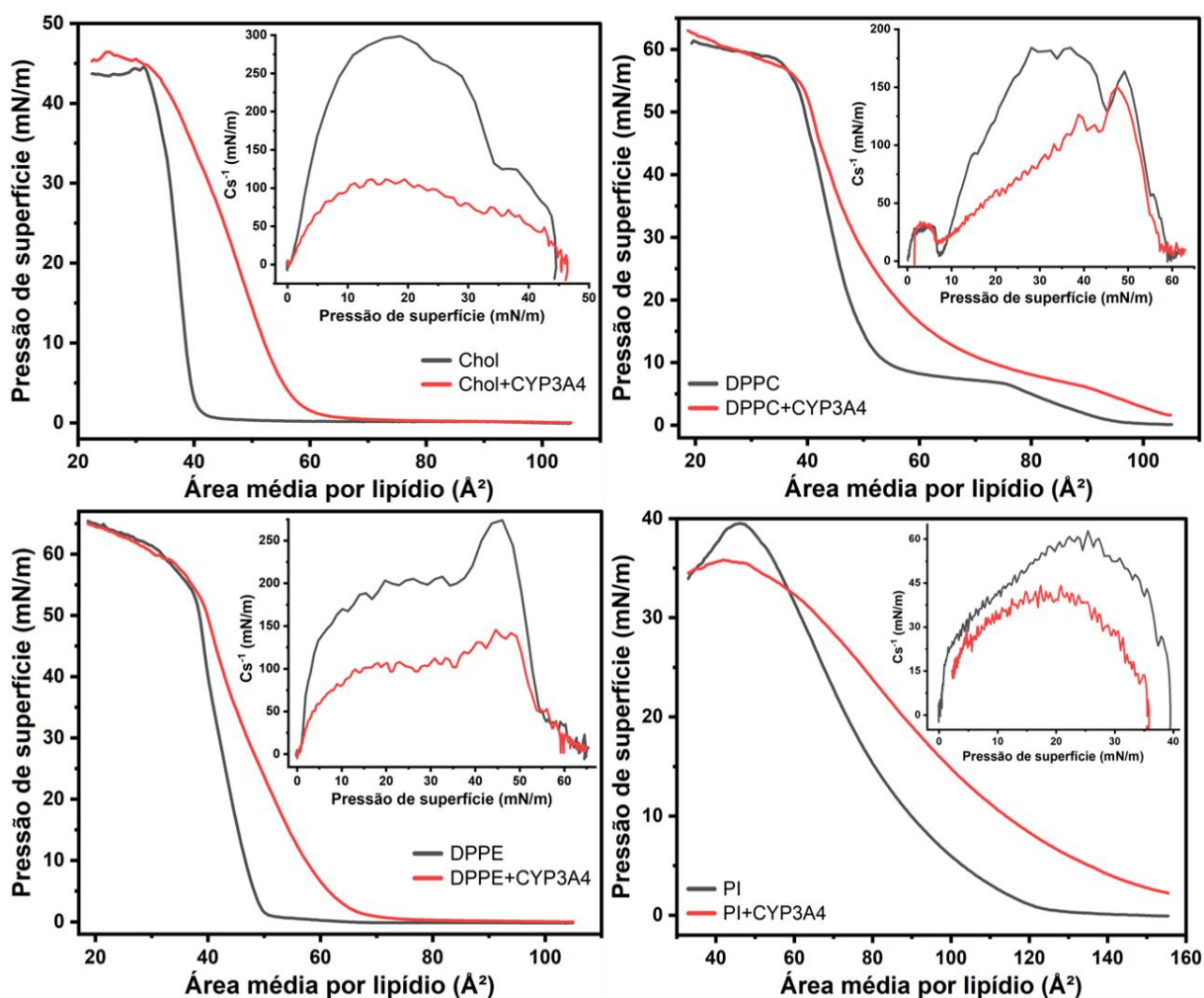


Figura 18 - Isotermas π -A do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não CYP3A4 em PBS pH 7,4 com temperatura em 22 °C. As figuras inseridas mostram os respectivos módulos de compressibilidade superficial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Área média por lipídio (A) e módulo de compressibilidade superficial (Cs^{-1}) do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não CYP3A4, nas pressões (π) de 10 e 30 mN/m.

Sistema	$A_{\pi=10}(\text{\AA}^2)$	$A_{\pi=30}(\text{\AA}^2)$	$Cs_{\pi=10}^{-1}(\text{mN/m})$	$Cs_{\pi=30}^{-1}(\text{mN/m})$
Chol	$38,6 \pm 0,4$	$35,9 \pm 0,2$	$267,1 \pm 36,2$	$235,3 \pm 32,5$
Chol+CYP3A4	$52,1 \pm 0,7$	$42,6 \pm 0,9$	$104,2 \pm 2,4$	$77,8 \pm 10,6$
DPPC	$54,3 \pm 0,1$	$44,6 \pm 0,3$	$31,1 \pm 2,3$	$181,9 \pm 9,5$
DPPC+CYP3A4	$72,9 \pm 2,4$	$48,7 \pm 0,7$	$24,0 \pm 2,1$	$89,1 \pm 4,8$
DPPE	$46,7 \pm 0,4$	$42,0 \pm 0,3$	$161,0 \pm 5,6$	$209,6 \pm 7,5$
DPPE+CYP3A4	$57,4 \pm 1,0$	$47,0 \pm 0,8$	$84,8 \pm 1,5$	$103,8 \pm 2,4$
PI	$89,9 \pm 0,4$	$61,8 \pm 0,4$	$42,1 \pm 1,3$	$50,7 \pm 1,0$
PI+CYP3A4	$114,0 \pm 2,5$	$66,3 \pm 2,7$	$34,7 \pm 1,7$	$26,6 \pm 5,0$

Fonte: Elaborada pelo autor.

O Citocromo P450 3A4 possui resíduos hidrofóbicos (segmento transmembrana da α -hélice no terminal N) que se ligam à membrana celular.^{12,39} Tem carga total positiva em pH 7,4, pois seu ponto isoelétrico é 8,3.¹¹⁶ Essas propriedades podem estar associadas com a maior expansão apresentada pelo PI em baixas pressões superficiais ($\pi < 30$ mN/m), pois diferentemente dos demais lipídios o PI possui carga total negativa devido ao grupo fosfato. Comportamento semelhante foi reportado por Navrátilová *et al.*,¹⁴ que analisaram a interação do Citocromo P450 3A4 com bicamadas lipídicas de DOPC, DOPE, DOPG e DOPS por simulações de dinâmica molecular. A maior penetração do Citocromo P450 3A4 foi observada nas bicamadas lipídicas com carga negativa (DOPG e DOPS), o que foi atribuído a interações eletrostáticas e interações de hidrogênio entre o Citocromo P450 3A4 e o grupo polar dos lipídios aniônicos. Contudo, o CYP3A4 utilizado neste trabalho é constituído por uma mistura, isto é, microsossomos contendo citocromos P450 3A4, P450 oxidoredutases e citocromos b5 recombinantes humanos, cuja carga total não pode ser estimada com exatidão devido à limitada informação do fornecedor. Além da carga negativa, o PI possui uma distribuição de ácidos graxos em sua cadeia apolar, com diferentes comprimentos e saturações, que podem favorecer a incorporação do CYP3A4. Para altas pressões superficiais ($\pi > 30$ mN/m), as isotermas contendo CYP3A4 se aproximam do perfil dos lipídios puros, indicando a expulsão do CYP3A4 da interface.

A adsorção do CYP3A4 reduziu em maior intensidade os módulos de compressibilidade superficial do Chol, DPPE, DPPC e PI, respectivamente na pressão de 30 mN/m (Tabela 3). Portanto, as monocamadas com caráter mais condensado sofreram maiores alterações no empacotamento molecular. Isso pode estar associado à resistência para acomodação do

CYP3A4 nas monocamadas condensadas, que apresentam menor área por molécula. Para monocamadas menos condensadas, o CYP3A4 pode acomodar-se com maior facilidade devido à grande área molecular, provocando pequenas alterações no arranjo lipídico e Cs^{-1} .

A Figura 19 mostra as imagens de microscopia no ângulo de Brewster dos lipídios contendo ou não CYP3A4 em diferentes pressões superficiais. O colesterol apresentou domínios no início da compressão, indicativo de coexistência entre fases.¹¹⁷ Com o aumento da pressão superficial formou uma monocamada homogênea típica de fase condensada. Para o DPPC, domínios surgiram durante sua transição de fase líquido-expandida (LE) para líquido-condensada (LC), e coalesceram estabelecendo uma monocamada uniforme em altas pressões. De maneira semelhante, Maximino *et al.*¹¹⁸ observaram domínios com formato de folhas de trevo (*cloverleaf shape*) para o DPPC em água Milli-Q a partir de 8 mN/m, com a monocamada atingindo homogeneidade em 30 mN/m. Notam-se grandes domínios para o DPPE no início da compressão, que se uniram formando um filme de Langmuir homogêneo. Segundo Chen *et al.*,¹¹⁹ interações de hidrogênio envolvendo o grupo NH_3^+ de moléculas de DPPE contribuem para formação de grandes domínios. O fosfatidilinositol não apresentou domínios perceptíveis, estabelecendo uma monocamada uniforme desde o início da compressão, atribuído a sua predominante fase LE. A adsorção do CYP3A4 pode ser observada pela presença de estruturas com formas alongadas, que diferem dos domínios observados nos lipídios puros, principalmente nas monocamadas de Chol e DPPC em baixas pressões de superfície. Para o DPPC, nota-se também um aumento nas dimensões e afastamento entre os domínios lipídicos, coerente com a maior área molecular associada ao acréscimo do CYP3A4. A maior homogeneidade da monocamada do DPPE e PI não permitiu observar evidências da incorporação do CYP3A4.

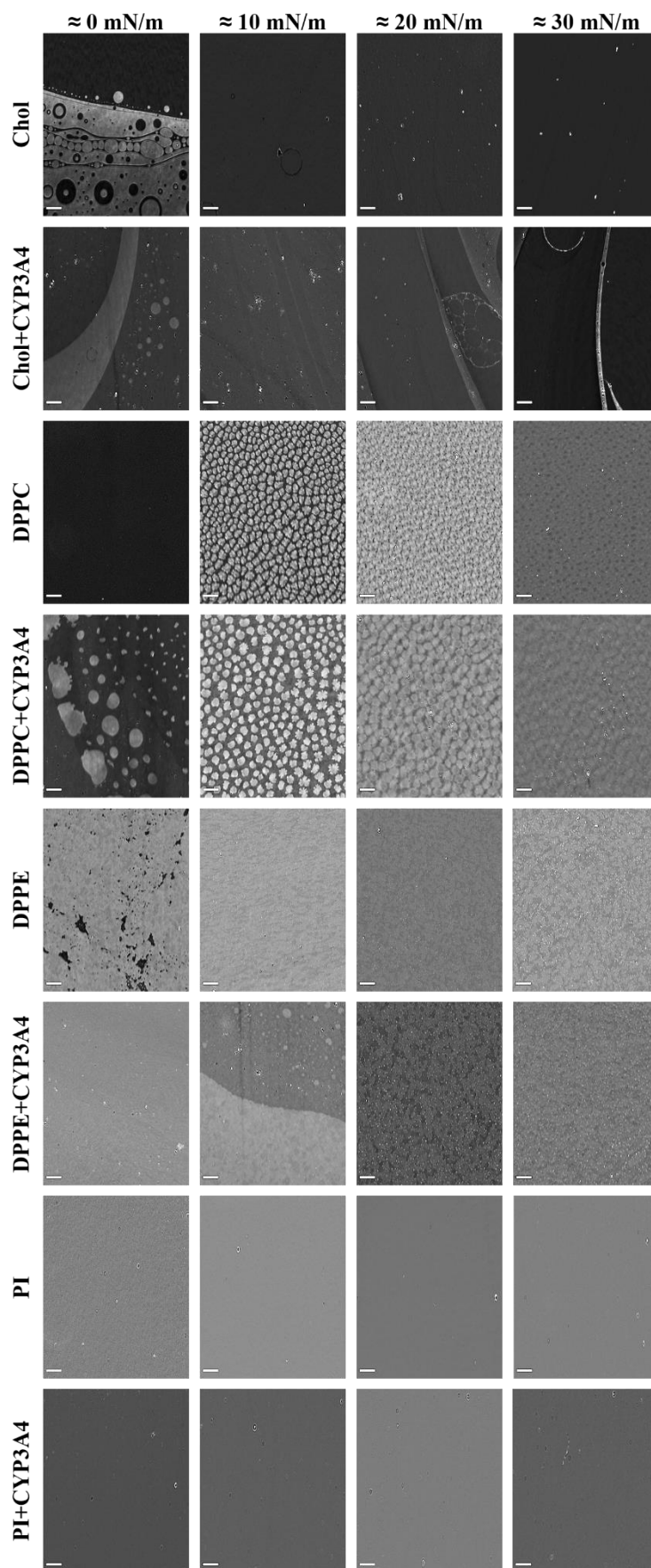


Figura 19 - Imagens de microscopia no ângulo de Brewster do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não CYP3A4 em PBS pH 7,4 a 22 °C, para diferentes pressões superficiais. A barra de escala representa 50 μ m.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para melhor comparação das alterações associadas ao CYP3A4 nas monocamadas de Chol, DPPC, DPPE e PI, foi realizada a projeção IDMAP das isothermas π -A e módulos de compressibilidade superficial, como mostram as Figura 20 e 21. Nota-se que os lipídios puros se distanciam dos respectivos clusters contendo CYP3A4. Isso indica que o acréscimo de CYP3A4 induz mudanças significativas nas monocamadas lipídicas, pois o distanciamento entre os grupos está associado à dissimilaridade entre eles.¹¹³ A Figura 20 mostra uma maior distância relativa entre o PI e PI+CYP3A4, ou seja, o CYP3A4 provocou maiores alterações na isoterma do fosfatidilinositol do que nos demais lipídios. Esse resultado é consistente com a análise da Figura 18. Diferentemente da comparação em determinadas pressões de superfície (10 e 30 mN/m), o IDMAP considerou todas as isothermas na faixa de 3 - 30 mN/m para projeção. Isso reforça que o efeito do CYP3A4 varia com a composição da monocamada, e que o PI parece ser mais afetado. A Figura 21 mostra o impacto da adição do CYP3A4 nos módulos de compressibilidade superficial. A maior distância relativa aos respectivos clusters contendo CYP3A4 foi observada para o Chol, DPPE, DPPC e PI, respectivamente. Isso indica dissimilaridade entre os módulos de compressibilidade superficial com o acréscimo do CYP3A4, principalmente para os lipídios que ocupam menores áreas, isto é, o Chol, DPPE, DPPC e PI, respectivamente. Esse resultado é consistente com a interpretação que o CYP3A4 afeta em maior intensidade o empacotamento das monocamadas condensadas, devido à maior dificuldade de acomodação.

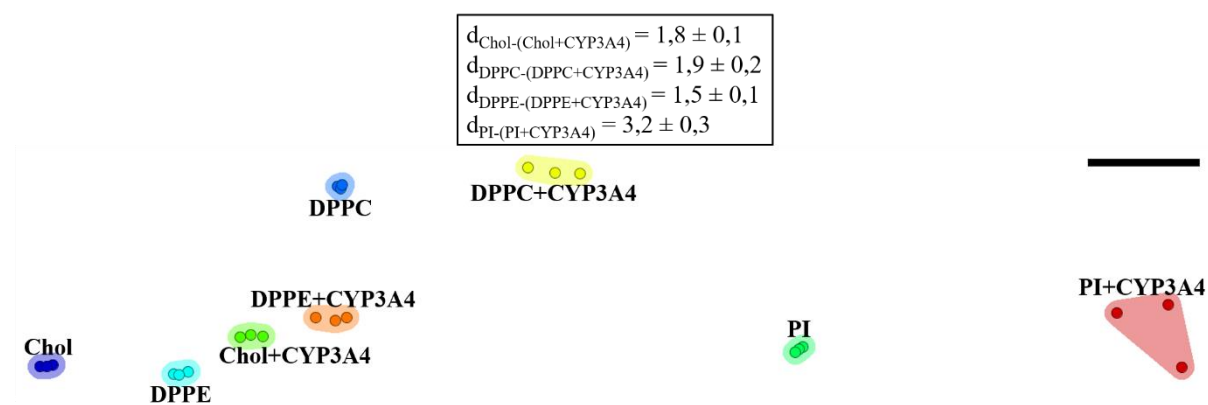


Figura 20 - IDMAP das isothermas do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não CYP3A4. Cada círculo representa uma isoterma na faixa de 3 - 30 mN/m, com o cluster indicando a triplicata. A barra de escala retrata a referência para o cálculo da distância relativa entre os clusters, apresentada no quadro superior.

Fonte: Elaborada pelo autor.

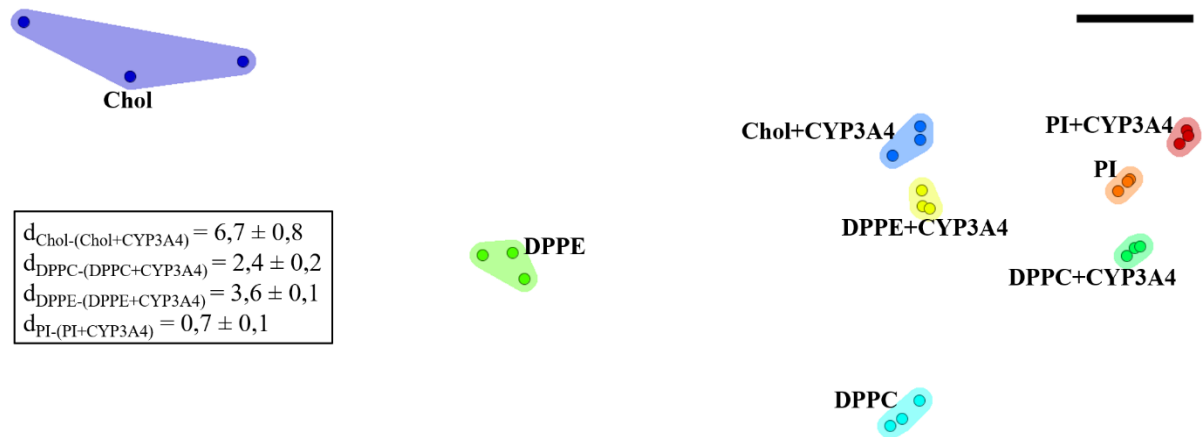


Figura 21 - IDMAP dos módulos de compressibilidade superficial do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não CYP3A4. Cada círculo representa o módulo de compressibilidade na faixa de 3 - 30 mN/m, e o cluster a triplicata do sistema. A barra de escala retrata a referência para o cálculo da distância relativa, mostrada no quadro.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3 Lipídios com Doxorrubicina (DOX)

Para avaliar a influência dos componentes lipídicos na interação com a DOX, foi investigado o efeito nas monocamadas de Chol, DPPC, DPPE e PI. A Figura 22 mostra que a DOX provocou um aumento da área molecular e redução do módulo de compressibilidade superficial para todos os lipídios. Os valores das áreas e módulos de compressibilidade para as pressões de 10 e 30 mN/m estão na Tabela 4. O PI exibiu a maior expansão, 37,4 e 18,8 Å² em 10 e 30 mN/m, respectivamente. Em contraste, o DPPC apresentou o menor acréscimo na área molecular, 15,1 e 8,3 Å² para 10 e 30 mN/m. Em relação ao módulo de compressibilidade superficial, o Chol sofreu a maior alteração e o PI a menor, ambos Cs⁻¹ diminuindo em 91,5 e 18,5 mN/m para pressão superficial de 30 mN/m, respectivamente.

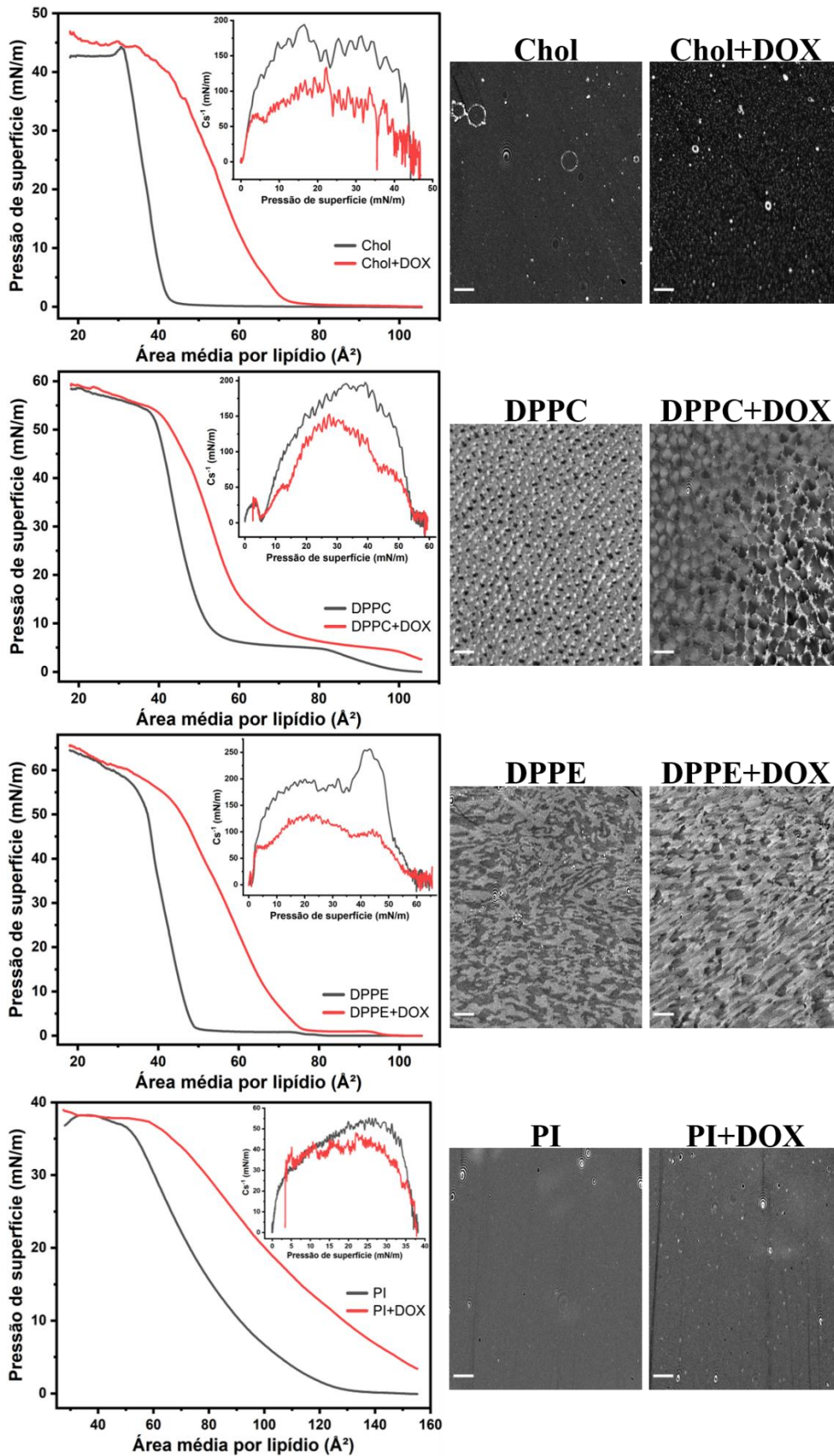


Figura 22 - Isothermas π -A do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não DOX em PBS pH 7,4 a 22 °C. As figuras inseridas mostram os respectivos módulos de compressibilidade superficial. Ao lado, estão as imagens de BAM dos respectivos sistemas em 30 mN/m, com a barra de escala representando 50 μ m.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Área média por lipídio (A) e módulo de compressibilidade superficial (C_s^{-1}) do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não DOX, nas pressões (π) de 10 e 30 mN/m.

Sistema	$A_{\pi=10}(\text{\AA}^2)$	$A_{\pi=30}(\text{\AA}^2)$	$C_{s_{\pi=10}}^{-1}(\text{mN/m})$	$C_{s_{\pi=30}}^{-1}(\text{mN/m})$
Chol	$39,3 \pm 0,2$	$34,8 \pm 0,3$	$164,9 \pm 5,6$	$169,8 \pm 10,6$
Chol+DOX	$61,8 \pm 1,6$	$50,0 \pm 0,9$	$83,5 \pm 18,8$	$78,3 \pm 20,0$
DPPC	$52,2 \pm 1,0$	$44,8 \pm 0,5$	$67,9 \pm 9,6$	$182,8 \pm 13,4$
DPPC+DOX	$67,3 \pm 0,6$	$53,1 \pm 0,8$	$38,4 \pm 3,4$	$144,7 \pm 1,7$
DPPE	$45,9 \pm 0,2$	$41,2 \pm 0,2$	$171,2 \pm 20,8$	$187,6 \pm 12,7$
DPPE+DOX	$67,2 \pm 0,4$	$56,7 \pm 0,9$	$94,1 \pm 3,1$	$111,8 \pm 2,8$
PI	$91,3 \pm 1,8$	$60,3 \pm 1,3$	$39,4 \pm 1,6$	$54,7 \pm 2,1$
PI+DOX	$128,7 \pm 0,8$	$79,1 \pm 0,5$	$39,4 \pm 2,1$	$36,2 \pm 0,1$

Fonte: Elaborada pelo autor.

Antraciclina, como a DOX, são anfifílicas com dois domínios principais: (1) o anel dihidroxiantraquinona e (2) o grupo daunosamina,¹²⁰ como mostra a Figura 23. Em pH 7,4 a daunosamina está majoritariamente protonada ($pK_a \approx 8,4$), favorecendo interações eletrostáticas.¹²¹ A DOX interage com lipídios mediante: (i) interações eletrostáticas entre a daunosamina e o grupo fosfato ou fosfolipídios carregados negativamente; e (ii) interações hidrofóbicas envolvendo a intercalação do anel dihidroxiantraquinona nas cadeias alquílicas de fosfolipídios.^{16,20} Portanto, comparado aos lipídios zwitteriônicos (DPPC e DPPE) e neutro (Chol), o maior aumento da área molecular do PI pode estar associado a interações eletrostáticas mais pronunciadas entre a DOX carregada positivamente e a parte polar do PI carregada negativamente devido ao grupo fosfato. Essa interpretação é consistente com a menor expansão apresentada pelo DPPC, com a diferença relativa ao DPPE atribuída à acomodação geométrica e diferença entre os grupos polares. Apesar de ambos lipídios serem zwitteriônicos, a parte polar do DPPC ocupa um maior espaço, que pode dificultar a interação eletrostática entre a DOX e o grupo fosfato.

Matyszewska *et al.*¹²² estudaram as interações da DOX e Idarrubicina (IDA) com os lipídios DMPC e DMPS. Os autores verificaram um deslocamento para maiores áreas por molécula e redução dos módulos de compressibilidade superficial, mais pronunciados para DMPS. Isso foi atribuído às interações eletrostáticas entre a fosfoserina e o grupo amina das antraciclina com carga positiva. A parte apolar do PI é constituída por cadeias alifáticas com diferentes comprimentos e saturações, que podem contribuir para incorporação da DOX, como sugere o trabalho de Matyszewska e Jocek.¹²³ Os autores investigaram a interação da Pirarrubicina (THP) com monocamadas de fosfatidiletanolaminas (PE) contendo diferentes

cadeias alquílicas. O 1,2-dilinoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DLOPE, C18:2) exibiu o maior aumento da área molecular, devido à efetiva penetração da THP na monocamada, favorecida pela inclinação das cadeias dos lipídios com duplas ligações.

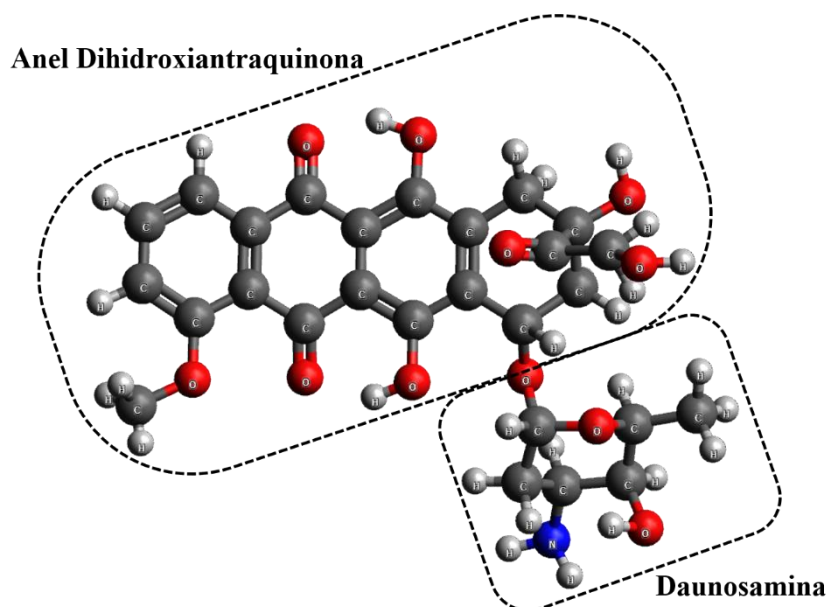


Figura 23 - Principais domínios da DOX: o anel dihidroxiantraquinona e o grupo daunosamina.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Apesar da carga total nula e limitada interação eletrostática com a DOX, o Chol exibiu uma considerável expansão da área molecular. Alves *et al.*¹²⁴ analisaram as interações da Daunorrubicina (DNR) e DOX solubilizadas em tampão Hepes pH 7,4 (10 $\mu\text{mol/L}$), com monocamadas de DPPC, DPPC:SM (8:2), e DPPC:SM:Chol (7:1,5:1,5). As monocamadas sem colesterol exibiram maiores alterações nas propriedades com a adição dos quimioterápicos, atribuído à similaridade das estruturas da DOX e DNR com o Chol, e a competição para o arranjo nas monocamadas. Zaborowska *et al.*¹²⁵ investigaram a interação da DNR e IDA com monocamadas de colesterol em PBS pH 7,4. Os autores observaram um aumento da área por molécula e redução do módulo de compressibilidade superficial conforme a concentração das antraciclina na subfase. A análise da histerese em múltiplos ciclos de compressão e expansão indicou a formação de agregados droga-colesterol, com afinidade do colesterol a IDA. De acordo com esses trabalhos, o efeito da DOX na monocamada de Chol pode estar associado à competitividade entre as moléculas para adsorção na interface, formação de agregados DOX-Chol, além de possíveis interações de hidrogênio envolvendo o grupo (OH) do Chol e o grupo (NH_3^+) das antraciclina.¹²⁶

A localização exata da DOX nas monocamadas não pode ser determinada a partir das isotermas π -A, porém informações sobre sua distribuição podem ser deduzidas. Matyszewska

e Moczulska¹²⁷ investigaram a interação da DOX em tampão Britton-Robinson pH 5,4 e 7,4 com filmes de Langmuir de DMPS. Seus resultados indicam que em pH 5,4 prevalecem interações eletrostáticas, e a DOX não interage significativamente com a parte apolar do DMPS, sendo expelida da monocamada em altas pressões. No pH 7,4 o número de moléculas de DOX não ionizadas aumenta, e interações hidrofóbicas entre as cadeias apolares do DMPS e a DOX (não carregada) são relevantes, favorecendo a permanência da droga na monocamada. Portanto, além da interação com a parte polar dos lipídios, a DOX pode incorporar-se nas cadeias apolares do Chol, DPPC, DPPE e PI, considerando o pH 7,4 da subfase e os deslocamentos para maiores áreas em altas pressões de superfície ($\pi > 30$ mN/m) na Figura 22.

O módulo de compressibilidade superficial reflete o empacotamento molecular. Isso indica que em 30 mN/m a DOX afetou em maior intensidade o arranjo das moléculas de Chol do que para os demais lipídios. Assim, a DOX parece perturbar mais o empacotamento das monocamadas com caráter condensado (Chol > DPPE > DPPC > PI), como observado para o CYP3A4 (seção 3.2). Isso pode estar relacionado à maior dificuldade para acomodação da DOX, induzindo maior desordem nesses sistemas condensados. No trabalho de Matyszewska e Jocek,¹²³ a adição da THP quase não alterou o módulo de compressibilidade superficial do DLOPE, porque a monocamada era fluida e com fácil acomodação das moléculas de Pirarrubicina. Foi um resultado similar ao observado para interação entre a DOX e o PI.

As imagens de BAM na Figura 22 revelam que a DOX alterou a morfologia dos domínios lipídicos, formando estruturas menos uniformes ou heterogêneas. Esse resultado indica um desordenamento das monocamadas, consistente com a redução do módulo de compressibilidade superficial, isto é, ao decréscimo do caráter condensado para um estado de maior natureza líquida. O colesterol sofreu a maior alteração, exibindo pequenas estruturas brilhantes (como o PI), que sugerem a formação de agregados ou nucleação dos domínios lipídicos e da DOX, consistente com o trabalho de Zaborowska *et al.*¹²⁵ Para o DPPC e DPPE observa-se um aumento no tamanho dos domínios. Ou seja, a DOX pode favorecer a coalescência entre as moléculas lipídicas, enquanto aumenta o espaçamento entre os domínios.

A Figura 24 mostra a projeção IDMAP das isotermas de Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não DOX. Nota-se uma separação entre os respectivos clusters de lipídios com a adição da DOX, indicativo de dissimilaridade, que o acréscimo de DOX induz alterações nas monocamadas. As distâncias médias entre os clusters em unidades da barra de escala são apresentadas no quadro da Figura 24. O PI apresentou a maior distância relativa, isto é, a DOX provocou maiores alterações no PI do que nos demais lipídios. Os clusters para DPPC e DPPC+DOX apresentaram a menor distância relativa, indicando maior similaridade e menor

efeito da DOX. Esses resultados são consistentes com as discussões das isotermas π -A (Figura 22). Ressalte-se que, diferentemente da comparação em determinadas pressões superficiais (10 e 30 mN/m), a projeção IDMAP considerou toda a isoterma na faixa de 4 - 35 mN/m.

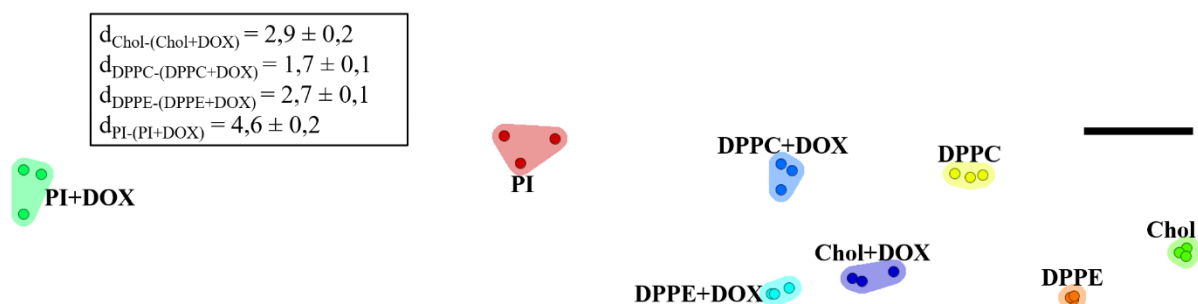


Figura 24 - IDMAP das isotermas do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não DOX. Cada círculo representa uma isoterma na faixa de 4 - 35 mN/m, com o cluster indicando a triplicata. A barra de escala retrata a referência para o cálculo da distância entre os clusters, apresentada no quadro.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 25 mostra os espectros PM-IRRAS do Chol, DPPC, DPPE e PI contendo ou não DOX em 30 mN/m. Para a região de 1000 - 1800 cm^{-1} , correspondente às vibrações da parte polar dos lipídios, as principais bandas do colesterol estão em 1042, 1165, 1254 e 1655 cm^{-1} . São atribuídas aos estiramentos do grupo C-O,¹²⁸ do C-C, deformações angulares CH_2 , e estiramentos C=C, respectivamente.¹²⁹ Para os fosfolipídios (DPPC, DPPE e PI) destacam-se os estiramentos simétricos e assimétricos do grupo fosfato (PO_2^-), e os estiramentos do grupo carbonila (C=O). São as bandas em 1088, 1227 e 1736 cm^{-1} para o DPPC, 1072, 1219 e 1732 cm^{-1} para o DPPE, e em 1046, 1242 e 1732 cm^{-1} para o PI, respectivamente.^{118,130-131} A região de 2800 - 3000 cm^{-1} contém as vibrações das cadeias apolares dos lipídios. Para o colesterol, podem-se identificar bandas em torno de 2847, 2882, 2940 e 2974 cm^{-1} , relacionadas aos estiramentos simétricos CH_2 e CH_3 , e estiramentos assimétricos do grupo CH_3 *in-skeletal plane* e *out-of-skeletal plane*, respectivamente.⁶⁸ Notam-se bandas em 2851 e 2917 cm^{-1} para o DPPC, 2851 e 2917 cm^{-1} para o DPPE, e em 2855 e 2905 cm^{-1} para o PI, atribuídas aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo CH_2 , respectivamente. Vibrações associadas aos estiramentos assimétricos CH_3 também podem ser observadas em torno de 2955 cm^{-1} , principalmente para o DPPC e PI.^{118,130-131}

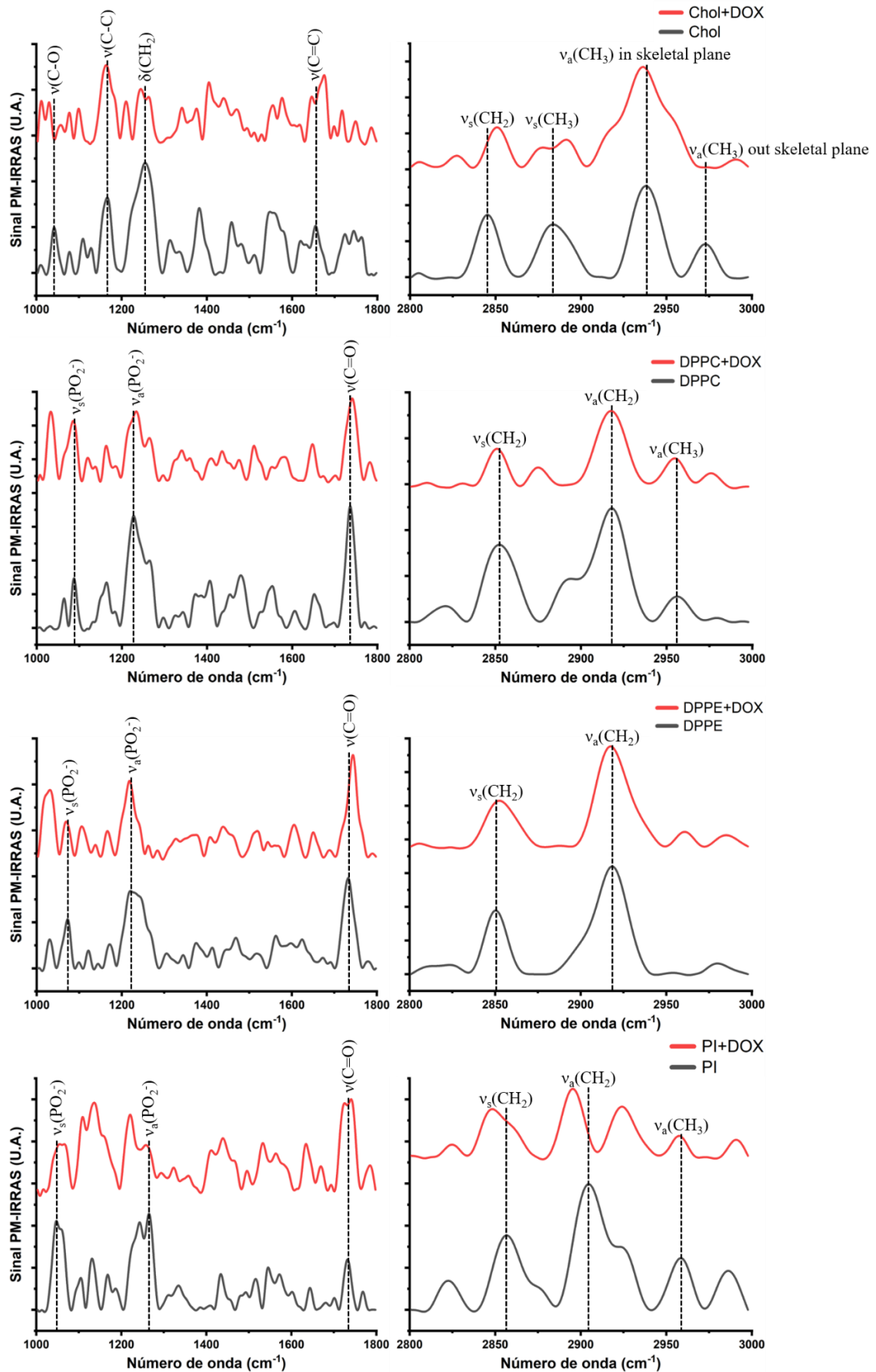


Figura 25 - Espectros PM-IRRAS dos lipídios contendo ou não DOX em PBS pH 7,4 a 22 °C na pressão superficial de 30 mN/m.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na comparação com os espectros dos lipídios puros na região de 1000 - 1800 cm^{-1} , a DOX provocou alterações na intensidade e na forma das bandas dos lipídios. Nota-se o aparecimento de uma banda entre 1010 - 1030 cm^{-1} , atribuída aos estiramentos do grupo C-O-C, C-OH, e deformações angulares C-H da DOX. Vibrações associadas ao anel da DOX são também observadas por volta de 1400 - 1440 cm^{-1} .^{132,134} Essas mudanças no espectro PM-IRRAS indicam a interação da DOX com a parte polar dos lipídios, consistente com as interpretações das isotermas π -A. Para região de 2800 - 3000 cm^{-1} , a adição da DOX induziu variações na intensidade, no formato, e pequenos deslocamentos nas bandas dos lipídios. A sobreposição com o sinal dos lipídios dificulta a identificação de bandas associadas a DOX nessa região. Porém, contribuições relacionadas aos estiramentos C-H da DOX são esperadas em torno de 2900 - 2940 cm^{-1} .¹³²⁻¹³³ Essas alterações em 2800 - 3000 cm^{-1} sugerem que a DOX afeta o arranjo das cadeias apolares dos lipídios.

O IDMAP dos espectros PM-IRRAS em 1000 - 1800 cm^{-1} sugere que a DOX afeta em maior intensidade o Chol e o PI. Como mostra a Figura 26, o Chol e o PI apresentaram as maiores distâncias aos respectivos pontos contendo DOX. Isso indica maior dissimilaridade, ou seja, que os espectros PM-IRRAS da região polar do Chol e do PI foram mais alterados pela DOX. A menor distância relativa foi observada para o DPPC e DPPC+DOX. Isto é, a parte polar do DPPC parece ser menos afetada pela DOX do que nos outros lipídios. Esses resultados são consistentes com as interpretações das isotermas. A pronunciada alteração na região polar do PI deve ser devida às interações eletrostáticas da DOX carregada positivamente e o fosfatidilinositol carregado negativamente. Por outro lado, o DPPC, um lipídio zwitteriônico, tem menos interação. Devido às dimensões do grupo $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ do DPPC, o acesso da DOX ao grupo fosfato carregado negativamente pode ser dificultado. Para o Chol, a mudança na região polar pode ser atribuída aos diferentes mecanismos de interação com a DOX, como a formação de aglomerados e interações de hidrogênio.¹²⁵⁻¹²⁶

Para região de 2800 - 3000 cm^{-1} , o IDMAP na Figura 27 revela maiores distâncias para o PI e Chol em relação aos respectivos pontos contendo DOX. Isso indica que as cadeias apolares do Chol e PI foram mais afetadas pela DOX. O DPPE e DPPE+DOX exibiu a menor separação na projeção, sugerindo que as cadeias alifáticas do DPPE são pouco afetadas pela DOX. Apesar das alterações na isoterma do DPPE com a adição da DOX, a orientação das cadeias apolares do DPPE em 30mN/m não parece variar consideravelmente. Esses resultados são coerentes com as imagens de microscopia no ângulo de Brewster, que revelam grandes variações morfológicas induzidas pela DOX para o Chol e PI, e mínimas para o DPPE. Isso

sugere maior penetração da DOX nas monocamadas de Chol e PI, que pode envolver interações hidrofóbicas entre o anel dihidroxiantraquinona e as cadeias alquílicas dos lipídios.^{16,20}

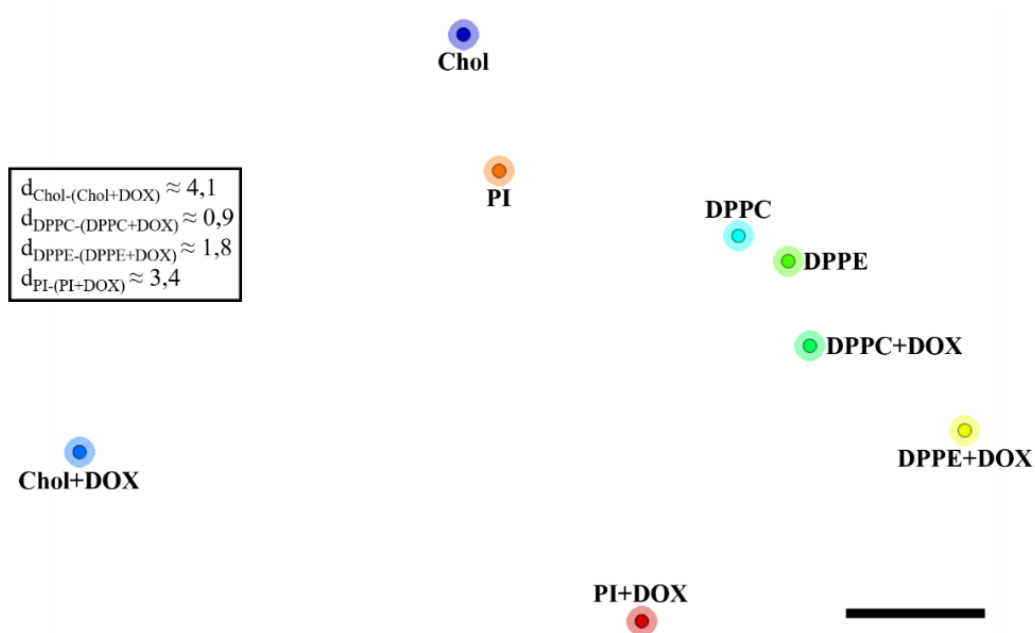


Figura 26 - IDMAP dos espectros PM-IRRAS dos lipídios contendo ou não DOX em 30 mN/m. Cada círculo representa um espectro na região de 1000 - 1800 cm^{-1} . A barra de escala possui unidade arbitrária, sendo apenas uma referência para o cálculo da distância entre os pontos, mostrada no quadro.

Fonte: Elaborada pelo autor.

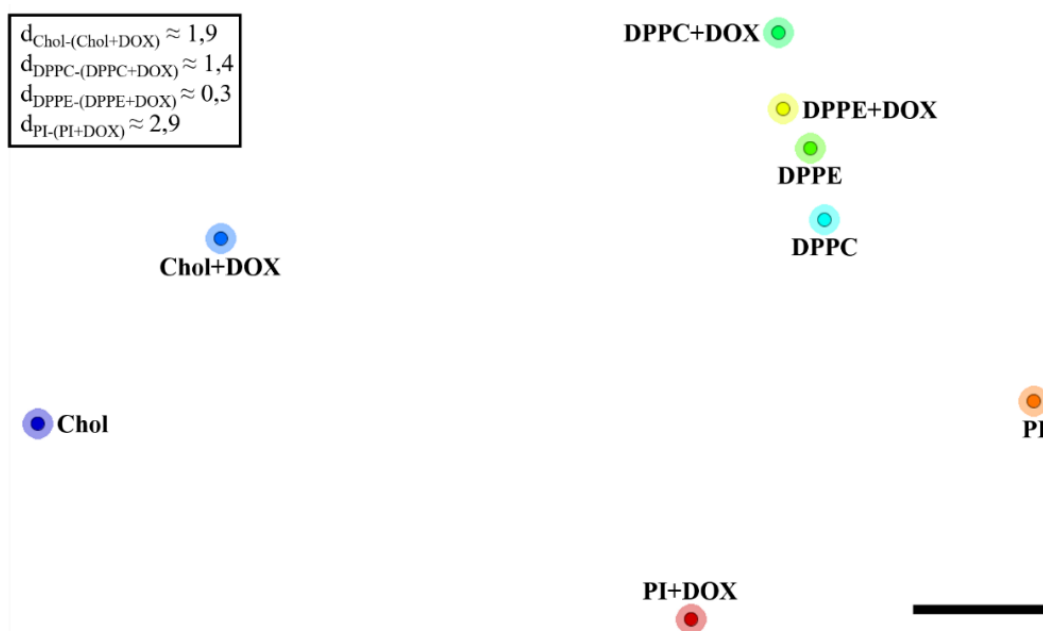


Figura 27 - IDMAP dos espectros PM-IRRAS (2800 - 3000 cm^{-1}) dos lipídios com e sem DOX em 30 mN/m. No quadro estão as distâncias relativas entre os pontos, com a barra de escala como referência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A DOX provocou expansões na área molecular e reduções no módulo de compressibilidade superficial, variando conforme os mecanismos de interação e estados de condensação das monocamadas. Em outras palavras, os efeitos da DOX dependem da composição da monocamada. O PI carregado negativamente e o Chol interagiram em maior intensidade com a DOX. As monocamadas condensadas parecem sofrer maior alteração no empacotamento molecular devido às moléculas de DOX, como indicam as maiores reduções nos módulos de compressibilidade superficial. Os espectros PM-IRRAS combinado com as projeções IDMAP e imagens de BAM indicam maior penetração (intercalação) da DOX nas monocamadas de Chol e PI.

3.4 Modelos de membrana

As isotermas para os vários modelos de membrana são mostradas na Figura 28. Há um deslocamento para menores áreas por molécula entre o modelo M1 e M4, com redução de 10,5 e 5,8 Å² nas pressões de 10 e 30 mN/m. O módulo de compressibilidade superficial aumentou em 14,9 e 8,8 mN/m para essas pressões. Na comparação entre os modelos M1 e M5-M7, nota-se deslocamento para maiores áreas. A diferença de área entre M7 e M1 foi 20,0 Å² em 10 mN/m e 9,8 Å² em 30 mN/m, com o módulo de compressibilidade superficial diminuindo em 6,7 e 22,4 mN/m. A distinção entre os modelos M1-M4 é atribuída ao aumento da fração de Chol, enquanto as diferenças entre os modelos M1 e M5-M7 são devidas ao acréscimo de PI, como indicado na Tabela 2.

O IDMAP das isotermas dos modelos de membrana e dos componentes lipídicos na Figura 29 evidencia a influência da concentração de colesterol (M2-M4) e fosfatidilinositol (M5-M7). A separação entre os clusters M1, M4 e M7, assinala a dissimilaridade entre os modelos. Pode-se observar uma aproximação dos modelos M2-M4 ao colesterol, indicada pelas menores distâncias relativas. Isso sugere maior similaridade entre as isotermas do M4 e do Chol, consistente com a maior quantidade de Chol no modelo. Para os modelos M5-M7, nota-se uma aproximação ao PI. A isoterma do M7 é a mais semelhante à do PI, como esperado pela maior fração de fosfatidilinositol em sua composição.

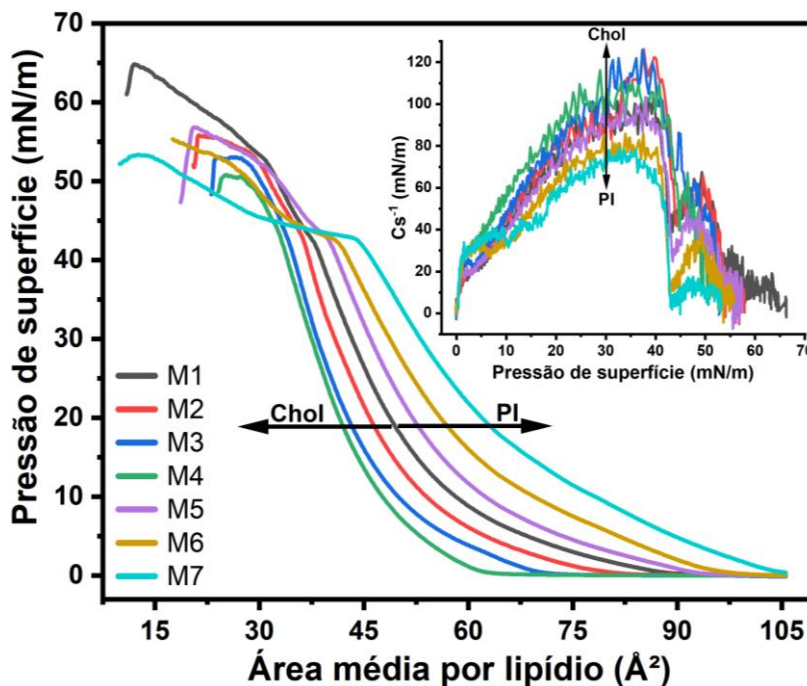


Figura 28 - Isothermas π -A dos modelos de membrana em PBS pH 7,4 com temperatura em 22 °C. A figura inserida mostra os respectivos módulos de compressibilidade superficial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

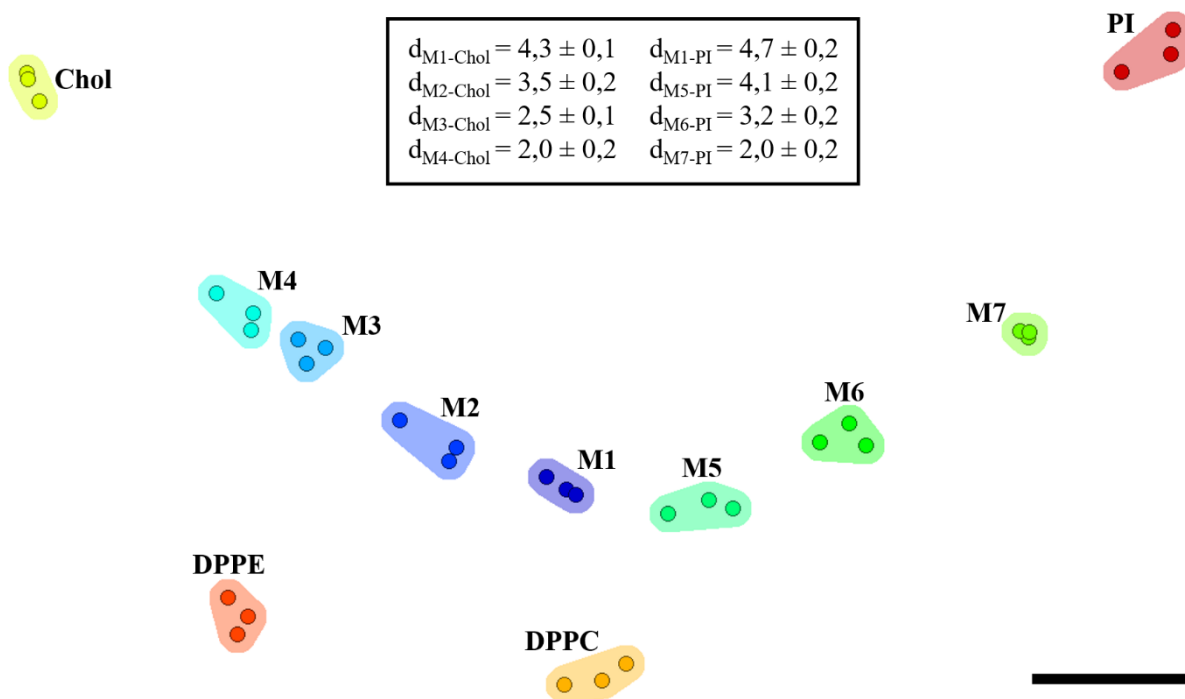


Figura 29 - IDMAP das isothermas dos modelos de membrana e seus componentes lipídicos. Cada círculo representa uma isoterma (região de 105 - 25 \AA^2), com o cluster indicando a triplicata. A barra de escala é referência para o cálculo da distância relativa entre os clusters, apresentada no quadro superior.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O efeito da concentração de Chol e PI nos modelos pode ser mais bem compreendido analisando a área (ΔA_{exc}) e energia livre de Gibbs (ΔG_{exc}) em excesso, mostradas na Figura 30.

Os modelos de membrana possuem áreas em excesso diferente de zero, indicativo de comportamento não ideal e miscibilidade dos componentes lipídicos.⁷⁴ Esse desvio da regra de aditividade ($\Delta A_{\text{exc}} \neq 0$) indica interação entre os lipídios das monocamadas mistas. Considerando o modelo M1 como referência, observa-se uma tendência para valores negativos da área em excesso ($\Delta A_{\text{exc}} < 0$) entre M2-M4, associado ao aumento da concentração de Chol. Para M5-M7 notam-se valores positivos da área em excesso ($\Delta A_{\text{exc}} > 0$) com o acréscimo de PI. O aumento da fração de Chol induz áreas moleculares menores que as esperadas para monocamadas mistas ideais ($A_{\text{exp}} < A_{\text{ideal}}$). Além disso, esse efeito é mais pronunciado com o aumento da pressão de superfície, sugerindo que o Chol afeta em maior intensidade quando os lipídios ocupam menores áreas e estão mais próximos. Isso pode ser atribuído ao mecanismo de interação entre o Chol e as demais moléculas lipídicas e/ou menores dimensões do Chol. Em contraste, o acréscimo de PI induz monocamadas mistas mais expandidas do que esperadas idealmente ($A_{\text{exp}} > A_{\text{ideal}}$), principalmente em baixas pressões superficiais. Esse comportamento deve estar associado ao maior volume ocupado pelas moléculas de PI e/ou mecanismo de interação com os demais lipídios, predominante em grandes áreas por molécula.

A energia livre de Gibbs em excesso fornece informações sobre as interações na monocamada mista comparadas aos componentes puros.⁷⁴ Nota-se uma redução de ΔG_{exc} entre M1-M4, com valores negativos principalmente para altas pressões de superfície. Isso indica que na faixa de concentração estudada, o acréscimo de colesterol induz interações favoráveis entre os componentes das monocamadas mistas. A mistura dos lipídios é termodinamicamente mais favorável do que a separação entre os respectivos constituintes ($\Delta G_{\text{mistura}} < \Delta G_{\text{ideal}}$). Valores positivos de ΔG_{exc} são observados para M5-M7, principalmente para baixas pressões de superfície. Ou seja, o aumento de PI provoca interações desfavoráveis entre os componentes dos modelos de membrana. A mistura é energeticamente desfavorável em comparação com as interações entre os lipídios individuais ($\Delta G_{\text{mistura}} > \Delta G_{\text{ideal}}$).

Em síntese, o acréscimo de Chol (M2-M4) provocou aumento da densidade e rigidez do modelo de membrana, enquanto a adição de PI (M5-M7) induziu uma expansão e maior fluidez da monocamada. A análise da área e energia livre de Gibbs em excesso corroboram esses resultados, indicando interações favoráveis e desfavoráveis com o aumento de Chol e PI nos modelos, respectivamente. O efeito do Chol é conhecido como “*condensing effect*”, relacionado a alterações no empacotamento, ordenação das cadeias, e/ou orientação de moléculas fosfolipídicas.¹³⁵ Wydro e Hąc-Wydro⁷⁴ observaram esse efeito em monocamadas de DPPC, DPPE e DPPC:DPPE. Comportamento semelhante foi relatado por Kinoshita e Kato¹³⁶ para

PI:Chol. O efeito do PI é coerente com os estudos envolvendo monocamadas de DSPC:PI,¹¹⁵ DSPE:PI¹³⁷ e DPPC:PI,¹³⁸ atribuído a interações repulsivas e/ou separação de fases.

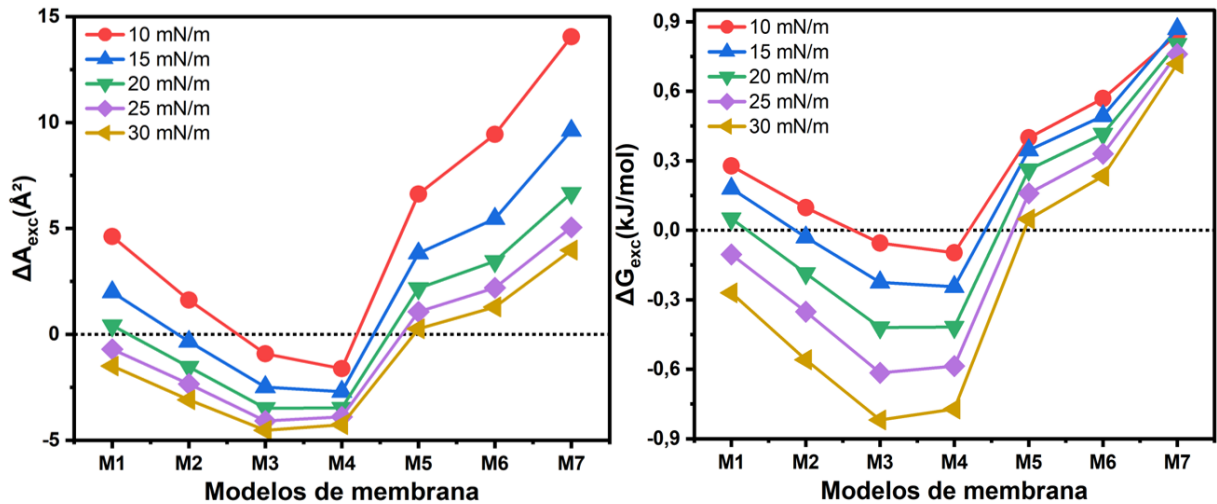


Figura 30 - Área (ΔA_{exc}) e energia livre de Gibbs (ΔG_{exc}) em excesso dos modelos de membrana para diferentes pressões de superfície.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir desses resultados foram escolhidos os modelos de membrana M1, M4 e M7 para investigar as interações com o CYP3A4, seu cofator NADPH, e substrato DOX. O modelo M1 mimetiza uma biomembrana do retículo endoplasmático saudável, enquanto M4 e M7 exibem alterações na composição lipídica, maior concentração de Chol e PI, esperadas em membranas de células cancerosas.²²⁻²³

3.5 Modelos de membrana com CYP3A4 e NADPH

A influência da metodologia para incorporação do CYP3A4 ao modelo M1 é mostrada na Figura 31. Em ambas abordagens, houve aumento da pressão superficial devido à adição do CYP3A4, o que sugere sua adsorção. Para o método de injeção na subfase, foi necessário um tempo (t_i) para iniciar a adsorção (alterar a π , $t_i \approx 70$ minutos), e demorou para estabilizar a pressão de superfície (indicativo de saturação). O CYP3A4 foi injetado em duas regiões na subfase, sua limitada dispersão e difusão devem estar associadas à diferença na cinética. Embora concentrações diferentes tenham sido comparadas na Figura 31 observou-se comportamento similar para o CYP3A4 injetado na subfase em concentrações inferiores. Por isso, foi escolhido o método de adição na interface, que permite menores tempos para adsorção e melhor distribuição do CYP3A4 na membrana. Foi estabelecido o tempo de 2 horas para interações com o CYP3A4.

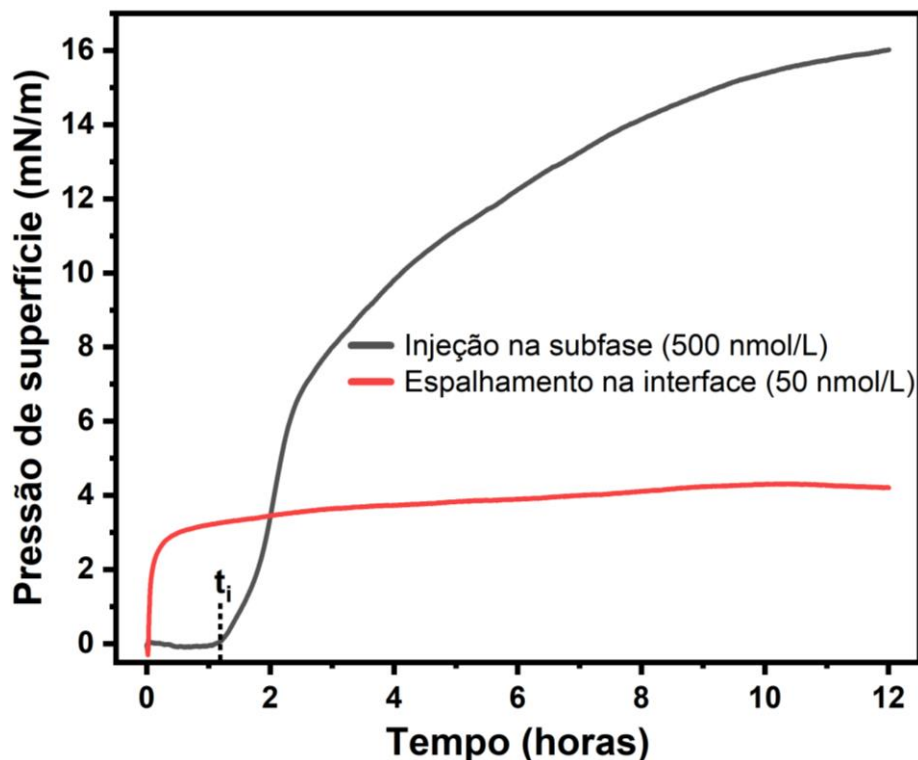


Figura 31 - Cinética de adsorção do CYP3A4 ao modelo de membrana M1, mediante sua adição na subfase e interface.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 32 mostra a isoterma π -A do CYP3A4 em PBS, e seu módulo de compressibilidade superficial. Não houve transição de fase e colapso aparente, observando-se essencialmente a fase líquido-expandida. A variação da pressão indica adsorção do CYP3A4 na interface ar-PBS, confirmando sua atividade superficial. O CYP3A4 é constituído por proteínas recombinantes em uma preparação microssomal, que reduz complicações associadas à purificação,¹³⁹ e pode contribuir para a atividade superficial. Microssomos são formados por partes do retículo endoplasmático semelhantes a vesículas,¹⁴⁰ e sua adição na interface ar-água pode ser examinada com base nas descrições para lipossomos. O espalhamento de lipossomos na interface ar-água resulta em dois processos simultâneos que competem entre si: (i) difusão irreversível de lipossomos intactos para subfase aquosa; e (ii) transformação irreversível de lipossomos na interface ar-água, que sofrem desintegração para formar uma camada insolúvel na interface com agregados de várias formas e dimensões.¹⁴¹⁻¹⁴² Girard-Egrot *et al.*¹⁴³ investigaram a formação de um filme interfacial de lipossomos contendo fluido proteico (*ascitic fluid*). Os autores verificaram a presença de proteínas na interface, indicando a capacidade dos lipossomos transportarem eficientemente material proteico para a interface ar-água. Também destacaram a possibilidade de proteínas não inclusas aos lipossomos adsorverem na interface. Assim, a adsorção do CYP3A4 na interface deve estar associada a uma nova estruturação de

seus componentes, incluindo o conteúdo proteico dos microsossomos. Espera-se que essas vesículas contribuam para manutenção da integridade das proteínas.

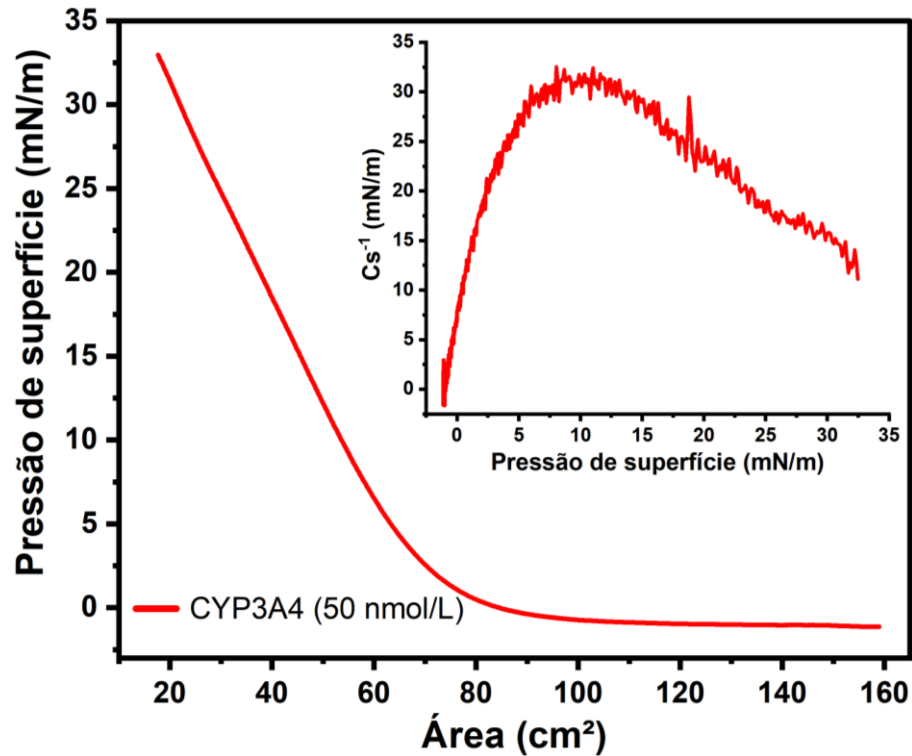


Figura 32 - Isoterma π -A e o módulo de compressibilidade superficial do CYP3A4 em PBS pH 7,4 com temperatura em 22 °C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi investigada a adição do CYP3A4 ao modelo M1, cujos resultados estão na Figura 33. Para pressão superficial de 30 mN/m, houve expansão da área de 11,9 Å², 24,2 Å² e 40,0 Å² devido à adição de 50 nmol/L, 100 nmol/L, e 250 nmol/L de CYP3A4, respectivamente. O módulo de compressibilidade superficial reduziu em 47,8 mN/m, 65,0 mN/m e 62,6 mN/m na pressão de 30 mN/m. Apesar de não ser possível determinar a quantidade exata do CYP3A4 incorporado ao modelo M1, as alterações na monocamada foram intensificadas com aumento da concentração do CYP3A4, sugerindo que maior quantidade seja adsorvida. Para altas pressões de superfície ($\pi \approx 48$ mN/m), as isotermas do sistema M1+CYP3A4 coincidem com a do modelo M1, indicando a expulsão do CYP3A4 da interface, que pode permanecer na subsuperfície próxima aos lipídios. Definiu-se, a partir desses resultados, a concentração de 50 nmol/L de CYP3A4 como otimizada para os experimentos subsequentes. Inclusive para os estudos dos lipídios (Chol, DPPC, DPPE e PI) com o CYP3A4 na seção 3.2.

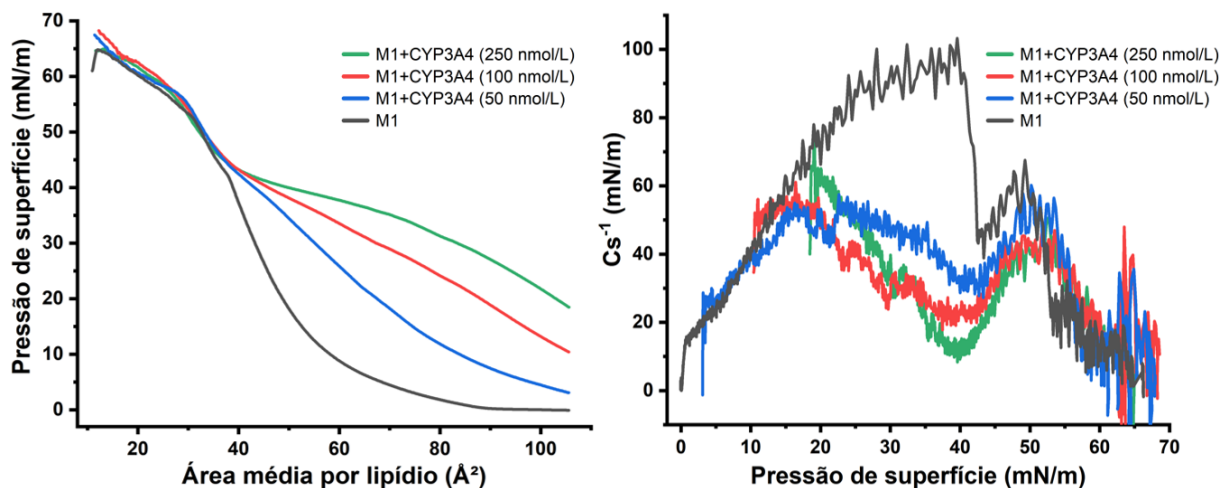


Figura 33 - Isothermas π -A do modelo M1 em PBS pH 7,4 a 22 °C com diferentes concentrações do CYP3A4, e seus respectivos módulos de compressibilidade superficial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 34 mostra a incorporação do CYP3A4 nos diferentes modelos de membrana. Sua adição provocou expansão da área de 25,5 e 11,9 Å² ao modelo M1, de 36,1 e 11,5 Å² ao M4, e de 18,4 e 5,4 Å² ao M7, nas pressões de 10 e 30 mN/m, respectivamente. Os módulos de compressibilidade diminuíram em 47,8 mN/m para o M1, 78,4 mN/m para o M4, e 34,4 mN/m para o M7, na pressão de 30 mN/m. Maiores alterações ocorreram para M4, enquanto M7 foi o menos afetado pelo CYP3A4. Isso pode estar associado ao caráter mais condensado de M4, comparado a M1 e M7, e à maior perturbação na monocamada para incorporação do CYP3A4. O que é consistente com o menor efeito em M7, cuja monocamada é menos condensada, e o CYP3A4 pode acomodar-se com maior facilidade. Outra possível interpretação é que o Chol contribui para incorporação do CYP3A4, enquanto o PI dificulta. A investigação da interação desses lipídios com o CYP3A4 na seção 3.2 mostrou considerável efeito do CYP3A4 na monocamada de PI, enquanto o Chol não apresentou afinidade marcante. Embora tenha sido utilizado um lote diferente de CYP3A4, e alterações no produto podem ocorrer, espera-se que o PI não minimize a incorporação do CYP3A4. De fato, a carga negativa do PI pode contribuir para adsorção do CYP3A4, como indicado no trabalho de Navrátilová *et al.*¹⁴ Portanto, interações específicas envolvendo o CYP3A4 com o colesterol ou fosfatidilinositol não parecem ser responsáveis pelas alterações distintas em M4 e M7.

As quantidades de Chol e PI podem não ser suficientes para dominarem os efeitos nos modelos, ou interações entre os componentes lipídicos, indicadas pelo desvio na miscibilidade ideal, podem modificar o comportamento da mistura. Por exemplo, pode haver uma menor contribuição da carga negativa do PI devido às interações com os lipídios do modelo M7. Em todo caso, a adsorção do CYP3A4 variou com a composição do modelo de membrana, sendo

que o aumento da concentração de Chol parece favorecer diferentemente da fração de PI. Essa contribuição do conteúdo de Chol é coerente com o trabalho de Navrátilová *et al.*,¹⁴⁴ que analisaram a incorporação do Citocromo P450 3A4 em bicamadas de DOPC contendo diferentes quantidades de Chol (0, 3, 6, 20, 50%) por simulações de dinâmica molecular. A bicamada de DOPC tornou-se mais ordenada e espessa com o aumento de Chol, afetando a localização e orientação do Citocromo P450 3A4. Com o aumento de Chol, o citocromo arranjou-se mais profundamente ($\approx 0,4$ nm) e inclinado em direção à membrana. Para altas pressões de superfície, as isotermas dos sistemas M4+CYP3A4 e M7+CYP3A4 cruzam com as dos modelos de membrana puros, sugerindo a remoção do CYP3A4 e de moléculas lipídicas da interface, estabelecendo um novo arranjo molecular.

A adição do cofator NADPH desloca as isotermas para maiores áreas e reduz o módulo de compressibilidade superficial, como pode-se observar na Figura 34. No entanto, essas alterações são pequenas, indicando uma limitada interação do NADPH com os lipídios. Esse comportamento é consistente com os estudos preliminares de cinética de adsorção, onde a injeção de NADPH não provocou variação significativa na pressão superficial com o tempo (indicativo de adsorção). Para o sistema M7+NADPH, houve declínio na isoterma para pressões superficiais acima de 32 mN/m, comparada ao modelo M7 puro. Ou seja, houve perda de moléculas lipídicas para a subfase e/ou rearranjo molecular. Isso pode ser associado à oxidação dos lipídios por espécies reativas na atmosfera e dissolução na subfase,¹⁴⁵ em especial das ligações insaturadas do PI. O acréscimo de NADPH aos modelos de membrana contendo CYP3A4 não provocou alterações significativas, exceto em M4. Espera-se que o efeito do NADPH nesses sistemas seja mínimo, devido a suas dimensões comparadas ao CYP3A4, e limitada interação com as monocamadas lipídicas. O desvio apresentado pelo modelo M4 pode estar relacionado a variações nos parâmetros experimentais, atribuídas à difícil reprodutibilidade.

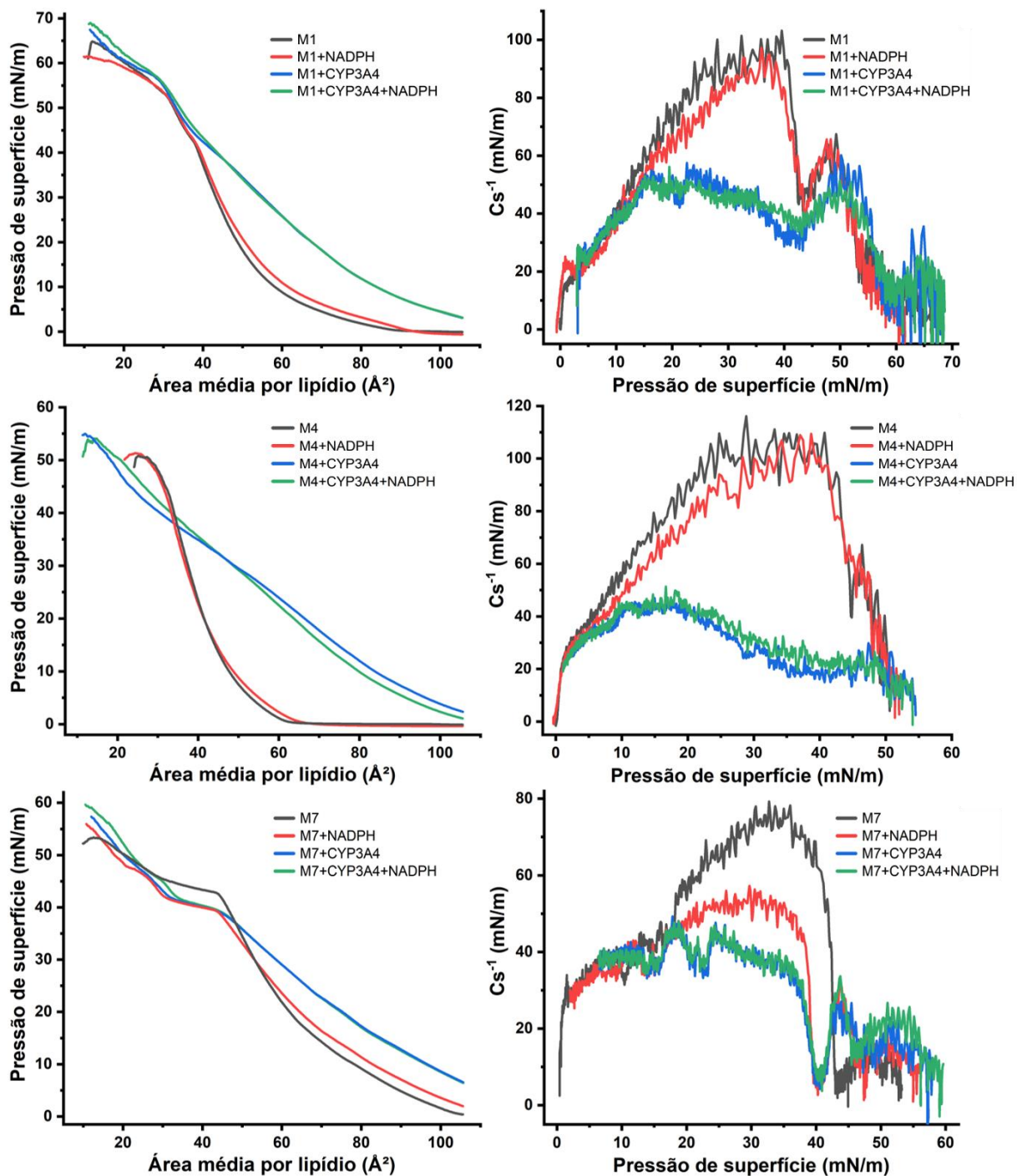


Figura 34 - Isothermas π -A e módulos de compressibilidade superficial dos modelos de membrana com e sem CYP3A4 e/ou NADPH em PBS pH 7,4 a 22 °C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O IDMAP na Figura 35 evidencia o impacto do CYP3A4 e NADPH nos modelos de membrana. Nota-se maior distância para os respectivos modelos com e sem CYP3A4, indicativo de elevada dissimilaridade, ou seja, a adição do CYP3A4 altera consideravelmente as monocamadas. Em contraste, pequena separação é provocada pelo NADPH, e os clusters M1, M4 e M7 contendo ou não NADPH estão próximos (são mais similares). O modelo M4 apresenta a maior distância relativa na presença do CYP3A4, enquanto M7 a menor. Esses

resultados corroboram com análise das isotermas da Figura 34. Mencione-se que, diferentemente da avaliação em determinadas pressões de superfície (10 e 30 mN/m), o IDMAP considera toda a isoterma (região de 105 - 25 Å²) para projeção.

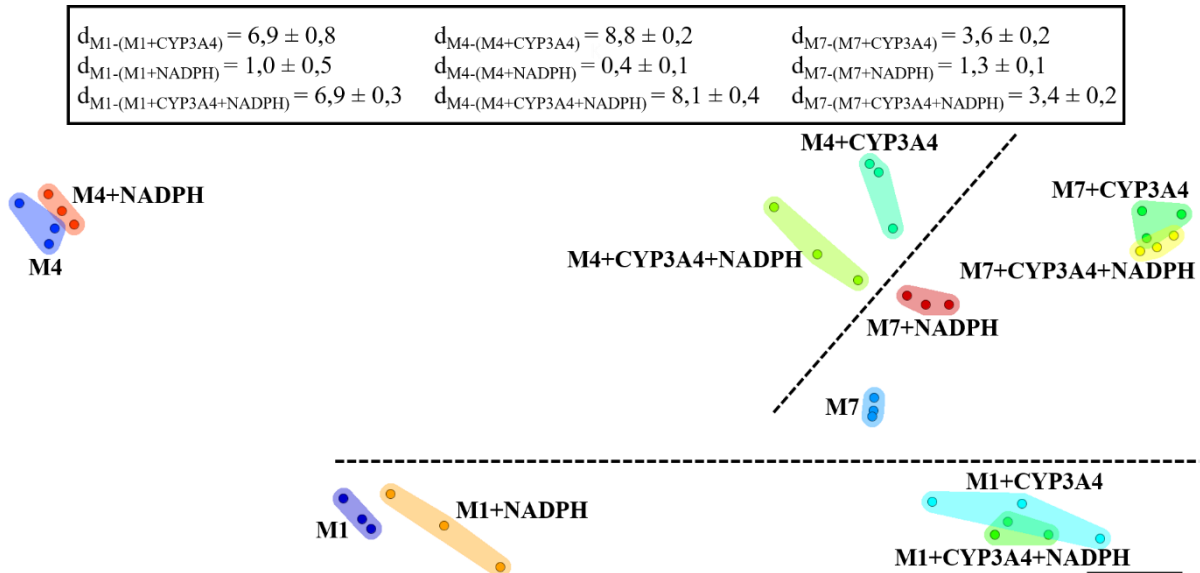


Figura 35 - IDMAP das isotermas dos modelos de membrana com e sem CYP3A4 e/ou NADPH. As distâncias relativas entre os clusters são apresentadas no quadro superior, com a barra de escala como referência. Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 36 exhibe os espectros PM-IRRAS dos modelos de membranas puros e com CYP3A4 e/ou NADPH. Também é mostrado o espectro do CYP3A4 na ausência de lipídios, onde se nota uma pronunciada banda na região da amida I, confirmando a presença do CYP3A4 na interface ar-PBS. Vibrações nessa região (1600 - 1700 cm⁻¹) são atribuídas a estiramentos C=O, acoplados com estiramentos C-N, deformações CCN e deformações angulares N-H de peptídeos.¹⁴⁶ Os modos de vibração na amida I dependem da estrutura secundária da proteína, a partir dos quais informações estruturais podem ser obtidas.⁷⁰ A Tabela 5 indica as estruturas secundárias baseadas nas posições das bandas amida I. O CYP3A4 possui uma larga banda entre 1600 - 1700 cm⁻¹, contendo um “ombro” para os maiores números de onda. Isso sugere a sobreposição de modos de vibração nessa região, ou seja, uma contribuição de diferentes estruturas secundárias. Como o CYP3A4 é uma mistura de citocromos P450 3A4, P450 oxidorreduzases e citocromos b5 recombinantes humanos, esse comportamento é esperado. O grupo prostético (Heme ou protoporfirina IX) também exhibe modos de vibração na região da amida I, como o estiramento C=C em torno de 1640 cm⁻¹. Porém, devido à sobreposição e fraca intensidade, suas bandas dificilmente são detectadas.¹⁴⁷

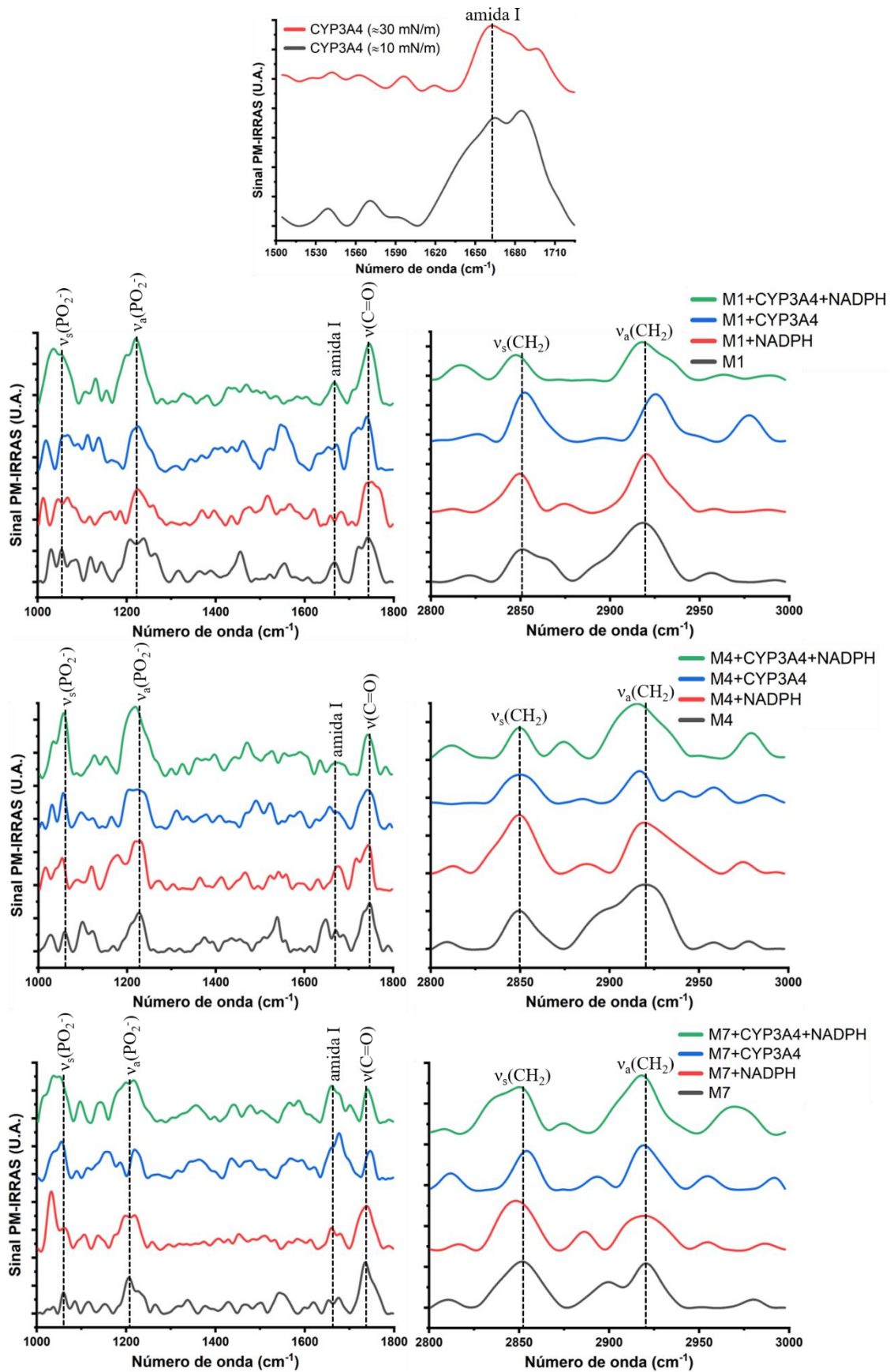


Figura 36 - Espectros PM-IRRAS dos modelos de membrana com e sem CYP3A4 e/ou NADPH em 30 mN/m. Na parte superior são mostrados os espectros do CYP3A4 em PBS pH 7,4 na ausência de lipídios em 10 e 30 mN/m.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5 - Atribuição das bandas na região da amida I com a estrutura secundária de proteínas.

Estrutura secundária	Posição da banda (cm⁻¹)
Hélice α	1650-1657
Folha β antiparalela	1612-1640; 1670-1696 (fraca)
Folha β paralela	1626-1640
Estruturas <i>turn</i> ou dobras	1655-1675; 1680-1696
Desordenada	1640-1651

Fonte: OLIVEIRA.⁷⁰

Para os modelos de membrana, notam-se as bandas características dos lipídios puros (Figura 25), os estiramentos simétricos e assimétricos do grupo fosfato (PO_2^-) em torno de 1060 e 1220 cm^{-1} , e os estiramentos do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$) em 1740 cm^{-1} . Também se observa a banda amida I sobreposta aos modos de vibração dos lipídios. Os modelos de membrana com o CYP3A4 incorporado exibiram bandas amida I distintas em intensidade e perfil. Combinada com a variação dos efeitos do CYP3A4 nas isotermas, essa observação sugere diferentes arranjos e/ou quantidades de CYP3A4 nos modelos de membrana. Santana e Caseli¹⁴⁸ estudaram a interação do peptídeo Vancomicina (VC) com monocamadas de DPPC e DPPE. Os autores observaram bandas em torno de 1690 cm^{-1} para o DPPE e 1629 cm^{-1} para o DPPC, atribuídas à presença da VC na interface ar-água. A diferença entre as bandas amida I foi atribuída a mudanças na conformação da VC na monocamada de DPPC e DPPE.

Para região de 2800 - 3000 cm^{-1} , bandas associadas aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo CH_2 são observadas em torno de 2850 e 2920 cm^{-1} . A razão entre as intensidades dos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo metileno fornece informações sobre o ordenamento das cadeias alquílicas dos lipídios. Isso é possível pois o modo de vibração assimétrico é mais sensível à inclinação das cadeias (*tilt angle*).¹⁴⁸⁻¹⁴⁹ Portanto, um aumento na razão das intensidades ($\Delta I_R = I_{\text{v}_s\text{CH}_2}/I_{\text{v}_a\text{CH}_2}$) indica uma maior desordem nas cadeias dos lipídios associada à proporção de conformações *gauche/trans* dos grupos metilenos.^{118,148} A razão ΔI_R aumentou de 0,57 em M1, para 0,60 em M4 e 1,02 em M7. Isso indica um desordenamento das cadeias alquílicas dos lipídios nos modelos M4 e M7 comparados a M1. Embora o acréscimo de Chol em M4 induza uma monocamada mais condensada, a interação entre os lipídios parece provocar distorções nas cadeias apolares, reduzindo o empacotamento ordenado dos lipídios. A maior concentração de PI em M7, que possui uma distribuição de ácidos graxos em sua cadeia apolar, deve ser responsável pela maior desordem apresentada pelo modelo. Concluindo, a adição do CYP3A4 e NADPH altera as bandas dos modelos de membranas (pequenos deslocamentos, variações nas intensidades e perfis), sugerindo interação

entre esses componentes, como esperado pelas alterações nas monocamadas (Figura 34). Ressalta-se que devido às sobreposições e interações, as atribuições das bandas nos sistemas mistos, em especial dos modelos de membrana (misturas de Chol, DPPC, DPPE e PI) com CYP3A4 e NADPH, não são triviais. Além disso, monocamadas mistas inhomogêneas devem ser formadas, dificultando a reprodutibilidade e formação de padrões nos espectros.

3.6 Modelos de membrana com DOX

A Figura 37 mostra a cinética de adsorção da DOX ao modelo M1. A DOX foi injetada na subfase, e o aumento da pressão superficial sugere sua adsorção. Para os 20 minutos iniciais de interação, a pressão aumentou consideravelmente, seguido de um acréscimo aproximadamente linear da pressão com o tempo. Para maior estabilização da monocamada, definiu-se 60 minutos para interações com a DOX.

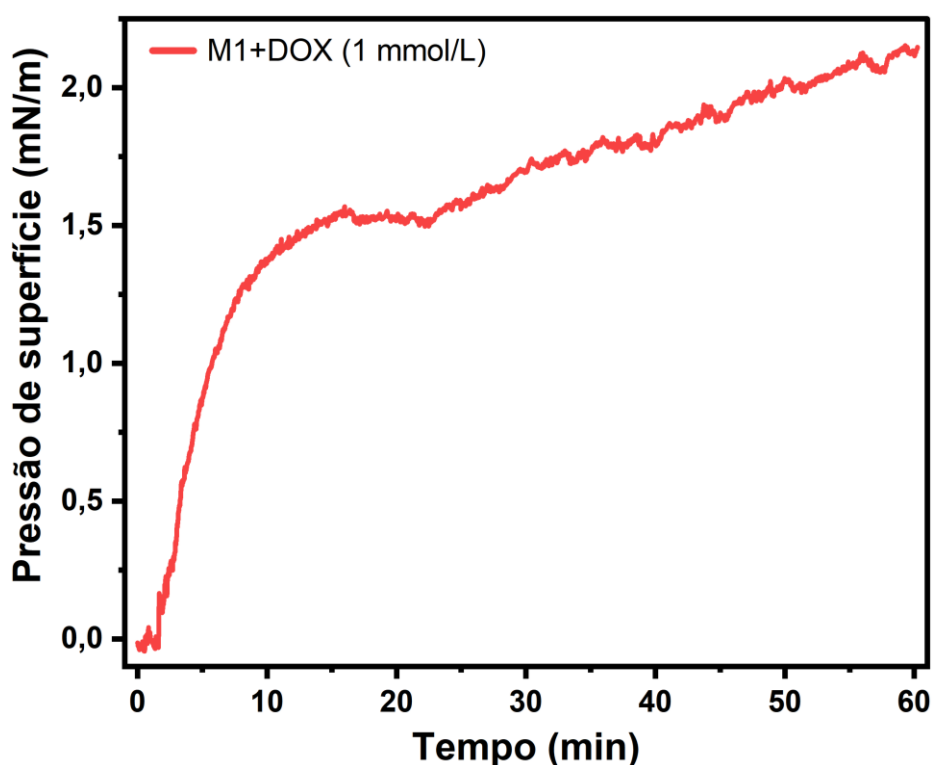


Figura 37 - Cinética de adsorção da DOX ao modelo de membrana M1 em PBS pH 7,4 a 22 °C.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi investigada a adição de diferentes concentrações de DOX ao modelo de membrana M1, como mostra a Figura 38. As monocamadas exibiram uma expansão da área molecular e redução do módulo de compressibilidade superficial, conforme a concentração da DOX. Para 0,1 mmol/L as alterações foram mínimas, porém com o aumento da quantidade de DOX

maiores variações ocorreram. Esse efeito parece saturar para concentrações superiores a 1 mmol/L. Por isso, foi definida a concentração de 1 mmol/L nos estudos envolvendo a DOX, inclusive para os lipídios Chol, DPPC, DPPE e PI (seção 3.3). A Figura 38 mostra também os modelos M4 e M7 contendo ou não DOX, com as áreas e módulos de compressibilidade em 10 e 30 mN/m indicados na Tabela 6. A DOX provocou uma expansão da área molecular de 21,1 Å² e 12,9 Å² ao modelo M1, 21,6 Å² e 12,8 Å² ao M4, e 13,3 Å² e 1,4 Å² ao M7, nas pressões superficiais de 10 e 30 mN/m, respectivamente. Os módulos de compressibilidade reduziram em 18,2 mN/m para o M1, 26,6 mN/m para o M4, e 26,2 mN/m para o M7, na pressão de 30 mN/m. Para altas pressões superficiais ($\pi > 35$ mN/m), a isoterma do sistema M7+DOX intercepta a do modelo M7 puro, indicando rearranjo na interface por interações DOX-lipídios. Esses resultados revelam que a DOX induz um maior caráter líquido nas monocamadas, isto é, maiores áreas e menor Cs^{-1} . Essas alterações foram mais pronunciadas em M4, que exibiu maior redução no módulo de compressibilidade, e mínimas para M7, análogo à interação dos modelos de membrana com o CYP3A4. Isso pode ser atribuído ao maior caráter condensado de M4, cuja interação com DOX provoca maior perturbação na monocamada. Para uma monocamada menos condensada (M7), a DOX possui maior facilidade de acomodação, alterando menos o sistema.

Tabela 6 - Área média por lipídio e módulo de compressibilidade superficial dos modelos M1, M4 e M7 contendo ou não DOX, nas pressões de 10 e 30 mN/m.

Sistema	$A_{\pi=10}(\text{Å}^2)$	$A_{\pi=30}(\text{Å}^2)$	$Cs_{\pi=10}^{-1}(\text{mN/m})$	$Cs_{\pi=30}^{-1}(\text{mN/m})$
M1	58,2 ± 0,4	43,3 ± 0,4	41,3 ± 1,6	94,2 ± 1,8
M1+DOX	79,3 ± 1,1	56,2 ± 0,7	35,0 ± 2,6	76,0 ± 4,9
M4	47,7 ± 0,7	37,5 ± 0,5	56,2 ± 4,0	103,0 ± 11,5
M4+DOX	69,3 ± 1,6	50,3 ± 1,7	40,8 ± 0,6	76,4 ± 6,3
M7	78,2 ± 0,2	53,1 ± 0,2	34,6 ± 2,5	71,8 ± 3,7
M7+DOX	91,5 ± 1,0	54,5 ± 1,3	37,3 ± 2,5	45,6 ± 3,9

Fonte: Elaborada pelo autor.

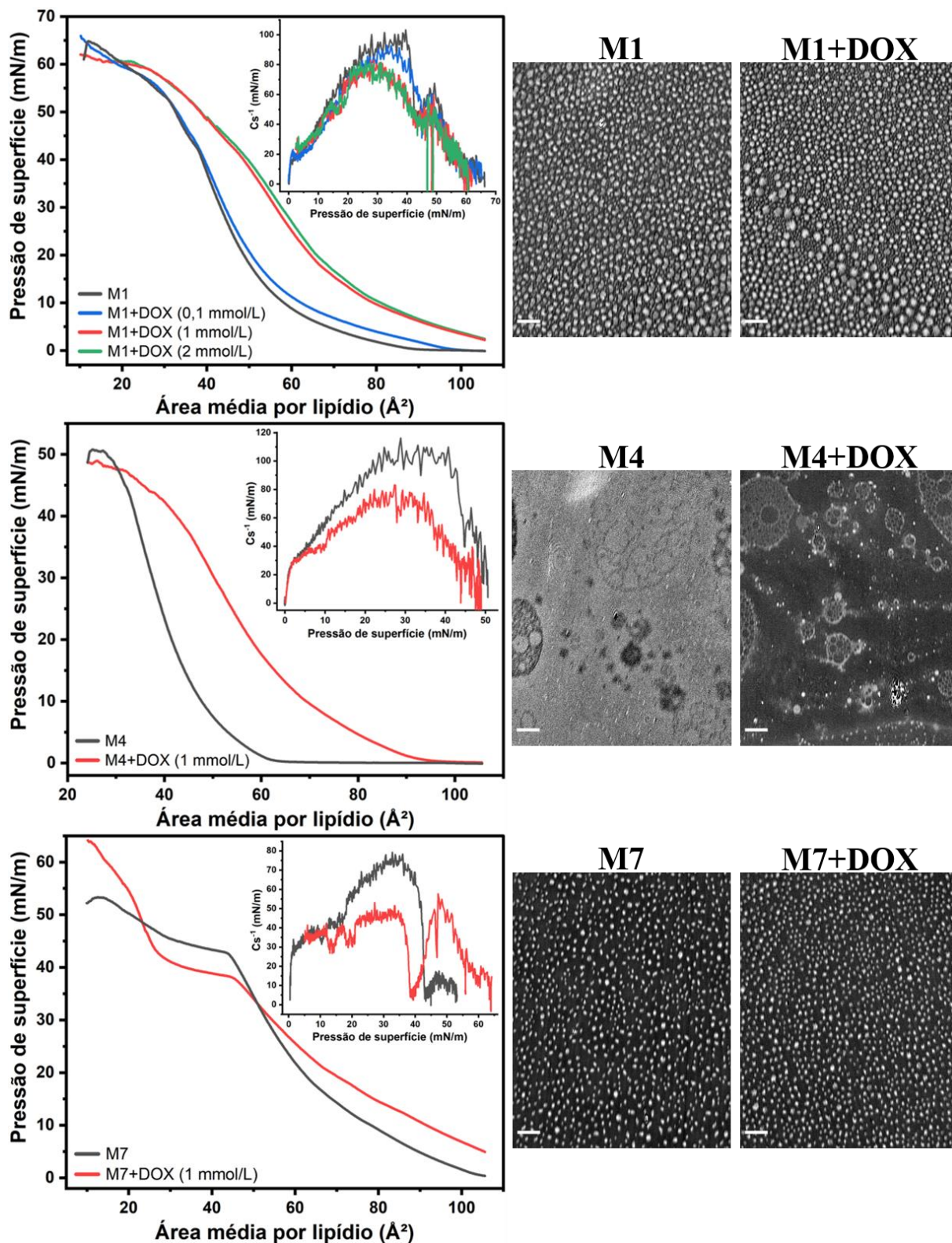


Figura 38 - Isothermas π -A dos modelos M1, M4 e M7 contendo ou não DOX em PBS pH 7,4 a 22 °C. As figuras inseridas mostram os respectivos módulos de compressibilidade superficial. Ao lado, estão as imagens de BAM dos respectivos sistemas em 30 mN/m, com a barra de escala representando 50 μm .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Considerando a interação da DOX com os lipídios puros na seção 3.3, a pronunciada expansão da área molecular e redução do módulo de compressibilidade superficial do Chol é

consistente com os maiores efeitos da DOX em M4, que possui maior concentração de Chol (35%). O PI apresentou a maior expansão de área, atribuída às interações eletrostáticas entre a DOX carregada positivamente e o PI carregado negativamente, e interações hidrofóbicas. Estas são favorecidas pela cadeia apolar do PI, que possui uma distribuição de ácidos graxos. Porém, o aumento da concentração de PI no modelo M7 (35%) não intensificou os efeitos da DOX. A interação entre os lipídios que compõem M7, indicada pelo desvio na miscibilidade ideal (Figura 30), pode minimizar/dificultar as interações com a DOX. Outra possibilidade é que a quantidade de PI em M7 não é suficiente para que interações específicas com a DOX contribuam majoritariamente, sendo o estado de condensação da monocamada mais relevante para os efeitos. Em resumo, o menor efeito da DOX em M7 pode estar relacionado às interações entre os lipídios e/ou a quantidade de PI, e ao caráter menos condensado da monocamada.

Zaborowska *et al.*¹²⁵ estudaram a interação da DNR e IDA com monocamadas de DMPC:Chol (7:3, modelo de membrana saudável) e DMPC:Chol (3:7, modelo de membrana cancerosa). Os autores propuseram que o maior caráter líquido do modelo saudável torna a penetração das drogas relativamente mais fácil, e a lipofilicidade ou afinidade para interação com o colesterol (componente em menor quantidade) não assume papel principal. Heywang *et al.*¹⁵⁰ estudaram a adsorção de antraciclinas em monocamadas de POPC e POPC:DPPA (4:1). A presença do fosfolípido aniônico DPPA não intensificou a adsorção da Idarrubicina, que foi maior para monocamada contendo apenas o fosfolípido zwitteriônico POPC. Esse resultado foi atribuído a interação da Idarrubicina com a parte polar dos lipídios aniônicos, formando uma barreira que dificulta a penetração de outras moléculas na subfase, e reduz a quantidade de droga na interface. Um mecanismo similar pode ocorrer entre o PI e a DOX em M7. Os efeitos da DOX variaram conforme os mecanismos de interação e estado de condensação da monocamada, ou seja, com a composição lipídica. A análise das interações entre a DOX e os componentes lipídicos individualmente não permitiu descrever com exatidão o comportamento do modelo, pois as interações envolvendo a mistura lipídica modificam as propriedades da monocamada. Em outras palavras, há uma não linearidade entre as propriedades e a composição da monocamada (Figura 30), que dificulta analisar o comportamento da mistura.

As imagens de microscopia no ângulo de Brewster na Figura 38 revelam diferentes morfologias dos modelos de membrana. Em 30 mN/m, nota-se uma monocamada densa e pouco fragmentada para M4, enquanto para M1 e M7 observam-se pequenos domínios lipídicos. No modelo M7 esses fragmentos são menores e estão mais distantes entre si. Isso é consistente com as isotermas π -A, onde M4 ocupa menores áreas por molécula e M7 maiores áreas moleculares. A adição da DOX altera as morfologias dos modelos de membrana, exceto o de M7, onde

nenhuma mudança significativa é perceptível. Para M1 e M4, observam-se domínios menos regulares ou inhomogêneos, consistente com o maior caráter líquido da monocamada contendo DOX, que sugere um sistema mais desordenado. O modelo M4 apresentou as maiores alterações devidas à DOX, e observam-se aglomerados (brilhantes) que sugerem a intercalação da DOX na monocamada.

A Figura 39 mostra o IDMAP dos modelos M1, M4 e M7 contendo ou não DOX. A projeção evidencia que o modelo M4 sofre maior alteração devido à adição da DOX, indicado pela maior distância relativa entre os clusters M4 e M4+DOX. Em contraste, o cluster M7 está relativamente próximo ao M7+DOX, sugerindo maior similaridade, ou seja, que os efeitos da DOX em M7 são mínimos. Esse resultado é consistente com as discussões da Figura 38, e permite comparar os efeitos da DOX nos modelos de membrana considerando toda a extensão das isothermas ($105 - 25 \text{ \AA}^2$).

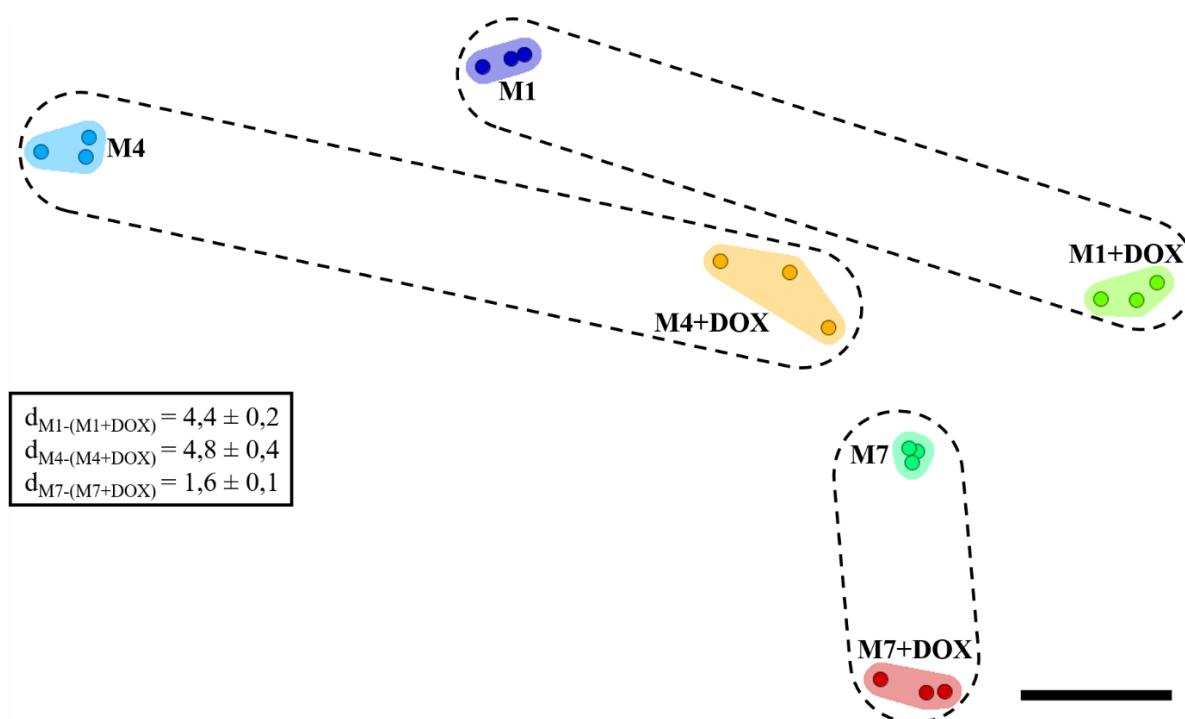


Figura 39 - IDMAP das isothermas dos modelos M1, M4 e M7 contendo ou não DOX. As distâncias entre os clusters são apresentadas no quadro, com a barra de escala como referência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os espectros PM-IRRAS dos modelos de membrana com e sem DOX em 30 mN/m são mostrados na Figura 40. Para região polar ($1000 - 1800 \text{ cm}^{-1}$), observam-se bandas associadas aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo fosfato (PO_2^-), em torno de 1053 e 1223 cm^{-1} para M1, 1060 e 1227 cm^{-1} para M4, e em 1060 e 1210 cm^{-1} para M7, respectivamente. Os modos de vibração do estiramento do grupo carbonila (C=O) também são observados em

1740 cm^{-1} para M1, 1748 cm^{-1} para M4, e 1736 cm^{-1} para M7. A adição da DOX altera os perfis dessas bandas, com reduções nas intensidades e sobreposições. Nota-se também o aparecimento de bandas em torno 1262, 1340, e 1580 cm^{-1} , atribuídas aos estiramentos C-O e C-H, deformações angulares CH_2 e C-OH, estiramentos do anel e deformações angulares C-H (aromático) da DOX.¹³²⁻¹³³ Essas alterações nos espectros, comparadas aos modelos na ausência de DOX, sugerem interações entre a DOX e a região polar dos lipídios. Para região de 2800 - 3000 cm^{-1} , bandas associadas aos estiramentos simétricos e assimétricos do metileno (CH_2) são observadas em 2851 e 2917 cm^{-1} para M1, 2851 e 2920 cm^{-1} para M4, e em 2851 e 2920 cm^{-1} para M7. São também observadas bandas menos intensas em 2955 cm^{-1} devidas aos estiramentos assimétricos do CH_3 . A DOX provoca pequenos deslocamentos e mudança nos perfis dessas bandas, sugerindo que ela afeta a organização das cadeias apolares dos lipídios.

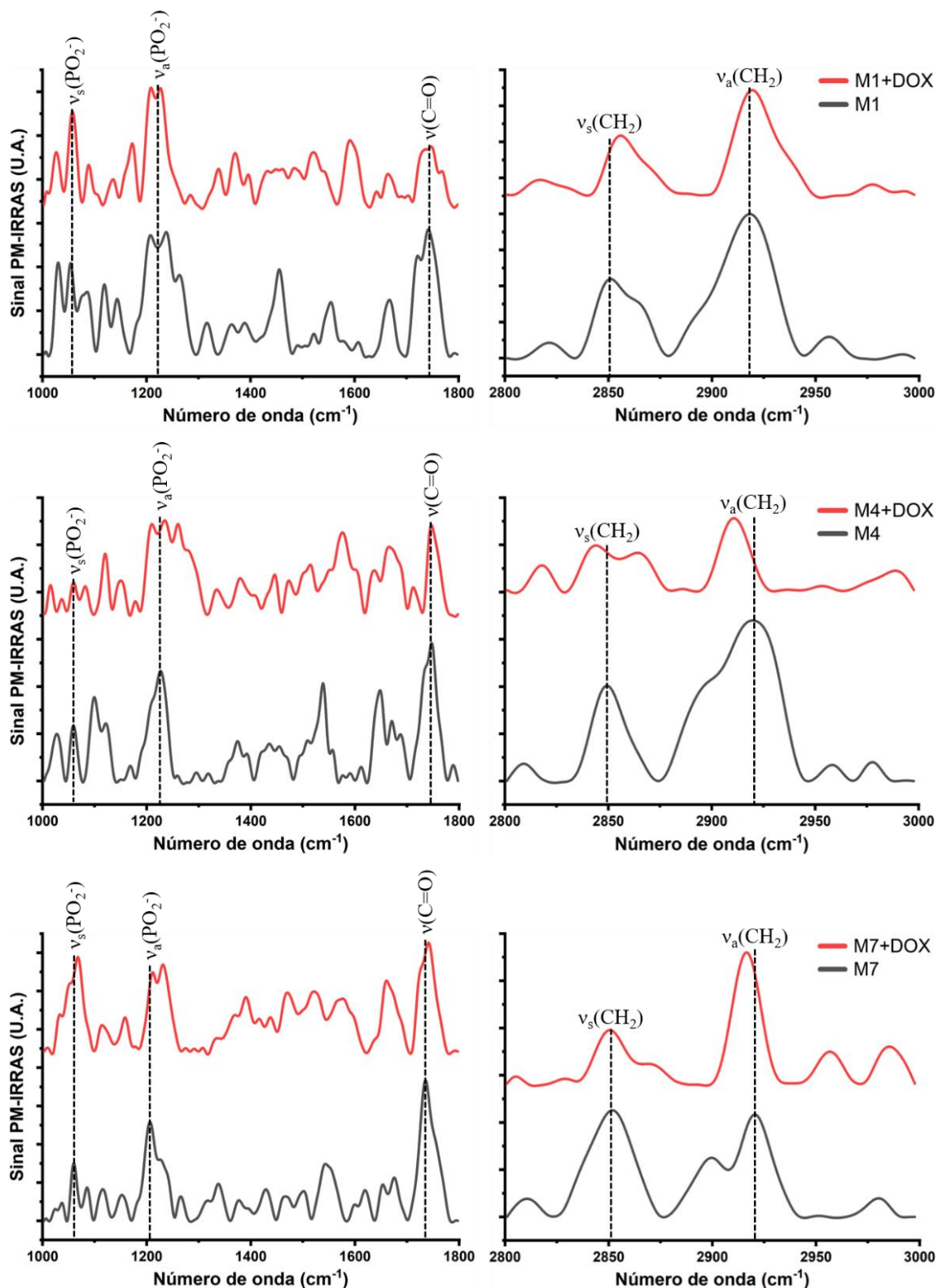


Figura 40 - Espectros PM-IRRAS dos modelos de membrana contendo ou não DOX em PBS pH 7,4 a 22 °C para pressão superficial de 30 mN/m.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O IDMAP dos espectros PM-IRRAS na Figura 41 indica que a DOX afeta mais a região polar do modelo M4, enquanto M7 é o menos afetado. Ou seja, M4 e M4+DOX apresentaram

a maior distância relativa, indicando menor similaridade entre os sistemas, com maior distinção entre os espectros na região de 1000 - 1800 cm^{-1} . Os clusters para M7 e M7+DOX estão mais próximos na projeção. Esses resultados são consistentes com as isotermas π -A, onde os efeitos da DOX foram mais pronunciados em M4, que possui monocamada mais condensada, e menores em M7, cuja monocamada é menos condensada. Além disso, indica que a maior quantidade de PI, lipídio aniônico que interage fortemente com a DOX, não contribuiu majoritariamente para os efeitos em M7. Eram esperadas maiores alterações na região polar de M7 por causa das interações eletrostáticas entre o PI e a DOX. Isso corrobora a hipótese de que as interações entre os lipídios do modelo M7 podem limitar as interações entre o PI e a DOX, e/ou que o estado de condensação da monocamada é mais relevante, dado o conteúdo de PI em M7.

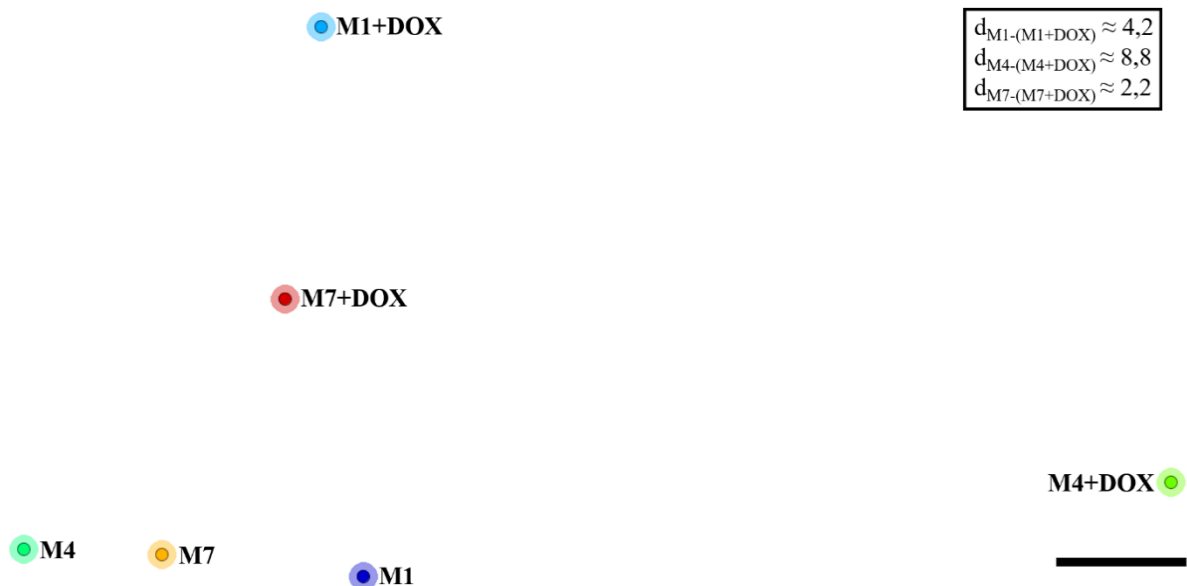


Figura 41 - IDMAP dos espectros PM-IRRAS (1000 - 1800 cm^{-1}) dos modelos de membrana contendo ou não DOX. As distâncias relativas são apresentadas no quadro, com a barra de escala como referência.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a região apolar do espectro PM-IRRAS, o IDMAP na Figura 42 indica uma maior separação entre M4 e M4+DOX, e menor entre M1 e M1+DOX. A DOX modificou mais a organização das cadeias apolares de M4, isto é, M4 e M4+DOX são menos similares e possuem os espectros em 2800 - 3000 cm^{-1} mais distintos. Os clusters M1 e M1+DOX possuem maior similaridade, e a DOX induz pequenas alterações na região apolar de M1. A maior mudança nos espectros de M4 devido à DOX são consistentes com as maiores alterações indicadas nas isotermas e Cs^{-1} (Figura 38). A grande modificação na região apolar de M4 é consistente com as imagens de BAM, que sugerem a intercalação da DOX na monocamada. Para o modelo M7,

apesar da pequena expansão de área devido à DOX (comparado aos demais modelos), seu módulo de compressibilidade superficial reduziu consideravelmente, o que é consistente com elevada alteração induzida pela DOX nas cadeias apolares de M7.

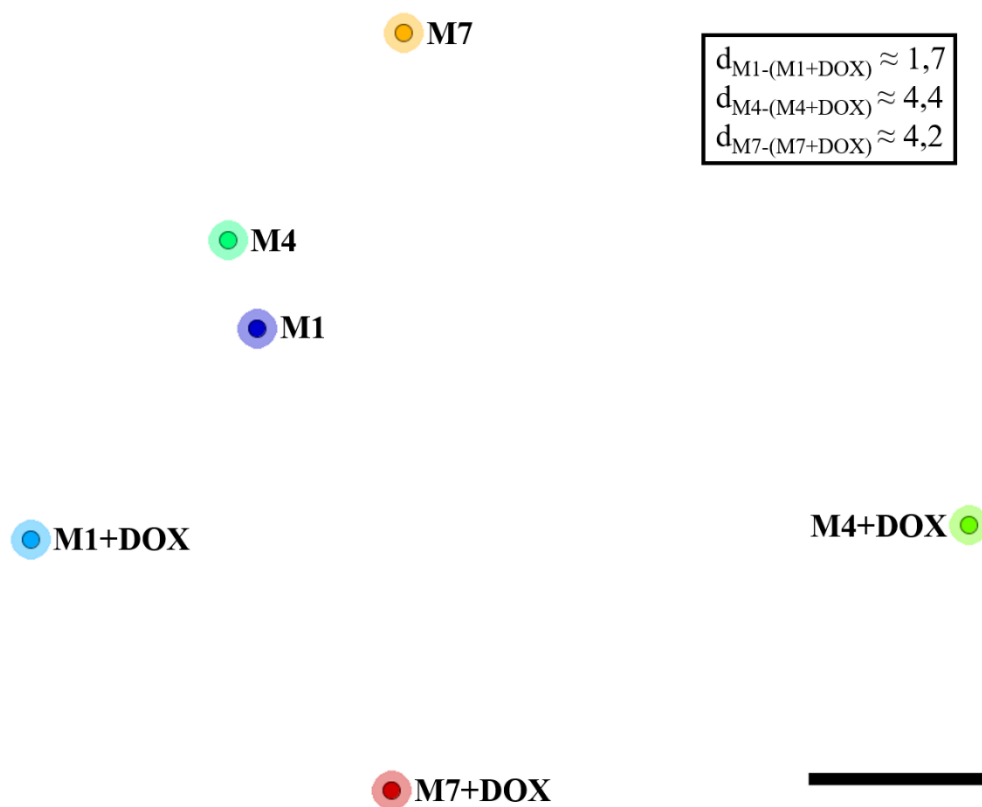


Figura 42 - IDMAP dos espectros PM-IRRAS ($2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$) dos modelos de membrana contendo ou não DOX. As distâncias relativas são apresentadas no quadro, com a barra de escala como referência.
Fonte: Elaborada pelo autor.

3.7 Modelos de membrana com CYP3A4, NADPH e DOX

Para investigar a influência do CYP3A4 na interação entre a DOX e os modelos de membrana, foram obtidas isotermas das misturas lipídicas (M1, M4 e M7) contendo CYP3A4, NADPH e DOX. A Figura 43 mostra que as monocamadas contendo CYP3A4 deslocaram-se para maiores áreas com a adição da DOX. Os valores das áreas e módulos de compressibilidade superficial em 10 e 30 mN/m estão na Tabela 7. Os módulos de compressibilidade não exibiram grandes variações, com exceção do modelo M7 em altas pressões ($\pi > 45 \text{ mN/m}$). Comportamento semelhante foi expresso pelo sistema M7+DOX, sugerindo a expulsão do CYP3A4 da monocamada. Essas alterações provocadas pela DOX nos modelos com CYP3A4 incorporado foram consideravelmente inferiores às observadas nas respectivas monocamadas sem CYP3A4 (Figura 38). Isso indica que a incorporação do CYP3A4 nos modelos M1, M4 e

M7, afetou a interação da DOX com os lipídios. Em outras palavras, a presença do CYP3A4 reduz os efeitos da DOX nos modelos de membrana. Resultado semelhante foi reportado por Materón *et al.*,¹³⁴ que estudaram a interação da DOX e Cisplatina (CDDP) com monocamadas de Langmuir formadas pela mistura de DPPC, DPPE, DPPS e Chol. As expansões na área molecular e reduções no módulo de compressibilidade superficial atribuídas aos quimioterápicos foram reduzidas quando a Glutathione S-transferase (GST) e seu cofator Glutathione (GSH) foram incorporadas ao modelo de membrana.

Ressalte-se que, embora a incorporação do CYP3A4 em M1, M4 e M7 torne as monocamadas menos condensadas, e conseqüentemente espera-se que os efeitos da DOX sejam menores, os mecanismos de interação também devem ser considerados. Por exemplo, destaca-se a pronunciada expansão do PI devido à DOX, mesmo a monocamada ocupando grandes áreas moleculares. A atenuação dos efeitos da DOX pode estar relacionada a mecanismos competitivos, isto é, CYP3A4 e DOX competem entre si para interagir com os lipídios na monocamada. Entretanto, a DOX é substrato do Citocromo P450 3A4,²⁸ e interações envolvendo o CYP3A4 e a DOX são esperadas, como a formação de complexos enzima-substrato e biotransformação na presença do cofator. Essas interações entre a DOX e o CYP3A4 podem resultar em menores alterações nas monocamadas, quando comparado as interações da DOX com os lipídios diretamente. Mesmo considerando que somente uma fração das moléculas de DOX interage com o CYP3A4, enquanto parte do conteúdo adicionado de DOX pode interagir com os lipídios ou permanecer na subfase.

Tabela 7 - Área média por lipídio e módulo de compressibilidade superficial de M1, M4 e M7 contendo CYP3A4, na presença ou ausência de NADPH e DOX, nas pressões de 10 e 30 mN/m.

Sistema	$A_{\pi=10}(\text{\AA}^2)$	$A_{\pi=30}(\text{\AA}^2)$	$Cs_{\pi=10}^{-1}(\text{mN/m})$	$Cs_{\pi=30}^{-1}(\text{mN/m})$
M1+CYP3A4	83,7 ± 2,9	55,2 ± 2,1	38,0 ± 3,7	46,4 ± 4,3
M1+CYP3A4+NADPH	83,1 ± 1,0	54,0 ± 0,6	38,0 ± 4,4	46,8 ± 6,9
M1+CYP3A4+DOX	95,6 ± 0,8	61,9 ± 1,4	39,9 ± 4,3	49,2 ± 4,4
M1+CYP3A4+NADPH+DOX	94,2 ± 1,5	60,9 ± 1,7	43,7 ± 5,1	40,8 ± 2,0
M4+CYP3A4	83,8 ± 1,0	49,0 ± 1,7	41,9 ± 0,4	24,7 ± 0,8
M4+CYP3A4+NADPH	79,8 ± 0,9	48,6 ± 2,2	45,1 ± 3,6	31,4 ± 1,8
M4+CYP3A4+DOX	92,6 ± 1,4	57,8 ± 0,2	43,3 ± 1,9	31,7 ± 0,9

(continua)

(continuação)

Tabela 7 - Área média por lipídio e módulo de compressibilidade superficial de M1, M4 e M7 contendo CYP3A4, na presença ou ausência de NADPH e DOX, nas pressões de 10 e 30 mN/m.

Sistema	$A_{\pi=10}(\text{\AA}^2)$	$A_{\pi=30}(\text{\AA}^2)$	$CS_{\pi=10}^{-1}(\text{mN/m})$	$CS_{\pi=30}^{-1}(\text{mN/m})$
M4+CYP3A4+NADPH+DOX	$94,5 \pm 0,9$	$58,9 \pm 0,7$	$43,5 \pm 1,6$	$36,9 \pm 4,4$
M7+CYP3A4	$96,6 \pm 1,1$	$58,5 \pm 0,7$	$39,5 \pm 1,2$	$37,3 \pm 1,2$
M7+CYP3A4+NADPH	$96,2 \pm 1,4$	$58,6 \pm 0,2$	$38,7 \pm 2,3$	$38,8 \pm 3,2$
M7+CYP3A4+DOX	$103,5 \pm 1,9$	$62,3 \pm 0,8$	$42,8 \pm 3,6$	$37,3 \pm 2,5$
M7+CYP3A4+NADPH+DOX	$103,1 \pm 0,3$	$61,8 \pm 0,9$	$47,0 \pm 0,9$	$42,5 \pm 5,2$

Fonte: Elaborada pelo autor.

O NADPH é necessário para reação enzimática do CYP3A4, que pode reduzir a DOX formando o radical semiquinona, capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) na presença de O_2 (Figura 12), além de outros metabólitos, como as deoxiagliconas.^{88,94} As isotermas na Figura 43 não indicam diferenças significativas entre os modelos de membrana+CYP3A4+DOX na presença e ausência de NADPH. Pressupondo a integridade do CYP3A4, indicada pela presença da banda amida I nos espectros PM-IRRAS, provavelmente não se formaram metabólitos com polaridades diferentes da DOX (como as agliconas), em abundância. Caso contrário, haveria alterações relacionadas à adsorção desses produtos nas monocamadas ou expulsão para a subfase.

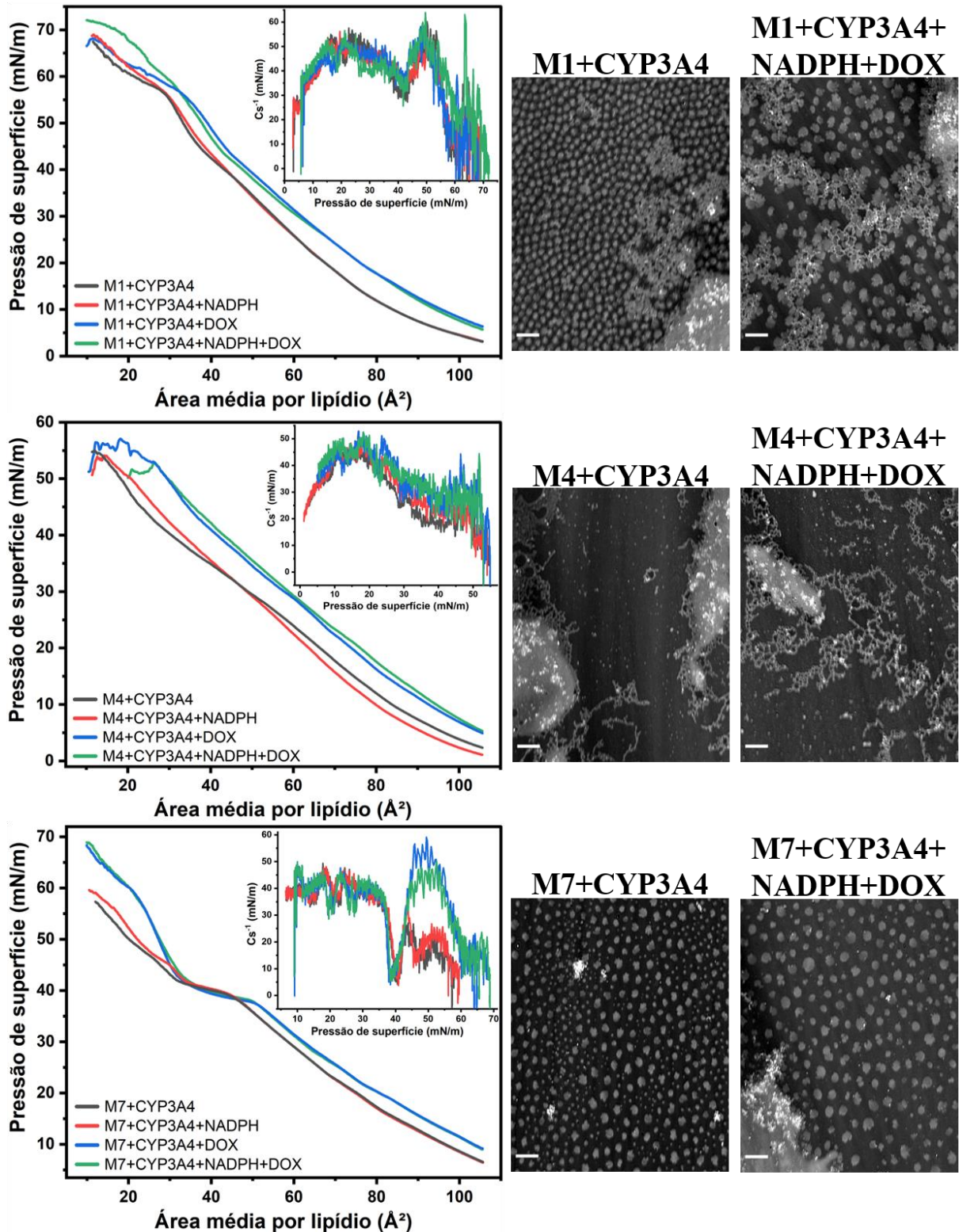


Figura 43 - Isotermas π -A dos modelos de membrana com CYP3A4, na presença ou ausência de NADPH e/ou DOX, em PBS pH 7,4 a 22 °C. As figuras inseridas mostram os módulos de compressibilidade superficial. Ao lado, estão as imagens de BAM dos sistemas correspondentes na pressão de 30 mN/m, com a barra de escala representando 50 μ m.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Espécies reativas de oxigênio podem interagir com moléculas lipídicas, alterando suas estruturas químicas. Esses radicais (por exemplo, $O_2^{\bullet-}$ ou $\bullet OH$) podem abstrair um átomo de

hidrogênio do carbono adjacente à dupla ligação da cadeia alifática de lipídios (L), e reagir com o oxigênio molecular formando o radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$). Esse radical pode remover átomos de H de moléculas lipídicas vizinhas, gerando hidroperóxidos (LOOH) em uma reação em cadeia. Devido ao caráter hidrofílico do grupo $-\text{OOH}$, a cadeia alifática do lipídio sofre deformação, aumentando sua área molecular, como ilustrado na Figura 44.¹⁵¹ Gellert *et al.*¹⁵¹ estudaram a oxidação dos fosfolipídios DMPC, DOPC, PLPC, e POPC por espécies reativas de oxigênio formadas na subfase de PBS com peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As isotermas π -A foram deslocadas para maiores áreas conforme o tempo de exposição ao H_2O_2 (0-45 min). Este efeito foi menos pronunciado para o DMPC, que contém apenas cadeias saturadas, sendo atribuído à ligação do oxigênio nas cadeias alquílicas, aumentando a hidroflicidade e área molecular.

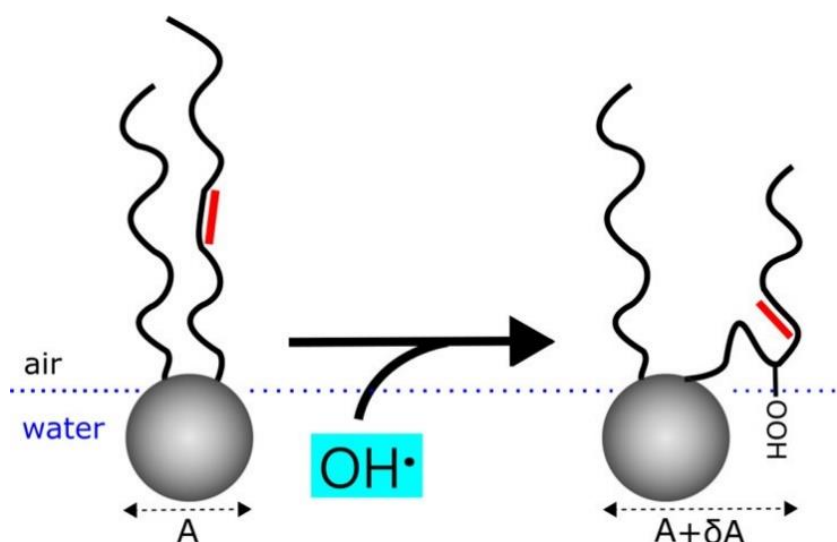


Figura 44 - Ilustração do aumento da área ocupada por moléculas de POPC, associado à oxidação das cadeias alifáticas por espécies reativas de oxigênio.

Fonte: GELLERT.¹⁵¹

A oxidação dos lipídios e o aumento da área molecular dos modelos de membrana por espécies reativas de oxigênio poderiam indicar de maneira indireta a biotransformação da DOX pelo CYP3A4+NADPH. Porém, não houve deslocamentos para maiores áreas dos modelos de membrana+CYP3A4+DOX na presença de NADPH (Figura 43). Como a composição dos modelos M1, M4 e M7 envolvem majoritariamente fosfolipídios saturados, as alterações associadas à oxidação das cadeias alifáticas devem ser limitadas. Isso não significa que ROS não sejam geradas pelo CYP3A4+NADPH+DOX, mas que a biotransformação da DOX não pode ser inferida a partir das isotermas π -A.

As imagens de microscopia no ângulo de Brewster na Figura 43 evidenciam a incorporação do CYP3A4 nos modelos de membrana. Notam-se estruturas ou agregados com

diferentes formas e dimensões nas monocamadas, que podem ser atribuídos à desintegração dos microsossomos que compõem o CYP3A4, e a reestruturação de seu conteúdo na interface. O maior caráter líquido das monocamadas devido ao CYP3A4, isto é, as maiores áreas e menores módulos de compressibilidade superficial, é consistente com o maior espaçamento entre os domínios lipídicos e menor uniformidade morfológica. Na comparação entre os modelos, o M7 exibiu a menor quantidade aparente de CYP3A4 incorporado, em concordância com as isotermas π -A. Para as misturas lipídicas contendo CYP3A4, NADPH e DOX, um maior espaçamento entre os domínios é observado devido ao acréscimo da DOX, pois os efeitos do NADPH são mínimos. Além disso, os domínios lipídicos exibem maiores dimensões, e as estruturas agregadas apresentam formas relativamente distintas (principalmente em M1). Isso pode ser devido à interação entre os componentes (CYP3A4, NADPH e DOX). Os agregados nas imagens dos modelos M1, M4 e M7 com CYP3A4 são consideravelmente diferentes das estruturas alongadas observadas nos lipídios contendo CYP3A4 (Figura 19). Essa diferença pode ser atribuída aos diferentes lotes do CYP3A4, dificultando a comparação dos efeitos do CYP3A4 nos lipídios (Chol, DPPC, DPPE e PI) e modelos de membrana.

Para comparação das isotermas dos modelos M1, M4 e M7 contendo ou não CYP3A4, NADPH e DOX, foi gerada a projeção IDMAP na Figura 45. Apesar do caráter emaranhado devido ao número de grupos projetados juntos, nota-se que as distâncias relativas aos respectivos modelos com e sem DOX são bem maiores do que para os modelos+CYP3A4 contendo ou não DOX. Em outras palavras, a DOX induziu maiores mudanças nos modelos de membrana sem CYP3A4. Quando o CYP3A4 está incorporado menores alterações devido à DOX são observadas nas isotermas. Comparando as distâncias relativas, pode-se estimar uma redução da ordem de 58% para M1 (4,0 \rightarrow 1,7), 55% para M4 (4,2 \rightarrow 1,9) e 50% para M7 (1,6 \rightarrow 0,8). Essa distinção na atenuação dos efeitos da DOX sugere que a interação entre o CYP3A4 e a DOX é afetada pela composição do modelo de membrana. Para M7+CYP3A4, a menor redução nas alterações associadas a DOX é observada, talvez pela menor incorporação do CYP3A4 na monocamada, como indicado nas imagens de BAM. A presença do cofator NADPH não provocou separações significativas entre os grupos, exceto para M4+CYP3A4. Esse resultado é coerente com as isotermas na Figura 43, com a diferença entre M4+CYP3A4 e M4+CYP3A4+NADPH atribuída a variações nos parâmetros experimentais e difícil reprodutibilidade. Devido à similaridade entre os modelos+CYP3A4+DOX contendo ou não NADPH, não foi possível inferir a biotransformação da DOX pelo CYP3A4. Em todo caso, a redução das alterações associadas a DOX nas monocamadas indica que o CYP3A4 pode influenciar sua interação com os modelos de membrana.

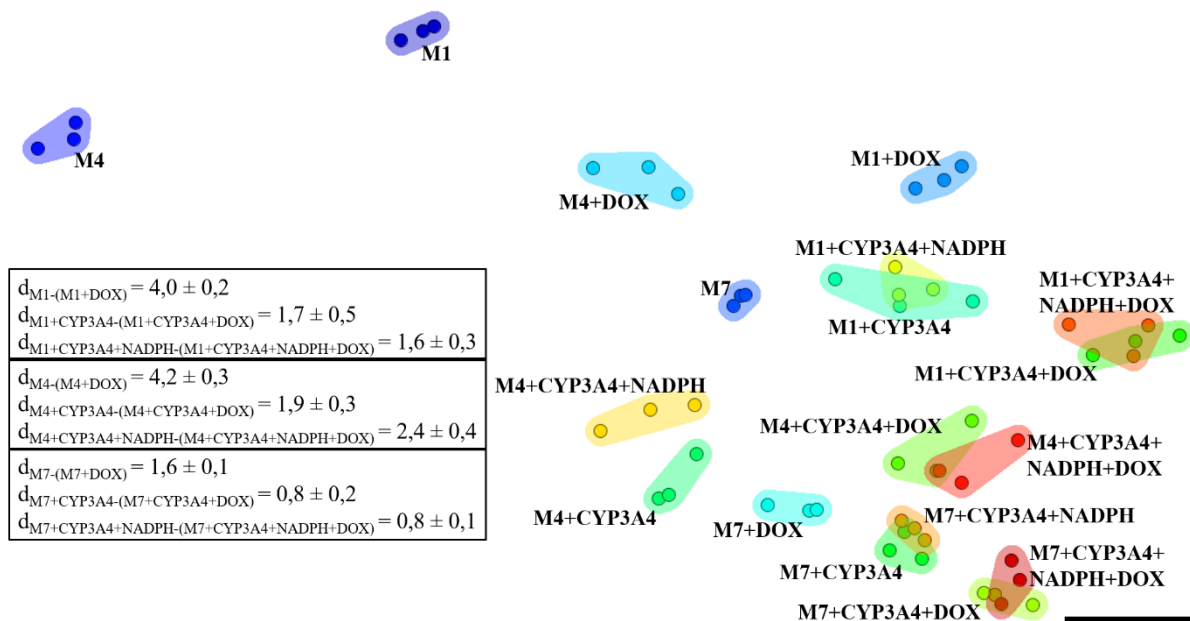


Figura 45 - IDMAP das isotermas dos modelos de membrana contendo ou não CYP3A4, NADPH e DOX. As distâncias relativas entre os clusters são apresentadas no quadro, com a barra de escala como referência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 46 mostra os espectros PM-IRRAS dos modelos de membrana contendo CYP3A4 na presença ou ausência de NADPH e DOX. Para região de $1000 - 1800 \text{ cm}^{-1}$, bandas associadas aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo fosfato (PO_2^-) são observadas em torno 1060 e 1220 cm^{-1} . As bandas em 1740 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos $\text{C}=\text{O}$. Há também bandas na região da amida I ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$), atribuídas à incorporação do CYP3A4 nos modelos. A adição da DOX e/ou NADPH induz alterações nessas bandas de absorção, modificando o perfil e a intensidade das mesmas. Os modos de vibração na região da amida I dependem do tipo de estrutura secundária,⁷⁰ além disso, os espectros PM-IRRAS são sensíveis às orientações e a concentrações dessas estruturas na interface.¹⁵² A mudança na banda amida I devido à DOX e/ou NADPH pode estar associada a interações dessas moléculas com as misturas lipídicas, afetando o arranjo molecular do CYP3A4 na interface. Como as alterações nas isotermas quando o CYP3A4 está incorporado nos modelos são pequenas, é provável que interações entre a DOX e/ou NADPH com o CYP3A4 estejam relacionadas às mudanças na amida I. Além disso, o NADPH e a DOX são cofator e substrato do CYP3A4, e interações entre esses compostos são esperadas. A formação de complexos do tipo enzima-substrato (CYP3A4-DOX) pode causar alterações na banda amida I, e pode ser o mecanismo responsável pela redução dos efeitos da DOX nos modelos de membrana contendo CYP3A4.

Em relação à biotransformação da DOX pelo CYP3A4+NADPH, não foi possível atribuir bandas a hidroperóxidos (LOOH) originários de radicais livres provenientes da

biotransformação. No trabalho de Aoki *et al.*,¹⁵³ verificaram que a técnica PM-IRRAS não foi sensível para detecção de hidroperóxidos gerados pela irradiação laser (530 nm) de monocamadas de DOPC contendo Eritrosina (fotossensibilizador). Os espectros PM-IRRAS também não apresentaram variações que pudessem ser relacionadas à formação de metabólitos, não sendo possível inferir a biotransformação. Para região de 2800 - 3000 cm^{-1} , bandas atribuídas aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo CH_2 são observadas em torno de 2850 e 2920 cm^{-1} . O acréscimo da DOX e/ou NADPH provoca alterações no perfil e intensidade dessas bandas, ou seja, a DOX e o NADPH afetam a organização das cadeias alifáticas dos lipídios mesmo com o CYP3A4 presente. Isso pode estar associado à fração da DOX e NADPH que interage com os lipídios ao invés do CYP3A4 e/ou por alterações no arranjo do CYP3A4 devido interações com a DOX e o NADPH, afetando as cadeias lipídicas. É importante enfatizar que os modelos+CYP3A4+NADPH+DOX formam monocamadas heterogêneas, como indicado nas imagens de microscopia no ângulo de Brewster, e a variação da composição ao longo do filme de Langmuir pode provocar alterações nos espectros PM-IRRAS, dificultando a comparação entre os sistemas. Por exemplo, é difícil determinar se as alterações nos espectros PM-IRRAS devido à DOX são menores para as monocamadas contendo CYP3A4 (Figura 46), do que sem o CYP3A4 (Figura 40).

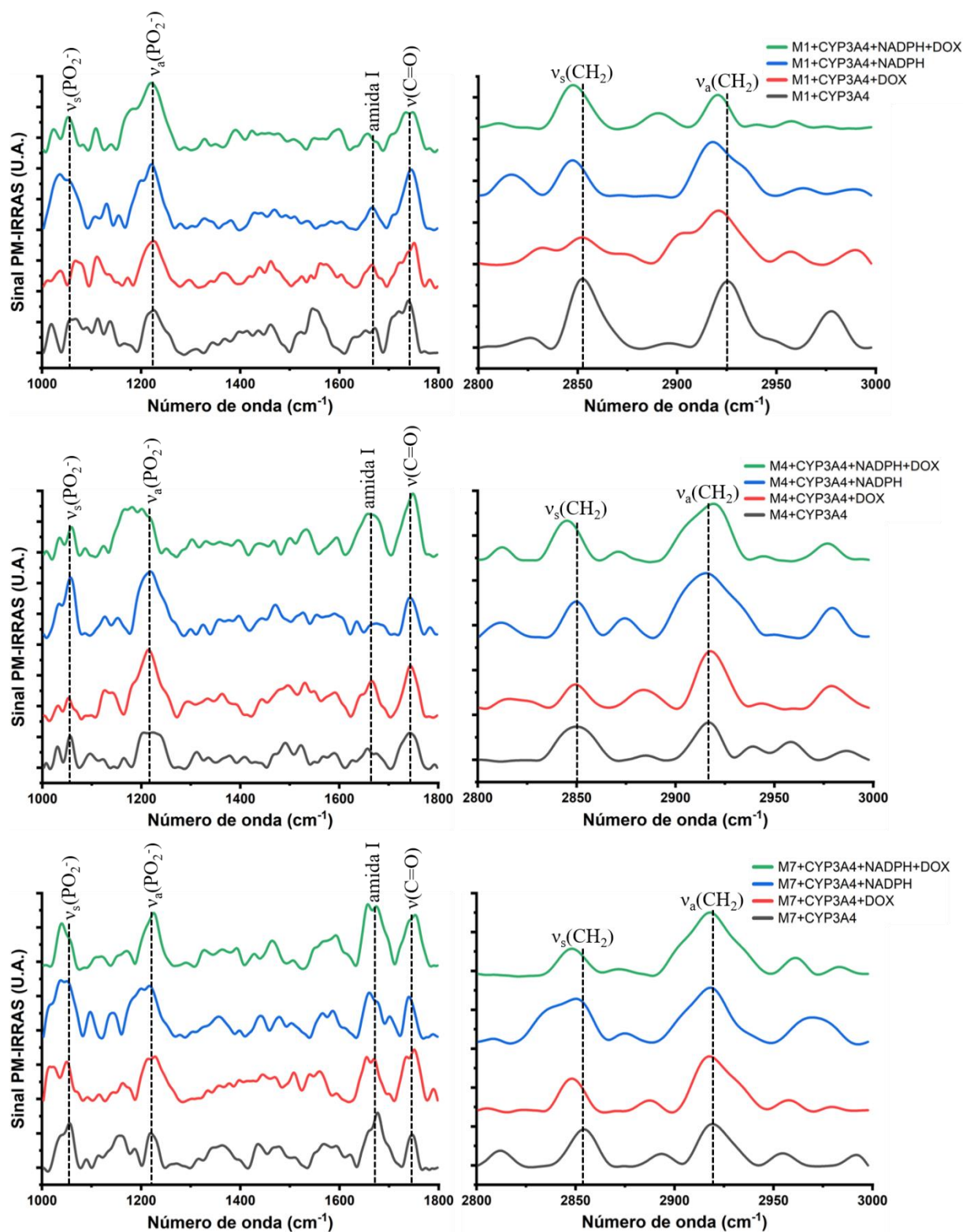


Figura 46 - Espectros PM-IRRAS dos modelos de membrana com CYP3A4, contendo ou não NADPH e/ou DOX, em PBS pH 7,4 a 22 °C, a uma pressão superficial de 30 mN/m.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para tentar evidenciar a formação do complexo enzima-substrato (CYP3A4-DOX), foram realizadas medidas de espectroscopia UV-Vis in situ com um espectrofotômetro portátil (*Ocean optics HR2000+*) conectado a uma fonte de luz e uma fibra óptica, acoplado na cuba

de Langmuir. Devido ao grupo prostético heme, o comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) dos Citocromos P450 varia conforme o estado de coordenação e oxidação-redução do ferro. Na sua forma livre (sem ligante), o CYP oxidado (Fe^{3+}) e reduzido (Fe^{2+}) absorve em torno de 415 - 418 nm e 407 - 409 nm, respectivamente. A ligação do substrato no sítio ativo pode deslocar essa banda (denominada de Soret) para 385 - 395 nm, designado de mudança espectral do tipo I. Algumas moléculas podem ligar-se diretamente no átomo de Fe ou via molécula de água axial, deslocando a banda Soret para 420 - 425 nm, nomeado de mudança espectral do tipo II.¹⁵⁴ No entanto, não se detectou sinal nessa região do espectro eletromagnético que pudesse fornecer informações sobre a atividade catalítica do CYP3A4. Uma possibilidade é que a quantidade de CYP3A4 é insuficiente para a sensibilidade do aparato experimental. Outra possibilidade é que a ligação de um substrato ao Citocromo P450 3A4 pode não induzir alterações na banda Soret.¹⁵⁵

Com as técnicas empregadas na análise das monocamadas de Langmuir, não foi possível mensurar a atividade do CYP3A4 incorporado nos modelos de membrana. Para confirmar sua integridade e capacidade catalítica, foi utilizada espectroscopia UV-Vis com um espectrofotômetro *NanoDrop One* (Thermo Scientific). O equipamento permite obter espectros na região de 190 - 850 nm, utilizando pequenos volumes de solução (1 - 2 μ L). A Figura 47 mostra os espectros do CYP3A4 (1 μ mol/L), DOX (1 mmol/L), e NADPH (3 mmol/L). Nota-se uma pequena banda em torno de 412 nm, que pode ser atribuída ao Citocromo P450 3A4 em sua forma livre e oxidada.¹⁵⁴ O CYP3A4 é composto por uma mistura que inclui o Citocromo P450 3A4, o que pode estar relacionado ao ruído de fundo no espectro de UV-Vis (flutuação da linha de base), dificultando a identificação da banda de interesse. O NADPH apresentou sua banda de absorção característica em 340 nm, associada a transições HOMO (*Highest occupied molecular orbital*) \rightarrow LUMO (*Lowest unoccupied molecular orbital*) da nicotinamida ($C_6H_6N_2O$).¹⁵⁶ A DOX exibiu banda centrada em 480 nm, atribuída às transições HOMO \rightarrow LUMO dos orbitais $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel hidroquinona.¹⁵⁷⁻¹⁵⁸ A atividade catalítica do CYP3A4 foi monitorada mediante a mistura das soluções de CYP3A4, DOX e NADPH (1:6:6, v/v), e obtenção de espectros de UV-Vis em função do tempo de interação (0, 15 e 30 minutos), mostrados na Figura 47. No início da reação (0 min), são observadas duas bandas em 340 e 480 nm, atribuídas ao NADPH e a DOX. Devido à mistura das soluções e diluição, não foi possível detectar sinal referente ao CYP3A4. Foram realizadas outras medidas contendo diferentes proporções entre CYP3A4, DOX e NADPH. Embora se possa observar sinal associado ao CYP3A4, a banda apresentou baixa intensidade e não foi possível verificar com clareza seu deslocamento. Com o aumento do tempo de interação (15 e 30 min), nota-se o desaparecimento

da banda em 340 nm. Isso indica o consumo do NADPH com a atividade catalítica do CYP3A4. A banda em 480 nm não sofreu alterações significativas que indicassem transformações na estrutura da DOX. No entanto, a redução da DOX pelo CYP3A4+NADPH envolvendo a formação do radical semiquinona e geração de espécies reativas de oxigênio na presença de O₂ pode ocorrer sem mudanças no espectro da DOX.

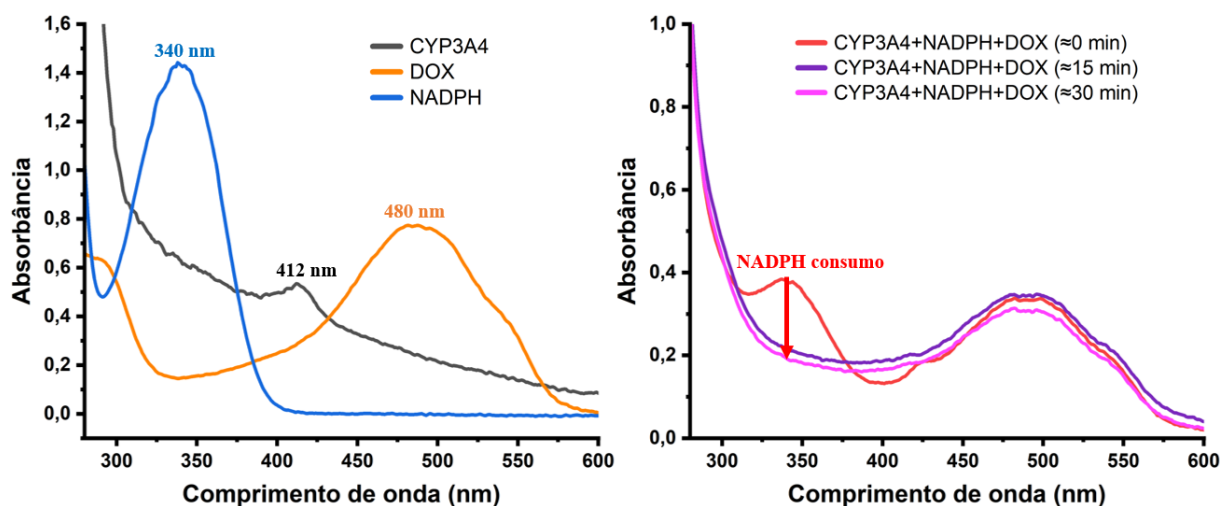


Figura 47 - Espectros de UV-Vis das soluções de CYP3A4 (1 $\mu\text{mol/L}$), DOX (1 mmol/L), e NADPH (3 mmol/L). Ao lado, são mostrados os espectros de UV-Vis da mistura dessas soluções (1:6:6, v/v) para diferentes tempos de interação (0, 15 e 30 minutos).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Kostrzewa-Nowak *et al.*¹⁵⁹ estudaram a redução da DOX pela P450 oxidoredutase (POR) e NADPH. Para baixas concentrações de NADPH (100 - 300 $\mu\text{mol/L}$), houve uma redução da intensidade da banda em 340 nm, atribuída à oxidação do NADPH catalisada pela POR. Porém, a banda associada à DOX (480 nm) não apresentou alterações. Essa condição experimental foi relacionada à ativação do ciclo redox envolvendo o consumo de NADPH, o que corrobora com as interpretações da Figura 47. Já para altas concentrações de NADPH (500 $\mu\text{mol/L}$ - 200 mmol/L), ambas as bandas em 340 e 480 nm sofreram reduções em função do tempo. Após 5 minutos de interação a banda em 480 nm deslocou-se para maiores comprimentos de onda. Para esses parâmetros, além do consumo do NADPH houve também a transformação da estrutura da DOX pela POR.

A espectroscopia UV-Vis em solução confirmou a integridade dos componentes e atividade do CYP3A4. Apesar das diferentes condições experimentais, espera-se que o CYP3A4 incorporado nas monocamadas mantenha sua capacidade catalítica. Os espectros PM-IRRAS sugerem a possibilidade de interações envolvendo o CYP3A4, NADPH e a DOX, como a formação de complexos enzima-substrato, que pode ser o mecanismo da redução dos efeitos

da DOX. A incorporação do CYP3A4 provocou expansões na área molecular e reduções no módulo de compressibilidade superficial conforme o modelo de membrana, M4 exibiu as maiores alterações, enquanto M7 as menores. Isso indica que a composição lipídica pode afetar a localização, estrutura e orientação do CYP3A4 na membrana, o que pode influenciar o acesso de substratos e sua eficiência catalítica.¹⁴ Os modelos M4 e M7 têm composições diferentes do M1 (modelo de membrana do retículo endoplasmático). São associados a membranas de células cancerosas, isto é, possuem maior conteúdo de Chol e PI, respectivamente. Isso mostra a relevância das alterações nas membranas de células cancerosas para a atividade do Citocromo P450 3A4. A redução dos efeitos da DOX nos modelos de membrana contendo CYP3A4 sugere que o CYP3A4 pode influenciar a atividade da DOX, afetando sua interação com os lipídios, o que é relevante para sua difusão (transporte) e efetividade.¹⁶ Esse resultado corrobora a hipótese de inativação da DOX pelo Citocromo P450 3A4,³³ uma possível rota de resistência ao quimioterápico, principalmente por células cancerosas que exibem uma sobreexpressão dessas enzimas.¹⁰

Este trabalho empregou monocamadas de Langmuir formadas pela mistura de Chol, DPPC, DPPE e PI para investigar a interação com microsossomos contendo CYP3A4, seu cofator NADPH e o substrato DOX. Essa abordagem difere dos estudos descritos na literatura. Os resultados são consistentes com a potencial resistência à DOX associada ao sistema do Citocromo P450 3A4, mostrando também a relevância da composição lipídica da membrana para interação do quimioterápico.

4 CONCLUSÕES

Investigamos as interações de microsossomos contendo o sistema enzimático do Citocromo P450 3A4 (CYP3A4), e do quimioterápico DOX com monocamadas de Langmuir que mimetizam membranas biológicas. Um modelo de membrana do retículo endoplasmático (M1) foi desenvolvido com a mistura de Chol, DPPC, DPPE e PI. Para mimetizar membranas de células cancerosas, aumentamos o conteúdo de Chol e PI, gerando os modelos M4 e M7, respectivamente. Para melhor compreensão das interações envolvendo esses modelos, analisamos também os efeitos do CYP3A4 e da DOX nos seus componentes lipídicos.

Em comparação ao modelo M1, o M4 apresentou as maiores alterações na área média por lipídio e no módulo de compressibilidade superficial devido ao CYP3A4, enquanto o M7 as menores. Apesar do PI interagir consideravelmente com o CYP3A4, o aumento da sua concentração em M7 não intensificou os efeitos do CYP3A4 na monocamada. O Chol não exibiu uma afinidade marcante com o CYP3A4, o que poderia explicar as mudanças pronunciadas em M4. Isso sugere que as quantidades de Chol e PI não são suficientes para que interações específicas com o CYP3A4 contribuam majoritariamente para as alterações observadas nos modelos M4 e M7. As interações entre os componentes lipídicos dos modelos de membrana podem também modificar o comportamento esperado de M4 e M7 com base nos lipídios isolados. Outra possível interpretação é que a incorporação do CYP3A4 provoca maiores alterações em M4 devido ao caráter mais condensado da monocamada, o que é consistente com a menor mudança em M7, cuja monocamada é menos condensada. Em resumo, a interação com o CYP3A4 variou conforme a composição lipídica da monocamada.

A DOX provocou expansão e fluidez (redução do C_s^{-1}) nos modelos de membrana, sendo mais pronunciadas em M4 e menos intensas em M7. Os estudos com lipídios isolados indicam uma interação significativa da DOX com o Chol, e principalmente com o PI. Essas observações são consistentes com os efeitos observados em M4. No entanto, apesar da maior concentração de PI em M7, as alterações na monocamada devido à DOX não foram acentuadas. Assim como na interação com o CYP3A4, a quantidade de PI e/ou as interações entre os lipídios da monocamada podem influenciar o efeito esperado da DOX no modelo M7. Além disso, o estado de condensação da monocamada também pode afetar as alterações induzidas pela DOX. De todo modo, a interação com a DOX é dependente da composição da monocamada.

Para os modelos de membrana contendo CYP3A4, as alterações induzidas pela DOX foram consideravelmente inferiores às observadas nas respectivas monocamadas sem o CYP3A4. Isso indica que o CYP3A4 reduz os efeitos da DOX, afetando sua interação com os

lipídios, o que é relevante para sua atividade antitumoral. A análise das projeções IDMAP sugerem que essa atenuação pode variar entre os modelos de membrana, indicando que a composição da membrana pode influenciar a atividade do CYP3A4. Embora a biotransformação da DOX pelo CYP3A4+NADPH não pode ser inferida, os estudos de espectroscopia UV-Vis em solução confirmaram a integridade e atividade do CYP3A4. Os espectros PM-IRRAS sugerem interações entre o CYP3A4, DOX e NADPH, com a possível formação de complexos CYP3A4-DOX (enzima-substrato), que pode ser o mecanismo responsável pela redução dos efeitos da DOX nas monocamadas contendo CYP3A4. Estudos adicionais são necessários para elucidar esse mecanismo, como a investigação desses sistemas em substratos sólidos e simulações de dinâmica molecular. Contudo, esses resultados são consistentes com a potencial resistência à DOX associada ao Citocromo P450 3A4. Essas informações podem ajudar a compreender o papel do CYP3A4 e da composição lipídica de biomembranas na resistência a quimioterápicos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias para melhorar a eficácia da quimioterapia.

5 PERSPECTIVAS

Todo o trabalho apresentado nesta tese foi experimental, essencialmente com filmes de Langmuir. Uma perspectiva interessante é comparar esses resultados com simulações de dinâmica molecular (MD), que é uma técnica computacional que utiliza os princípios da Mecânica Clássica para modelar o movimento de partículas, como átomos ou moléculas, em um sistema. As interações entre essas partículas são descritas por um conjunto de parâmetros conhecido como campo de força, estimado com base em dados experimentais e teóricos. A partir da configuração inicial do sistema e com a descrição das interações pelo campo de força, as equações de movimento são resolvidas numericamente. O resultado é uma trajetória que descreve as posições e velocidades de cada partícula ao longo do tempo simulado. A análise das configurações microscópicas do sistema permite extrair propriedades macroscópicas e investigar o comportamento das moléculas.^{63,160} As simulações de dinâmica molecular são utilizadas para estudar interações de moléculas com biomembranas, fornecendo informações detalhadas sobre o mecanismo de ligação e penetração dessas moléculas na membrana. Essas simulações permitem determinar propriedades como área por lipídio, espessura da membrana, parâmetros de ordem, constantes de ligação e coeficientes de difusão e partição, contribuindo para a compreensão dos fenômenos envolvendo membranas biológicas.¹⁶¹

Ao simular os sistemas estudados neste trabalho com dinâmica molecular, pode-se obter detalhes das interações entre o CYP3A4 e a DOX com os lipídios isolados e modelos de membrana. Isso é relevante porque as interações entre o Chol, DPPC, DPPE e PI nas monocamadas mistas não são facilmente acessíveis experimentalmente. Com simulações de MD, pode ser possível explicar o comportamento inesperado do modelo M7. A redução dos efeitos da DOX nas monocamadas contendo CYP3A4 foi associada à formação de complexos CYP3A4-DOX (enzima-substrato). Simulações computacionais podem fornecer mais informações sobre as interações entre o CYP3A4 incorporado nos modelos de membrana com a DOX e o cofator NADPH. Tais informações podem facilitar a compreensão do mecanismo de resistência à DOX associado ao CYP3A4.

REFERÊNCIAS

- 1 HOLOHAN, C. *et al.* Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, New York, v. 13, n. 10, p. 714–726, 2013. DOI: 10.1038/nrc3599.
- 2 VADLAPATLA, R. *et al.* Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy: coordinated role and regulation of efflux transporters and metabolizing enzymes. **Current Pharmaceutical Design**, New York, v. 19, n. 40, p. 7126–7140, 2013. DOI: 10.2174/13816128113199990493.
- 3 BAR-ZEEV, M.; LIVNEY, Y. D.; ASSARAF, Y. G. Targeted nanomedicine for cancer therapeutics: towards precision medicine overcoming drug resistance. **Drug Resistance Updates**, Amsterdam, v. 31, p. 15–30, 2017. DOI: 10.1016/j.drug.2017.05.002.
- 4 PARKINSON, A. *et al.* Biotransformation of xenobiotics. *In*: KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. (ed.). **Casarett and doull's essentials of toxicology**. 4th ed. New York: McGraw Hill, 2021.
- 5 JOYCE, H. *et al.* Influence of multidrug resistance and drug transport proteins on chemotherapy drug metabolism. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, New York, v. 11, n. 5, p. 795–809, 2015. DOI: 10.1517/17425255.2015.1028356.
- 6 ESTEVES, F.; RUEFF, J.; KRANENDONK, M. The Central role of cytochrome P450 in xenobiotic metabolism—a brief review on a fascinating enzyme family. **Journal of Xenobiotics**, v. 11, n. 3, p. 94–114, 2021. DOI: 10.3390/jox11030007.
- 7 FUJITA, K. Cytochrome P450 and anticancer drugs. **Current Drug Metabolism**, New York, v. 7, n. 1, p. 23–37, 2006. DOI: 10.2174/138920006774832587.
- 8 ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug metabolism in the liver. **Clinics in Liver Disease**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 1–20, 2017. DOI: 10.1016/j.cld.2016.08.001.
- 9 HWANG, G. *et al.* Role of cytochrome P450 2J2 on cell proliferation and resistance to an anticancer agent in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Oncology Letters**, v. 14, n. 5, p. 5484–5490, 2017. DOI: 10.3892/ol.2017.6846.
- 10 DHAINI, H. R. *et al.* Cytochrome P450 CYP3A4/5 Expression as a biomarker of outcome in osteosarcoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 13, p. 2481–2485, 2003. DOI: 10.1200/JCO.2003.06.015.
- 11 MILLER, W. L. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. **Endocrinology**, v. 146, n. 6, p. 2544–2550, 2005. DOI: 10.1210/en.2005-0096.
- 12 BAYLON, J. L. *et al.* Characterizing the membrane-bound state of cytochrome P450 3A4: structure, depth of insertion, and orientation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 23, p. 8542–8551, 2013. DOI: 10.1021/ja4003525.

13 SCOTT, E. E. *et al.* The Role of protein-protein and protein-membrane interactions on P450 function. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 44, n. 4, p. 576–590, 2016. DOI: 10.1124/dmd.115.068569.

14 NAVRÁTILOVÁ, V. *et al.* Effect of lipid charge on membrane immersion of cytochrome P450 3A4. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 43, p. 11205–11213, 2016. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b10108.

15 SZLASA, W. *et al.* Lipid composition of the cancer cell membrane. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 52, n. 5, p. 321–342, 2020. DOI: 10.1007/s10863-020-09846-4.

16 PEETLA, C. *et al.* Drug resistance in breast cancer cells: biophysical characterization of and doxorubicin interactions with membrane lipids. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 2334–2348, 2010. DOI: 10.1021/mp100308n.

17 DELEU, M. *et al.* Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: a review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - biomembranes**, v. 1838, n. 12, p. 3171–3190, 2014. DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.08.023.

18 ALVES, A. C. *et al.* Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - biomembranes**, v. 1858, n. 9, p. 2231–2244, 2016. DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.06.025.

19 LUCHINI, A.; VITIELLO, G. Mimicking the mammalian plasma membrane: an overview of lipid membrane models for biophysical studies. **Biomimetics**, v. 6, n. 1, p. 3, 2020. DOI: 10.3390/biomimetics6010003.

20 BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. Interactions of anticancer drugs with biomembranes: what can we learn from model membranes? **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 127–138, 2014. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.05.012.

21 CASELI, L. *et al.* The role of Langmuir monolayers to understand biological events. *In: Recent progress in colloid and surface chemistry with biological applications*. New York: American Chemical Society, 2015. p. 65–88. (ACS series, v. 1215). DOI: 10.1021/bk-2015-1215.ch004.

22 PREETHA, A.; HUILGOL, N.; BANERJEE, R. Comparison of paclitaxel penetration in normal and cancerous cervical model monolayer membranes. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 53, n. 2, p. 179–186, 2006. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.09.005.

23 HILTON, K. L. F. *et al.* The phospholipid membrane compositions of bacterial cells, cancer cell lines and biological samples from cancer patients. **Chemical Science**, v. 12, n. 40, p. 13273–13282, 2021. DOI: 10.1039/D1SC03597E.

24 NELSON, D. R. *et al.* P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v. 6, n. 1, p. 1–42, 1996. DOI: 10.1097/00008571-199602000-00002.

- 25 NEBERT, D. W.; RUSSELL, D. W. Clinical importance of the cytochromes P450. **Lancet**, v. 360, n. 9340, p. 1155–1162, 2002. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)11203-7.
- 26 PANDEY, A. V.; FLÜCK, C. E. NADPH P450 oxidoreductase: structure, function, and pathology of diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 229–254, 2013. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.010.
- 27 PANDEY, A. V.; SPROLL, P. Pharmacogenomics of human P450 oxidoreductase. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 1–11, 2014. DOI: 10.3389/fphar.2014.00103.
- 28 RENDIC, S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. **Drug Metabolism Reviews**, v. 34, n. 1–2, p. 83–448, 2002. DOI: 10.1081/dmr-120001392.
- 29 GOLDSTEIN, I. *et al.* Chemotherapeutic agents induce the expression and activity of their clearing enzyme CYP3A4 by activating p53. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 1, p. 190–198, 2013. DOI 10.1093/carcin/bgs318.
- 30 BARATA, I. S. *et al.* The complex dynamic of phase I drug metabolism in the early stages of doxorubicin resistance in breast cancer cells. **Genes**, v. 13, n. 11, p. 1977, 2022. DOI: 10.3390/genes13111977.
- 31 WANG, F. *et al.* Activation/inactivation of anticancer drugs by CYP3A4: influencing factors for personalized cancer therapy. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 51, n. 5, p. 543–559, 2023. DOI: 10.1124/dmd.122.001131.
- 32 ZHOU, S.-F. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 4, p. 310–322, 2008. DOI: 10.2174/138920008784220664.
- 33 RODRÍGUEZ-ANTONA, C. *et al.* Expression of CYP3A4 as a predictor of response to chemotherapy in peripheral T-cell lymphomas. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3345–3351, 2007. DOI: 10.1182/blood-2007-02-075036.
- 34 MIYOSHI, Y. *et al.* Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues. **International Journal of Cancer**, v. 97, n. 1, p. 129–132, 2002. DOI: 10.1002/ijc.1568.
- 35 HARMSEN, S. *et al.* The role of nuclear receptors in pharmacokinetic drug–drug interactions in oncology. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, n. 4, p. 369–380, 2007. DOI: 10.1016/j.ctrv.2007.02.003.
- 36 HAKKOLA, J. *et al.* Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 11, p. 3671–3722, 2020. DOI: 10.1007/s00204-020-02936-7.
- 37 GUENGERICH, F. P. Roles of cytochrome P450 enzymes in pharmacology and toxicology: past, present, and future. *In: Advances in Pharmacology*, v. 95, p. 1–47, 2022. DOI: 10.1016/bs.apha.2021.12.001.

- 38 ŠREJBER, M. *et al.* Membrane-attached mammalian cytochromes P450: an overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 183, p. 117–136, 2018. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2018.03.002.
- 39 WILLIAMS, P. A. *et al.* Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. **Science**, v. 305, n. 5684, p. 683–686, 2004. DOI: 10.1126/science.1099736.
- 40 FEHER, J. Biological membranes. *In: Quantitative human physiology: an introduction.* 2nd ed. New York: Academic Press, 2017. p. 142–155.
- 41 GENNIS, R. B. **Biomembranes: molecular structure and function.** New York: Springer, 1989.
- 42 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. DOI: 10.1021/mp9000662.
- 43 VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 112–124, 2008. DOI: 10.1038/nrm2330.
- 44 BETTS, J. G. *et al.* **Anatomy and physiology.** 2nd ed. Houston, UK: OpenStax, 2022.
- 45 VAN MEER, G.; DE KROON, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 1, p. 5–8, 2011. DOI: 10.1242/jcs.071233.
- 46 RAJENDRAN, L.; SIMONS, K. Lipid rafts and membrane dynamics. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 6, p. 1099–1102, 2005. DOI: 10.1242/jcs.01681.
- 47 LUCIO, M.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, S. Drug-membrane interactions: significance for medicinal chemistry. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 17, p. 1795–1809, 2010. DOI: 10.2174/092986710791111233.
- 48 LODISH, H. *et al.* **Biologia celular e molecular.** 7. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2014.
- 49 HIANIK, T. Structure and physical properties of biomembranes and model membranes. **Acta Physica Slovaca: reviews and tutorials**, v. 56, n. 6, p. 687–805, 2006. DOI: 10.2478/v10155-010-0082-z.
- 50 ANDRADE, S. *et al.* Liposomes as biomembrane models: biophysical techniques for drug-membrane interaction studies. **Journal of Molecular Liquids**, v. 334, n. 9, p. 116141, 2021. DOI: 10.1016/j.molliq.2021.116141.
- 51 LI, H.; ZHAO, T.; SUN, Z. Analytical techniques and methods for study of drug-lipid membrane interactions. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 37, n. 1, 2018. DOI:10.1515/revac-20170012.
- 52 SZACHOWICZ-PETELSKA, B.; FIGASZEWSKI, Z.; LEWANDOWSKI, W. Mechanisms of transport across cell membranes of complexes contained in antitumour drugs.

International Journal of Pharmaceutics, v. 222, n. 2, p. 169–182, 2001. DOI: 10.1016/s0378-5173(01)00713-x.

53 SEDDON, A. M. *et al.* Drug interactions with lipid membranes. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 9, p. 2509, 2009. DOI: 10.1039/b813853m.

54 ESCRIBÁ, P. V. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 34–43, 2006. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.11.004.

55 BANDU, R.; MOK, H. J.; KIM, K. P. Phospholipids as cancer biomarkers: mass spectrometry-based analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 37, n. 2, p. 107–138, 2018. DOI: 10.1002/mas.21510.

56 PERROTTI, F. *et al.* Advances in lipidomics for cancer biomarkers discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1992, 2016. DOI: 10.3390/ijms17121992.

57 CHAKRABARTI, A. Phospholipid asymmetry in biological membranes: is the role of phosphatidylethanolamine underappreciated? **Journal of Membrane Biology**, v. 254, n. 2, p. 127–132, 2021. DOI: 10.1007/s00232-020-00163-w.

58 SHARMA, B.; KANWAR, S. S. Phosphatidylserine: a cancer cell targeting biomarker. **Seminars in Cancer Biology**, v. 52, p. 17–25, 2018. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.08.012.

59 BOEDTKJER, E.; PEDERSEN, S. F. The acidic tumor microenvironment as a driver of cancer. **Annual Review of Physiology**, v. 82, n. 1, p. 103–126, 2020. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021119-034627.

60 KNOBLOCH, J. *et al.* Membrane–drug interactions studied using model membrane systems. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 6, p. 714–718, 2015. DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.03.007.

61 BUNEA, A. I. *et al.* Membrane interactions in drug delivery: model cell membranes and orthogonal techniques. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 281, p. 102177, 2020. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102177.

62 NOBRE, T. M. *et al.* Interactions of bioactive molecules & nanomaterials with Langmuir monolayers as cell membrane models. **Thin Solid Films**, v. 593, p. 158–188, 2015. DOI: 10.1016/j.tsf.2015.09.047.

63 LOPES, D. *et al.* Shedding light on the puzzle of drug-membrane interactions: experimental techniques and molecular dynamics simulations. **Progress in Lipid Research**, v. 65, p. 24–44, 2017. DOI: 10.1016/j.plipres.2016.12.001.

64 GIRARD-EGROT, A. P.; GODOY, S.; BLUM, L. J. Enzyme association with lipidic Langmuir–Blodgett films: interests and applications in nanobioscience. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 116, n. 1–3, p. 205–225, 2005. DOI: 10.1016/j.cis.2005.04.006.

65 DYNAROWICZ-ŁĄTKA, P.; DHANABALAN, A.; OLIVEIRA, O. N. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 91, n. 2, p. 221–293, 2001. DOI: 10.1016/s0001-8686(99)00034-2.

66 DA RÓZ, A. L. *et al.* **Nanoestruturas: princípios e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

67 LEE, K. Y. C. Collapse mechanisms of Langmuir monolayers. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 771–791, 2008. DOI: 10.1146/annurev.physchem.58.032806.104619.

68 FIDALGO RODRIGUEZ, J. L. *et al.* New look for an old molecule – solid/solid phase transition in cholesterol monolayers. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 225, September, p. 104819, 2019. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2019.104819.

69 DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K. **Interfacial phenomena**. 2nd ed. New York, Academic Press, 1963.

70 OLIVEIRA, O. N.; CASELI, L.; ARIGA, K. The Past and the future of Langmuir and Langmuir–Blodgett Films. **Chemical Reviews**, v. 122, n. 6, p. 6459–6513, 2022. DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00754.

71 FIDALGO RODRIGUEZ, J. L. *et al.* Phase transition beyond the monolayer collapse – the case of stearic acid spread at the air/water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 623, p. 126781, 2021. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2021.126781.

72 MARSH, D. Lateral pressure in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - reviews on biomembranes**, v. 1286, n. 3, p. 183–223, 1996. DOI: 10.1016/s0304-4157(96)00009-3.

73 ZHAO, L.; FENG, S.-S. Effects of lipid chain unsaturation and headgroup type on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembrane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, n. 1, p. 326–335, 2005. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.11.032.

74 WYDRO, P.; HĄC-WYDRO, K. Thermodynamic description of the interactions between lipids in ternary Langmuir monolayers: the study of cholesterol distribution in membranes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 10, p. 2495–2502, 2007. DOI: 10.1021/jp066950+.

75 ELDERDFI, M.; SIKORSKI, A. F. Langmuir-monolayer methodologies for characterizing protein-lipid interactions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 212, p. 61–72, 2018. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2018.01.008.

76 FIDALGO RODRÍGUEZ, J. L.; DYNAROWICZ-LATKA, P.; MIÑONES CONDE, J. How unsaturated fatty acids and plant stanols affect sterols plasma level and cellular membranes? review on model studies involving the Langmuir monolayer technique. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 232, p. 104968, 2020. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2020.104968.

77 GLOMM, W. R. *et al.* Same system—different results: the Importance of protein-introduction protocols in Langmuir-monolayer studies of lipid-protein interactions. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 3042–3050, 2009. DOI: 10.1021/ac8027257.

78 PEREIRA, A. R. *et al.* Enhanced chitosan effects on cell membrane models made with lipid raft monolayers. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 193, p. 111017, 2020. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111017.

79 ZHAO, L.; FENG, SS. Effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within the lipid monolayer at the air–water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 300, n. 1, p. 314–326, 2006. DOI: 10.1016/j.jcis.2006.03.035.

80 MATERON, E. M. *et al.* Role of sphingomyelin on the interaction of the anticancer drug gemcitabine hydrochloride with cell membrane models. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 196, p. 111357, 2020. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111357.

81 MAGET-DANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - biomembranes**, v. 1462, n. 1–2, p. 109–140, 1999. DOI: 10.1016/s0005-2736(99)00203-5.

82 FENG, S. S.; GONG, K.; CHEW, J. Molecular Interactions between a lipid and an antineoplastic drug paclitaxel (taxol) within the lipid monolayer at the air/water interface. **Langmuir**, v. 18, n. 10, p. 4061–4070, 2002. DOI: 10.1021/la011545p.

83 WROBEL, E. C. *et al.* The antibacterial activity of *p-tert*-butylcalix[6]arene and its effect on a membrane model: molecular dynamics and Langmuir film studies. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 22, n. 11, p. 6154–6166, 2020. DOI: 10.1039/D0CP00432D.

84 LEMMA, T. *et al.* The pesticide picloram affects biomembrane models made with Langmuir monolayers. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 181, p. 953–958, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.06.060.

85 JOCHELAVICIUS, K. *et al.* Chitosan effects on monolayers of zwitterionic, anionic and a natural lipid extract from *E. coli* at physiological pH. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 209, p. 112146, 2022. DOI 10.1016/j.colsurfb.2021.112146.

86 SPETH, P. A. J.; VAN HOESEL, Q. G. C. M.; HAANEN, C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 15, n. 1, p. 15–31, 1988. DOI: 10.2165/00003088-198815010-00002.

87 AL-MALKY, H. S.; AL HARTHI, S. E.; OSMAN, A.-M. M. Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 26, n. 2, p. 434–444, 2020. DOI: 10.1177/1078155219877931.

88 MINOTTI, G. *et al.* Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 2, p. 185–229, 2004. DOI: 10.1124/pr.56.2.6.

89 GEWIRTZ, D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 727–741, 1999. DOI: 10.1016/s0006-2952(98)00307-4.

90 THORN, C. F. *et al.* Doxorubicin pathways. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440–446, 2011. DOI: 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.

91 MORDENTE, A. *et al.* New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 13, p. 1656–1672, 2009. DOI: 10.2174/092986709788186228.

92 PRASANNA, P. L.; RENU, K.; VALSALA GOPALAKRISHNAN, A. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. **Life Sciences**, v. 250, p. 117599, 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117599.

93 ROOSEBOOM, M.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 1, p. 53–102, 2004. DOI: 10.1124/pr.56.1.3.

94 LICATA, S. *et al.* Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 414–420, 2000. DOI: 10.1021/tx000013q.

95 WANG, X. *et al.* Discovery of novel doxorubicin metabolites in MCF7 doxorubicin-resistant cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019. DOI:10.3389/fphar.2019.01434.

96 ZANGENEH, M. M. *et al.* Fabrication of a novel impedimetric biosensor for label free detection of DNA damage induced by doxorubicin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 963–971, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.278.

97 MIRZAEI, S. *et al.* Advances in understanding the role of P-gp in doxorubicin resistance: Molecular pathways, therapeutic strategies, and prospects. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 2, p. 436–455, 2022. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.09.020.

98 SRITHARAN, S.; SIVALINGAM, N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. **Life Sciences**, v. 278, p. 119527, 2021. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119527.

99 AL-MALKY, H. S.; AL HARTHI, S. E.; OSMAN, A.-M. M. Major obstacles to doxorubicin therapy: cardiotoxicity and drug resistance. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 26, n. 2, p. 434–444, 2020. DOI: 10.1177/1078155219877931.

100 VANCE, J. E. Phospholipid synthesis and transport in mammalian Cells. **Traffic**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2015. DOI: 10.1111/tra.12230.

101 DAEAR, W.; MAHADEO, M.; PRENNER, E. J. Applications of Brewster angle microscopy from biological materials to biological systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - biomembranes**, v. 1859, n. 10, p. 1749–1766, 2017. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.06.016.

102 BLAUDEZ, D. *et al.* Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 92, n. 4, p. 525, 1996. DOI: 10.1039/FT9969200525.

103 BLAUDEZ, D. *et al.* Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air/water interface. **Applied Spectroscopy**, v. 47, n. 7, p. 869–874, 1993. DOI: 10.1366/0003702934415273.

104 BANC, A. *et al.* Structure and orientation changes of ω - and γ -gliadins at the air–water interface: A PM–IRRAS spectroscopy and Brewster angle microscopy study. **Langmuir**, v. 23, n. 26, p. 13066–13075, 2007. DOI: 10.1021/la702037k.

105 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 (BBA) - biomembranes**, v. 1798, n. 4, p. 788–800, 2010. DOI: 10.1016/j.bbamem.2009.11.024.

106 ZHENG, J.; LEBLANC, R. M. Infrared reflection absorption spectroscopy of monolayers at the air–water interface. **Interface Science and Technology**. v. 14, p. 247–276. DOI: 10.1016/S1573-4285(06)14010-7.

107 MINGHIM, R.; PAULOVICH, F. V.; LOPES, A. A. Content-based text mapping using multi-dimensional projections for exploration of document collections. *In: Visualization and Data Analysis 2006*. Proc. SPIE, 2006. DOI: 10.1117/12.650880.

108 PAULOVICH, F. V.; OLIVEIRA, M. C. F.; MINGHIM, R. The projection explorer: a flexible tool for projection-based multidimensional visualization. *In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON COMPUTER GRAPHICS AND IMAGE PROCESSING (SIBGRAPI 2007)*, 20., 2007, Minas Gerais. **Proceedings [...]** Minas Gerais: IEEE, 2007. p. 27-36. DOI 10.1109/SIBGRAPI.2007.21.

109 TEJADA, E.; MINGHIM, R.; NONATO, L. G. On improved projection techniques to support visual exploration of multi-dimensional data sets. **Information Visualization**, v. 2, n. 4, p. 218–231, 2003. DOI: 10.1057/palgrave.ivs.9500054.

110 PEREIRA, A. R.; SHIMIZU, F. M.; OLIVEIRA, O. N. Cholesterol modulates the interaction between paclitaxel and Langmuir monolayers simulating cell membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 205, p. 111889, 2021. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.111889.

111 FALOUTSOS, C.; LIN, KI. FastMap: a fast algorithm for indexing, data-mining and visualization of traditional and multimedia datasets. **ACM SIGMOD Record**, v. 24, n. 2, p. 163–174, 1995. DOI: 10.1145/568271.223812.

112 PAULOVICH, F. V. **Mapeamento de dados multi-dimensionais - integrando mineração e visualização**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências de Computação e Matemática Computacional) – Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

113 OLIVEIRA, O. N. *et al.* Information visualization to enhance sensitivity and selectivity in biosensing. **Biointerphases**, v. 7, n. 1, p. 53, 2012. DOI: 10.1007/s13758-012-0053-7.

114 SALAY, L. C. *et al.* Headgroup specificity for the interaction of the antimicrobial peptide tritripticin with phospholipid Langmuir monolayers. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 100, p. 95–102, 2012. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.05.002.

115 DEWOLF, C. *et al.* Phase separation in phosphatidylinositol/phosphatidylcholine mixed monolayers. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 97, n. 2, p. 129–138, 1999. DOI: 10.1016/S0009-3084(98)00104-2.

116 GERVOT, L. *et al.* CYP3A5 is the major cytochrome P450 3A expressed in human colon and colonic cell lines. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 381–388, 1996. DOI: 10.1016/s1382-6689(96)00075-0.

117 MARTÍN-MOLINA, A. *et al.* Condensation of model lipid films by cholesterol: specific ion effects. **Coatings**, v. 9, n. 8, p. 474, 2019. DOI: 10.3390/coatings9080474.

118 MAXIMINO, M. D. *et al.* Synergy in the interaction of amoxicillin and methylene blue with dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) monolayers. **Applied Surface Science**, v. 476, p. 493–500, 2019. DOI: 10.1016/j.apsusc.2019.01.065.

119 CHEN, X. *et al.* Reorganization and caging of DPPC, DPPE, DPPG, and DPPS monolayers caused by Dimethylsulfoxide observed using Brewster angle microscopy. **Langmuir**, v. 26, n. 24, p. 18902–18908, 2010. DOI: 10.1021/la102842a.

120 GALLOIS, L.; FIALLO, M.; GARNIER-SUILLEROT, A. Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - biomembranes**, v. 1370, n. 1, p. 31–40, 1998. DOI: 10.1016/s0005-2736(97)00241-1.

121 MATYSZEWSKA, D. The influence of charge and lipophilicity of daunorubicin and idarubicin on their penetration of model biological membranes – Langmuir monolayer and electrochemical studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - biomembranes**, v. 1862, n. 2, p. 183104, 2020. DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.183104.

122 MATYSZEWSKA, D.; NAZARUK, E.; CAMPBELL, R. A. Interactions of anticancer drugs doxorubicin and idarubicin with lipid monolayers: new insight into the composition, structure and morphology. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 581, p. 403–416, 2021. DOI: 10.1016/j.jcis.2020.07.092.

123 MATYSZEWSKA, D.; JOCEK, A. The effect of acyl chain length and saturation on the interactions of pirarubicin with phosphatidylethanolamines in 2D model urothelial cancer cell membranes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 323, p. 114633, 2021. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.114633.

124 ALVES, A. C. *et al.* Daunorubicin and doxorubicin molecular interplay with 2D membrane models. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 160, p. 610–618, 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.09.058.

125 ZABOROWSKA, M. *et al.* Influence of lipophilicity of anthracyclines on the interactions with cholesterol in the model cell membranes – Langmuir monolayer and SEIRAS studies.

Colloids and Surfaces B: biointerfaces, v. 211, p. 112297, 2022. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.112297.

126 MATYSZEWSKA, D. *et al.* pH dependence of daunorubicin interactions with model DMPC:Cholesterol membranes. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 134, p. 295–303, 2015. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.07.001.

127 MATYSZEWSKA, D.; MOCZULSKA, S. Effect of pH on the interactions of doxorubicin with charged lipid monolayers containing 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-l-serine - an important component of cancer cell membranes. **Electrochimica Acta**, v. 280, p. 229–237, 2018. DOI: 10.1016/j.electacta.2018.05.119.

128 SOUZA, A. L.; OLIVEIRA, O. N. Dominant hydrophobic interactions with β -glucan in nanoarchitectonics with mixed Langmuir monolayers of cholesterol/dipalmitoyl phosphatidyl choline. **Biointerphases**, v. 17, n. 3, p. 031005, 2022. DOI: 10.1116/6.0001866.

129 GUPTA, U. *et al.* Spectroscopic studies of cholesterol: fourier transform infra-red and vibrational frequency analysis. **Materials Focus**, v. 3, n. 3, p. 211–217, 2014. DOI: 10.1166/mat.2014.1161.

130 SOFIŃSKA, K. *et al.* Revealing local molecular distribution, orientation, phase separation, and formation of domains in artificial lipid layers: towards comprehensive characterization of biological membranes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 301, p. 102614, 2022. DOI: 10.1016/j.cis.2022.102614.

131 DREISSIG, I. *et al.* Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression. **Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 71, n. 5, p. 2069–2075, 2009. DOI: 10.1016/j.saa.2008.08.008.

132 BANSAL, R.; SINGH, R.; KAUR, K. Quantitative analysis of doxorubicin hydrochloride and arterolane maleate by mid IR spectroscopy using transmission and reflectance modes. **BMC Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 27, 2021. DOI: 10.1186/s13065-021-00752-3.

133 DAS, G. *et al.* FT-IR, Raman, RRS measurements and DFT calculation for doxorubicin. **Microscopy Research and Technique**, v. 73, n. 10, p. 991-995, 2010. DOI: 10.1002/jemt.20849.

134 MATERÓN, E. M. *et al.* Membrane model as key tool in the study of glutathione-s-transferase mediated anticancer drug resistance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 145, p. 112426, 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112426.

135 JURAK, M. Thermodynamic aspects of cholesterol effect on properties of phospholipid monolayers: Langmuir and Langmuir–Blodgett monolayer study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 13, p. 3496–3502, 2013. DOI: 10.1021/jp401182c.

136 KINOSHITA, M.; KATO, S. Intermolecular interaction of phosphatidylinositol with the lipid raft molecules sphingomyelin and cholesterol. **Biophysics**, v. 4, p. 1–9, 2008. DOI: 10.2142/biophysics.4.1.

137 PATIL-SEN, Y. *et al.* A monolayer phase behaviour study of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol 4-monophosphate and their binary mixtures with distearoylphosphatidylethanolamine. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 6, n. 7, p. 1562–1565, 2004. DOI: 10.1039/B314615B.

138 CORDOBA, J.; JACKSON, S. M.; JONES, M. N. Mixed monolayers of phosphatidylinositol and dipalmitoylphosphatidylcholine and their interaction with liposomes. **Colloids and Surfaces**, v. 46, n. 1, p. 85–94, 1990. DOI: 10.1016/0166-6622(90)80050-E.

139 LEE, C. A. *et al.* CYP3A4 Expressed by insect cells infected with a recombinant baculovirus containing both CYP3A4 and human NADPH-cytochrome P450 reductase is catalytically similar to human liver microsomal CYP3A4. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 319, n. 1, p. 157–167, 1995. DOI: 10.1006/abbi.1995.1278.

140 LI, A. P. Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties. **Drug Discovery Today: technologies**, v. 2, n. 2, p. 179–185, 2005. DOI: 10.1016/j.ddtec.2005.05.024.

141 WEN, X.; FRANSES, E. I. Role of subsurface particulates on the dynamic adsorption of dipalmitoylphosphatidylcholine at the air/water interface. **Langmuir**, v. 17, n. 11, p. 3194–3201, 2001. DOI: 10.1021/la001502t.

142 PANAIOTOV, I. *et al.* Spreading kinetics of dimyristoylphosphatidylcholine liposomes at the air/water interface below and above the main phase-transition temperature. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 102, n. C, p. 159–165, 1995. DOI: 10.1016/0927-7757(95)03253-A.

143 GIRARD-EGROT, A. P. *et al.* Immunological proteo-glycolipidic interfacial film obtained from spreading of liposomes including ascitic fluid. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 18, n. 2, p. 125–135, 2000. DOI: 10.1016/S0927-7765(99)00132-0.

144 NAVRÁTILOVÁ, V. *et al.* Effect of cholesterol on the structure of membrane-attached cytochrome P450 3A4. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 3, p. 628–635, 2015. DOI: 10.1021/ci500645k.

145 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. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.02.009.

146 BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell about proteins. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 35, n. 4, p. 369–430, 2002. DOI: 10.1017/s0033583502003815.

147 JUNG, C. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to study structural properties of cytochromes P450 (CYPs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 6, p. 1031–1058, 2008. DOI: 10.1007/s00216-008-2216-4.

148 SANTANA, H. J. A.; CASELI, L. A bactericide peptide changing the static and dilatational surface elasticity properties of zwitterionic lipids at the air-water interface: relationship with the thermodynamic, structural and morphological properties. **Biophysical Chemistry**, v. 277, p. 106638, 2021. DOI: 10.1016/j.bpc.2021.106638.

149 WANG, H. *et al.* A PM-IRRAS Investigation of monorhamnolipid orientation at the air–water interface. **Langmuir**, v. 29, n. 14, p. 4441–4450, 2013. DOI: 10.1021/la3051725.

150 HEYWANG, C. *et al.* Orientation of anthracyclines in lipid monolayers and planar asymmetrical bilayers: a surface-enhanced resonance raman scattering study. **Biophysical Journal**, v. 75, n. 5, p. 2368–2381, 1998. DOI: 10.1016/s0006-3495(98)77681-7.

151 GELLERT, F.; AHRENS, H.; HELM, C. A. Oxidation of unsaturated phospholipids: a monolayer study. **Langmuir**, v. 36, n. 41, p. 12213–12220, 2020. DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c01950.

152 BLAUDEZ, D.; CASTANO, S.; DESBAT, B. PM-IRRAS at liquid interfaces. *In*: PRADIER, C. M.; CHABAL, Y. J. **Biointerface Characterization by Advanced IR Spectroscopy**. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 27–55. DOI: 10.1016/B978-0-444-53558-0.00002-3.

153 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. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b00693.

154 SEVRIOUKOVA, I. F.; POULOS, T. L. Current approaches for investigating and predicting cytochrome P450 3A4–ligand interactions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.851, p. 83–105. 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-16009-2_3.

155 SEVRIOUKOVA, I. F.; POULOS, T. L. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 9, p. 3116–3126, 2013. DOI: 10.1039/c2dt31833d.

156 CAO, X. *et al.* Density functional studies of coenzyme NADPH and Its oxidized form NADP⁺: structures, UV–Vis spectra, and the oxidation mechanism of NADPH. **Journal of Computational Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 305–316, 2020. DOI: 10.1002/jcc.26103.

157 JIA, M. *et al.* A Theoretical investigation about the excited state dynamical mechanism for doxorubicin sensor. **Journal of Cluster Science**, v. 29, n. 4, p. 673–678, 2018. DOI: 10.1007/s10876-018-1388-0.

158 SILVA, E. F. E. *et al.* Are the absorption spectra of doxorubicin properly described by considering different tautomers? **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 513–521, 2020. DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00785.

159 KOSTRZEWA-NOWAK, D. *et al.* The role of bioreductive activation of doxorubicin in cytotoxic activity against leukaemia HL60-sensitive cell line and its multidrug-resistant sublines. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 1, p. 89–97, 2005. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602639.

160 HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular dynamics simulation for all. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, 2018. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.08.011.

161 MARTINOTTI, C. *et al.* Molecular dynamics simulation of small molecules interacting with biological membranes. **Chemphyschem**, v. 21, n. 14, p. 1486–1514, 2020. DOI: 10.1002/cphc.202000219.