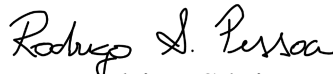


Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pós-Graduação do Instituto Tecnológico de Aeronáutica, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Física, Área de Física de Plasma.

Luan Gonçalves de Lima

**EXPLORANDO O POTENCIAL TERAPÊUTICO DO PLASMA
FRIO NO TRATAMENTO DE CÉLULAS B16F10: UM
ESTUDO COMPARATIVO DE ABORDAGENS DIRETAS E
INDIRETAS**

Dissertação aprovada em sua versão final pelos abaixo assinados:



Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa
Orientador



Prof. Dr. Clodomiro Alves Junior
Coorientador

Campo Montenegro
São José dos Campos, SP – Brasil
2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Divisão de Informação e Documentação

Lima, Luan Gonçalves de Lima

Explorando o potencial terapêutico do Plasma frio no tratamento de células B16F10: um estudo comparativo de abordagens diretas e indiretas/ Luan Gonçalves de Lima.

São José dos Campos, 2024.

100f.

Dissertação de mestrado – Pós-Graduação em Física, Área de Física de Plasmas – Instituto Tecnológico de Aeronáutica, 2024.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa

Co-orientador: Prof. Dr. Clodomiro Alves Júnior

1. Terapia do Câncer. 2. Meio de Cultura Ativado a Plasma. 3. Plasma frio atmosférico (CAP). I. Instituto Tecnológico de Aeronáutica. II. Explorando o potencial terapêutico do Plasma frio no tratamento de células B16F10: um estudo comparativo de abordagens diretas e indiretas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

LIMA, Luan Gonçalves de Lima. **Explorando o potencial terapêutico do Plasma frio no tratamento de células B16F10: um estudo comparativo de abordagens diretas e indiretas.** 2024. 100f. Dissertação de mestrado em Física de Plasmas – Instituto Tecnológico de Aeronáutica, São José dos Campos, 2024.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Luan Gonçalves de Lima

TÍTULO DO TRABALHO: Explorando o potencial terapêutico do Plasma frio no tratamento de células B16F10: um estudo comparativo de abordagens diretas e indiretas.

TIPO DO TRABALHO/ANO: Dissertação / 2024

É concedida ao Instituto Tecnológico de Aeronáutica permissão para reproduzir cópias desta dissertação e para emprestar ou vender cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação ou tese pode ser reproduzida sem a sua autorização (do autor).



Luan Gonçalves de Lima

Viela Soldado Alexandre Fontes, 41 – Conjunto Habitacional da Polícia Militar

CEP: 12228-442, São José dos Campos - SP

**EXPLORANDO O POTENCIAL TERAPÊUTICO DO
PLASMA FRIO NO TRATAMENTO DE CÉLULAS B16F10:
UM ESTUDO COMPARATIVO DE ABORDAGENS DIRETAS
E INDIRETAS**

Luan Gonçalves de Lima

Composição da Banca Examinadora:

Prof. Dr.	Gilberto Petraconi Filho	Presidente	- ITA
Prof. Dr.	Rodrigo Sávio Pessoa	Orientador	- ITA
Dr.	Clodomiro Alves Junior	Coorientador	- UFERSA
Prof. Dr.	Douglas Marcel Gonçalves Leite	Membro Interno	- ITA
Dra.	Cristiane Yumi Koga-Ito	Membro Externo	- UNESP

ITA

Dedico este trabalho àqueles que, de alguma forma,
buscam evoluir seu conhecimento e veem, na dúvida,
uma ponte para o aprendizado.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família. Meus pais, Mariany e Wagsney, por serem os responsáveis por eu chegar até aqui. Obrigado por serem minha base, por me apoiarem em cada decisão que fiz e me acompanharem em cada dificuldade, me impedindo de desistir. E ao meu irmão, Kauan, meu médico favorito, por todo o apoio, ajuda e conselhos durante todo esse processo e durante toda a minha vida. Você tem a minha maior admiração nesse mundo!

Ao meu amor, minha companheira de vida, de profissão e laboratório. À Michaela, a pessoa mais incrível que eu poderia ter conhecido nessa vida, que nunca me permitiu trancar uma matéria e nem desistir dos meus sonhos. Obrigado por me apoiar em absolutamente tudo, topar minhas loucuras e entrar de cabeça em todos os projetos que fazemos. Você é responsável por tudo que conquistamos e ainda iremos conquistar, sempre juntos. Amo você!

Ao meu orientador, Prof. Rodrigo, obrigado primeiramente por ter me acolhido no LPP desde o primeiro dia, me incentivando a fazer IC com o senhor. Agradeço também pela amizade nesses últimos anos, por todo apoio e correções neste trabalho e por ser minha referência como pesquisador. E ao meu co-orientador, Prof. Clodomiro, que em tão pouco tempo me passou ensinamentos valiosíssimos, sempre me incentivando a evoluir na pesquisa.

Ao meu amigo e eterno co-orientador de projetos de laboratório, William Chiappim, obrigado pela amizade, pelos ensinamentos, desafios, portas abertas e pela confiança em meu trabalho. E sua esposa Stella, pela amizade, conselhos, almoços/cafés e apoio nesses anos.

Agradeço aos professores do LPP, Rodrigo, Petraconi, Douglas, Argemiro, André, Homero e Gilmar, por todo o conhecimento transmitido durante todos esses anos. E a todo o pessoal do LPP – ITA, Eduardo, Nina, Gabriel, Thaís, Jade, Helen, Rafa, Pedro, Paulo, Letícia, Isabela H., Isabella G., Lucão, Carlão, Marcelo, Tia Eliane, Garufe, Seu Jorge, Nierlly e Álvaro.

Agradeço à Professora Dayane Tada, por ceder o laboratório de Nanotoxicologia da UNIFESP e apoiar minha pesquisa. E à Rafa e Luiza, por todo o apoio dado durante esse tempo.

Agradeço em especial, aos meus amigos e parceiros de pesquisa, Júlia, Neto, Miranda e Nilton, por cada momento desde que entrei no LPP e por me ensinarem tanto.

Em memória de João Pedro Chaves, agradeço por ter sido um ótimo parceiro de laboratório e um grande amigo e conselheiro pra vida. Obrigado por tudo, você faz falta.

Em memória de meu primo Douglas Soares Silva, agradeço por cada momento e por ter sido minha grande inspiração e incentivo para vir para a física. Obrigado por tudo, você foi e sempre será minha referência como pesquisador.

*"Tudo está ao alcance das mãos do homem
e tudo lhe escapa, em virtude de sua covardia".*

(Fiódor Dostoiévski)

Resumo

O interesse crescente no uso do plasma frio à pressão atmosférica (CAP) como terapia contra o câncer tem ganhado destaque significativo recentemente. O CAP se apresenta como uma alternativa terapêutica promissora para o combate a tumores, graças à sua habilidade de induzir a morte seletiva de células tumorais. Descobertas mais recentes apontam que o plasma afeta as células cancerígenas não apenas de forma direta, mas também de maneira indireta, por meio do tratamento com meio ativado por plasma (PAM, *plasma activated medium*), preparado previamente. Diante disso, este estudo foca na utilização e caracterização do plasma de descarga de barreira dielétrica superficial (SDBD, *surface dielectric barrier discharge*) como possível tratamento para as células B16F10, um modelo celular amplamente utilizado para estudos de melanoma. O experimento contempla tanto abordagens de tratamento diretas quanto indiretas. Um plasma SDBD foi empregado em uma placa de 24 poços, onde células cancerígenas B16F10 foram cultivadas em meio RPMI, com densidade de 6.10^4 células/mL por poço e, a efeitos de comparação, células saudáveis L929 (fibroblastos) foram cultivadas em meio DMEM, com igual densidade por poço. No tratamento direto, o plasma SDBD foi aplicado diretamente sobre o meio de cultura que continha as células B16F10, variando os tempos de exposição entre 1, 2 e 3 minutos. Diferentemente da aplicação direta, o tratamento indireto consistiu na irradiação do meio de cultura, que, após ser exposto ao plasma, foi transferido para outra placa contendo as células. As propriedades físico-químicas do plasma SDBD gerado, incluindo a composição das espécies reativas, foram determinadas por meio de espectroscopia de emissão óptica (OES) e análises elétricas. Os PAM's, por sua vez, foram caracterizados utilizando espectrofotometria UV-Vis e um medidor multiparâmetros. A influência dos tratamentos com plasma SDBD na viabilidade celular foi avaliada em ambas as abordagens, direta e indireta, através do ensaio MTT, 24h e 48h após a ativação. Dentre os diferentes tempos de ativação testados, a exposição de 3 minutos mostrou ser a mais eficaz, resultando em uma redução de 13% na viabilidade celular para o método direto e de 15% para o indireto. A variação nos resultados entre os métodos direto e indireto e a diferença entre citotoxicidade para células L929 e B16F10 pode ser atribuída a certos fatores. O primeiro, pelo fato de células cancerígenas possuírem um nível aumentado de espécies reativas em seu interior, além do aumento do número de aquaporinas. O segundo, refere-se aos métodos de tratamento, pois, no tratamento direto, pelo menos três fatores são relevantes: espécies reativas de curta duração (O_3^- e OH), espécies de longa duração (H_2O_2 , NO_2^- , NO_3^- e HNO_2) e fatores físicos (radiação UV). Em contrapartida, no tratamento indireto, apenas as espécies de longa duração são consideradas.

Abstract

The growing interest in the use of cold atmospheric pressure plasma (CAP) as a cancer therapy has gained significant attention recently. CAP presents itself as a promising therapeutic alternative for the fight against tumors, thanks to its ability to induce the selective death of tumor cells. More recent findings indicate that plasma affects cancer cells not only directly, but also indirectly, through treatment with previously prepared plasma activated medium (PAM). In view of this, this study focuses on the use and characterization of surface dielectric barrier discharge (SDBD) plasma as a possible treatment for B16F10 cells, a cell model widely used for melanoma studies. The experiment contemplates both direct and indirect treatment approaches. A SDBD plasma was used in a 24-well plate, where B16F10 cancer cells were cultured in RPMI medium, with a density of 6.10^4 cells/mL per well and, for comparison purposes, healthy L929 cells (fibroblasts) were cultured in DMEM medium, with the same density per well. In the direct treatment, the SDBD plasma was applied directly to the culture medium containing the B16F10 cells, with exposure times varying between 1, 2 and 3 minutes. Unlike the direct application, the indirect treatment consisted of irradiating the culture medium, which, after being exposed to the plasma, was transferred to another plate containing the cells. The physicochemical properties of the generated SDBD plasma, including the composition of the reactive species, were determined by optical emission spectroscopy (OES) and electrical analyses. The PAM's, in turn, were characterized using UV-Vis spectrophotometry and a multiparameter meter. The influence of SDBD plasma treatments on cell viability was evaluated in both direct and indirect approaches through the MTT assay, 24h and 48h after activation. Among the different activation times tested, the 3-minute exposure proved to be the most effective, resulting in a 13% reduction in cell viability for the direct method and 15% for the indirect method. The variation in results between the direct and indirect methods and the difference between cytotoxicity for L929 and B16F10 cells can be attributed to certain factors. The first is because cancer cells have an increased level of reactive species in their interior, in addition to the increased number of aquaporins. The second refers to the treatment methods, since in direct treatment at least three factors are relevant: short-lived reactive species (O_3^- and OH), long-lived species (H_2O_2 , NO_2^- , NO_3^- and HNO₂) and physical factors (UV radiation). In contrast, in indirect treatment, only long-lived species are considered.

Lista de Figuras

Figura 1 – Regime transiente da descarga de arco deslizante em função da distância de separação dos eletrodos.	26
Figura 2 – Configurações do DBD de Volume: (A) Descarga Assimétrica, (B) Descarga Simétrica, (C) Descarga Flutuante, (D) Descarga Cilíndrica.	28
Figura 3 – Configurações do DBD de Superfície: (A) Descarga Simétrica e (B) Descarga Assimétrica.	28
Figura 4 – Diferença entre Água Ativada a Plasma e Água Tratada a Plasma.	29
Figura 5 – Esquematização sobre a seletividade do plasma para células cancerígenas.	40
Figura 6 – Visão bilateral do Reator SDBD, apresentando uma placa de fibra de vidro com circuitos impressos em cobre em ambas as faces. O lado contendo círculos de menor diâmetro está conectado ao terminal de terra, enquanto o lado com círculos de maior diâmetro está ligado à fonte de alta tensão.	43
Figura 7 – Aparato experimental para realização da caracterização elétrica.	44
Figura 8 – Esquematização da placa de cultura de 24 poços, demonstrando quais poços foram utilizados para seguir com os ensaios realizados adiante.	45
Figura 9 – Esquematização do método direto e indireto visualizado de maneira individualizada em apenas um poço de cultura celular.	48
Figura 10. Separação em grupos da localização de cada poço de cultura celular, de modo a facilitar à leitura e identificação dos poços.	49
Figura 11 – (A) Variação da temperatura no reator de plasma DBD em função do tempo; (B) Fluxo térmico em função do tempo; (C) Esquematização do aparato experimental.	51
Figura 12 – (A) Sinal de tensão e (B) corrente obtido através do osciloscópio.	52

Figura 13 – Sinal de potência em variação com o tempo. O intervalo entre as linhas vermelhas delimita o período integrado para obtenção da potência média.	53
Figura 14 – Potencial flutuante obtido através da medição individual de cada um dos 24 eletrodos do reator DBD.	54
Figura 15 – Espectro OES do plasma DBD.	55
Figura 16 – Espectros OES de todos os 24 eletrodos do plasma DBD.	56
Figura 17 – Variação do pH da PAW em função do tempo de ativação monitorados imediatamente após a ativação e 24h e 48h após a ativação.	57
Figura 18 – (A) Variação de Condutividade Elétrica; (B) Variação de ORP; (C) Variação de Salinidade e (D) Variação de TDS em função do tempo de ativação.	58
Figura 19 – Variação do pH em função do tempo de ativação do PAM (DMEM).....	60
Figura 20 – Variação do pH em função do tempo de ativação do PAM (RPMI).	62
Figura 21 – Variação do ORP em função do tempo de ativação para o PAM (a) DMEM e (b) RPMI.	62
Figura 22 – Variação da Condutividade Elétrica em função do tempo de ativação para o PAM (a) DMEM e (b) RPMI.	63
Figura 23 – Variação do TDS em função da variação do tempo de ativação para o PAM (a) DMEM e (b) RPMI.	64
Figura 24 – Variação da Salinidade em função do tempo de ativação para o PAM (a) DMEM e (b) RPMI.	64
Figura 25 – Curva de absorvância para o tempo de 2 min de ativação de água deionizada com eletrodos livres de oxidação.	65
Figura 26 - Curva de absorvância para o tempo de 2 min de ativação de água deionizada com eletrodos oxidados.	66
Figura 27 – Identificação do espectro UV-Vis da PAW de 1, 2 e 3 minutos de ativação.....	67

Figura 28 – Evolução das espécies em PAW para diferentes tempos de envelhecimento.....	68
Figura 29 – (a) Espectros UV-Vis do PAM (DMEM) para 1, 2 e 3 minutos de ativação, com 3 tempos consecutivos de envelhecimento, (b) detalhe da variação da absorção em torno de 560 nm.	69
Figura 30 – (a) Espectros UV-Vis do PAM (RPMI) para 1, 2 e 3 minutos de ativação, com 3 tempos consecutivos de envelhecimento, (b) detalhe da variação da absorção em torno de 560 nm.	71
Figura 31 – Viabilidade celular em função do tempo de ativação de 1 min, 2 min e 3 min após 24h e 48h da ativação para o método direto em células B16F10 e L929. Os resultados foram fornecidos através da média \pm SD (n = 10) Two-way ANOVA com nível de confiança de 95% (** p = 0,0081, *** p = 0,0003 **** p = < 0,0001)	77
Figura 32 – Viabilidade celular em função do tempo de ativação de 1min, 2min e 30min após 24h e 48h da ativação para o método indireto em células B16F10 e L929. Os resultados foram fornecidos através da média \pm SD (n = 10) Two-way ANOVA com nível de confiança de 95% (ns = não há significância, *** p = 0,0002 **** p = < 0,0001)	78
Figura 33 – Diferença do efeito do método indireto em células B16F10 e L929 e ação das espécies reativas de vida longa nas respectivas células.....	82

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Fórmula do meio de cultura celular DMEM.....	33
Tabela 2 – Fórmula do meio de cultura celular RPMI 1640	34
Tabela 3 – Estadiamento para o Melanoma.....	36
Tabela 4 – Concentração de Nitrito, Nitrato e Peróxido de Hidrogênio na PAW após tempo de ativação (1 min, 2 min e 3 min) e do tempo de monitoramento após a ativação (0h, 24h e 48h)	73
Tabela 5 – Concentração de Nitrito, Nitrato e Peróxido de Hidrogênio nos PAM's após tempo de ativação (1 min, 2 min e 3 min) e do tempo de monitoramento após a ativação (0h, 24h e 48h).....	74

Lista de Abreviaturas e Siglas

CAP	Plasma Frio Atmosférico
DBD	Descarga de Barreira Dielétrica
DBD SD	Descarga de Barreira Dielétrica de Superfície
DBD VD	Descarga de Barreira Dielétrica de Volume
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
MW	Micro-ondas
NTAPP	Plasma Não-Térmico em Condições Atmosféricas
OES	Espectroscopia Óptica de Emissão
PAM	Meio Ativado a Plasma
pH	Potencial Hidrogeniônico
RONS	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDBD	Descarga de Barreira Dielétrica de Superfície
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta/Visível

Lista de Símbolos

T_e	temperatura de elétrons
T_g	temperatura do gás
T_i	temperatura de íons
k_I	constante de ionização
n_e	densidade de elétrons
n_g	densidade do gás
n_i	densidade da espécie i
n_p	densidade de plasma
$\sigma_{elétrica}$	condutividade elétrica
τ_i	tempo de formação do arco
α	grau de ionização
d	distância entre o centro das partículas

Sumário

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Contextualização.....	18
1.2	Objetivos Gerais e Específicos.....	20
1.3	Estrutura da Dissertação	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Plasma Atmosférico.....	22
2.1.1	Plasma.....	22
2.1.2	Plasma Frio Atmosférico.....	23
2.1.2.1	Descarga Corona	24
2.1.2.2	Descarga de Arco Deslizante	24
2.1.2.3	Jatos de Plasma de Pressão Atmosférica (APPJ)	26
2.1.2.4	Descarga de Barreira Dielétrica.....	27
2.2	Ativação de Líquidos com Plasma	29
2.2.1	Processo de Ativação	29
2.2.2	Água Ativada a Plasma (PAW)	29
2.2.3	Meio Ativado a Plasma (PAM).....	31
2.2.4	Meio de Cultura Celular	32
2.3	Câncer.....	35
2.3.1	Melanoma	35
2.3.2	Tratamento do câncer	37
2.3.3	Plasma Frio Atmosférico e sua seletividade para células cancerígenas	38
2.3.4	Viabilidade e Morte Celular	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	Sistema SDBD	43
3.2	Caracterização Elétrica do Plasma DBD.....	44
3.3	Caracterização Óptica do Plasma DBD	44
3.4	Caracterização Térmica do Plasma DBD.....	44
3.5	Ensaio de Citotoxicidade.....	45
3.5.1	Redução do Número de Amostragem	45
3.5.2	Preparação do meio de cultura RPMI.....	45
3.5.3	Preparação do meio de cultura DMEM	46

3.5.4	Contagem de células B16F10.....	46
3.5.5	Plaquetamento.....	47
3.5.6	Tratamento das células e do meio de cultura.....	47
3.5.6.1	Método Direto	47
3.5.6.2	Método Indireto	48
3.5.7	Avaliação de atividade metabólica pelo ensaio MTT	49
3.5.7.1	Leitura dos poços da placa de cultura celular	49
3.6	Produção do PAM e da PAW	49
3.7	Caracterização do PAM e da PAW	50
3.8	Análise Estatística.....	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Análise do plasma DBD.....	51
4.1.1	Caracterização Térmica do Plasma	51
4.1.2	Caracterização Elétrica do Plasma DBD.....	52
4.1.3	Caracterização Óptica do Plasma DBD.....	54
4.2	Análise da água e meios de cultura	56
4.2.1	Caracterização Físico-química da PAW	56
4.2.2	Caracterização físico-química dos meios de cultura ativados por plasma (PAM)	59
4.3	Análise da composição química da PAW e dos PAMs.....	65
4.3.1	Estudo da uniformidade do plasma e da contaminação dos eletrodos nos diferentes poços tratados contendo água deionizada	65
4.3.2	Identificação dos espectros UV-Vis da PAW	66
4.3.3	Efeitos do tempo de envelhecimento sobre a química da PAW	68
4.3.4	Análise dos espectros UV-Vis do meio DMEM tratado por plasma.....	69
4.3.5	Análise dos espectros UV-Vis do meio RPMI tratado por plasma	70
4.3.6	Análise das RONS na PAW e nos PAMs.....	72
4.4	Ensaio de Citotoxicidade.....	75
4.4.1	Ensaio Direto.....	76
4.4.2	Ensaio Indireto.....	77
4.4.3	Comparação entre os ensaios diretos e indiretos.....	78
4.5	Mecanismos de ação dos tratamentos direto e indireto	80
4.5.1	Mecanismo de Ação do Tratamento Direto	80
4.5.2	Mecanismo de Ação do Tratamento Indireto	81

5	CONCLUSÃO.....	83
6	TRABALHOS FUTUROS.....	85
7	REFERÊNCIAS.....	86

1 Introdução

1.1 Contextualização

O câncer, uma das principais causas de mortalidade global, recebe consideráveis investimentos em pesquisa científica em todo o mundo. Apesar dos avanços financeiros significativos, as estratégias tradicionais de tratamento têm demonstrado pouca evolução. Essa lacuna ressalta a urgência em desenvolver novas técnicas que não apenas melhorem a expectativa de vida e a qualidade de vida dos pacientes, mas também a eficácia dos tratamentos. (1,2)

Nesse contexto, o Plasma Frio Atmosférico (CAP, do inglês "Cold Atmospheric Plasma") emerge como uma promissora abordagem terapêutica. (3,4) Caracterizado por um baixo nível de ionização e um estado de desequilíbrio térmico, o CAP assume diferentes configurações, incluindo o jato de plasma, a descarga de arco deslizante e a descarga de barreira dielétrica (DBD), de volume (VDBD) ou de superfície (SDBD). (4,5) Esta última tem sido extensivamente estudada e aplicada em diversos campos científicos e tecnológicos pelas vantagens que ela possui frente às demais. A combinação de segurança, eficácia, versatilidade e economia, torna-a uma escolha superior para uma ampla gama de aplicações biomédicas. (6) Esta abordagem envolve a geração de um plasma produzido pela descarga entre dois eletrodos, separados por um material dielétrico, quando a voltagem supera a barreira dielétrica. A capacidade da DBD de operar em condições de pressão atmosférica e baixas temperaturas a torna particularmente atraente para uma variedade de aplicações, desde processos de esterilização até o tratamento de líquidos e células. (7) Além disso, a SDBD é reconhecida por sua eficiência energética e natureza planar, o que assegura a uniformidade do tratamento. (6)

Dentre as características do sistema DBD, o processo de tratamento de células cancerígenas atrai bastante atenção da comunidade científica e vem aumentando o número de pesquisas relacionadas ao longo dos últimos anos com um número ainda reduzido e recente de pesquisas. Isso se dá devido à sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) que podem induzir a morte celular em células tumorais de maneira seletiva e eficiente. (8–10) Estudos demonstram que o uso de plasma DBD pode promover apoptose e necrose em diversos tipos de células cancerígenas, além de influenciar positivamente o microambiente tumoral, tornando-o uma abordagem promissora para terapias anticâncer. (11–13)

Além disso, o plasma pode afetar o microambiente tumoral, alterando fatores como a angiogênese e a resposta imunológica, potencialmente dificultando o crescimento e a disseminação do tumor. A complexidade dessas interações e os múltiplos alvos dentro da célula

e do microambiente tumoral fazem com que o entendimento completo dos mecanismos envolvidos ainda seja um desafio para os pesquisadores. (3,13) Compreender se o mecanismo de ação do plasma na interação celular é governado pela radiação UV ou espécies carregadas predominante existentes na aplicação direta, ou RONS, predominantes na aplicação indireta, é fundamental para otimizar a abordagem terapêutica no tratamento do câncer. (14) Cada um desses componentes do plasma pode ter diferentes efeitos sobre as células tumorais e o microambiente tumoral. (13,15,16) A radiação UV, por exemplo, pode induzir danos diretos ao DNA, levando à apoptose ou necrose das células cancerígenas. As espécies carregadas, como íons e elétrons, podem causar danos às membranas celulares e desencadear uma série de eventos intracelulares que resultam na morte celular. (17)

RONS são particularmente importantes, pois têm a capacidade de oxidar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, causando danos extensivos e desencadeando vias de sinalização que promovem a morte celular. Entender qual desses componentes do plasma desempenha o papel mais crítico pode ajudar a desenvolver estratégias mais eficazes e específicas para a terapia com plasma, potencializando seus efeitos anticancerígenos enquanto minimiza os danos colaterais aos tecidos saudáveis. (18)

Portanto, a investigação detalhada sobre a contribuição relativa da radiação UV, espécies carregadas e RONS, no mecanismo de ação do plasma é essencial para a implementação de tratamentos mais seguros e eficazes. Este conhecimento pode guiar o ajuste dos parâmetros do plasma, como a intensidade e a duração do tratamento, para maximizar a eficácia terapêutica. (19)

Em testes *in vitro*, os ensaios de viabilidade celular são realizados em poços de cultura de células. Geralmente, para investigar a resposta das células a uma determinada condição, esse processo é conduzido individualmente em cada poço. O processo simultâneo nos poços de cultura de células oferece diversas vantagens em comparação com o tratamento individual de cada poço, incluindo eficiência, consistência, redução do risco de contaminação, padronização dos procedimentos, otimização dos recursos e escalabilidade. Essas vantagens tornam essa abordagem especialmente atraente para experimentos em larga escala, ensaios de alto rendimento e outras aplicações que exigem alta produtividade e confiabilidade dos resultados. Neste estudo, será utilizado um sistema multipontos de descarga DBD de superfície para aplicação simultânea em 24 poços de cultura, a fim de investigar a viabilidade celular de células cancerígenas da linhagem B16F10, em comparação com células saudáveis da linhagem L929.

1.2 Objetivos Gerais e Específicos

Conforme a contextualização do trabalho na **Seção 1.1**, define-se o objetivo central do presente trabalho, o qual estudar o tratamento de Células Cancerígenas B16F10 (Câncer Murino) utilizando um DBD de superfície. Dessa forma, os objetivos específicos do trabalho são definidos como sendo:

- Caracterização Óptica do Plasma DBD utilizando Espectroscopia Óptica de Emissão (OES) e caracterização Elétrica do Plasma DBD utilizando Osciloscópio;
- Caracterização do meio de cultura RPMI e DMEM a fim de analisar parâmetros físico-químicos, como pH, ORP, TDS e Condutividade elétrica em função do tempo;
- Avaliar a inativação celular, utilizando diferentes tempos de exposição do plasma DBD sobre a cultura celular de linhagens B16F10 e L929: 1, 2 e 3 minutos, de maneira direta e indireta;
- Verificar a viabilidade celular 24h e 48h após a exposição ao Plasma DBD através do Ensaio MTT.

1.3 Estrutura da Dissertação

Esta dissertação encontra-se estruturada em 6 capítulos.

O Capítulo 2, "Revisão Bibliográfica", trata de forma detalhada sobre plasmas atmosféricos, ativação de líquidos com plasma, câncer e os tratamentos atualmente existentes. Sendo a seção de plasmas responsável por trazer informações sobre plasmas frios gerados em pressão atmosférica, bem como introduzir suas características e configurações existentes. Já a seção que trata de câncer, visa elucidar como a doença funciona, quais abordagens atualmente existentes para o tratamento da mesma e como o plasma atmosférico é uma alternativa a ser estudada como uma forma de tratamento.

No Capítulo 3, "Materiais e Métodos", constam todas as etapas utilizadas no presente trabalho, bem como toda a metodologia utilizada, os equipamentos e materiais necessários e as técnicas de execução. Além disso, no Capítulo 4, "Resultados e Discussão", trazem os principais resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho através da metodologia descrita pelo Capítulo 3, de modo a demonstrar, interpretar e desenvolver

argumentos por meio dos resultados alcançados. Assim, o Capítulo 5, “Conclusão”, busca trazer à tona observações obtidas ao longo dos resultados encontrados no Capítulo 4.

Por fim, o Capítulo 6, “Trabalhos Futuros”, traz perspectivas futuras sobre próximos trabalhos a serem realizados a partir dos resultados desta dissertação, seguido, por fim, do Capítulo 7, denominado “Referências Bibliográficas”

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Plasma Atmosférico

2.1.1 Plasma

O plasma, um estado da matéria composto por partículas eletricamente carregadas, foi conceitualizado por Irving Langmuir, que observou semelhanças entre os líquidos iônicos, relatados pela biologia como plasma sanguíneo, e os gases ionizados. Assim, popularmente conhecido como quarto estado da matéria, pelo fato de possuir características distintas dos três estados clássicos da matéria, o plasma é fisicamente descrito como um gás parcialmente ou totalmente ionizado, podendo ressaltar que não ocorre transição de fase de um gás para um plasma. Além disso, outra característica importante do plasma é seu estado de quase-neutralidade, onde a densidade de partículas carregadas positiva e negativamente é aproximadamente igual. (4,20)

Um parâmetro relevante na análise de um plasma é a temperatura das partículas, com destaque para a temperatura dos íons (T_i), que é aproximadamente igual à temperatura do gás de operação (T_g), ou seja, $T_i \approx T_g$, e a temperatura dos elétrons (T_e). Plasmas com grau de ionização (α) $\ll 1$, normalmente entre 10^{-4} e 10^{-2} , são considerados plasmas frios, também conhecidos como plasmas fracamente ionizados. Plasmas com α em torno de 0,1 são chamados de plasmas térmicos, enquanto plasmas com $\alpha = 1$, gás completamente ionizado, sem presença de espécies neutras, são classificados como plasmas quentes ou completamente ionizados. Essa classificação é exclusivamente baseada em α . Em relação às temperaturas dos íons e elétrons, o plasma pode estar em equilíbrio térmico ($T_e \approx T_g \approx T_i$), também chamado de equilíbrio termodinâmico, ou fora desse equilíbrio ($T_e \gg T_g \approx T_i$), podendo ser referido como plasma não térmico. (4,20–24)

Outro parâmetro fundamental para descrever o plasma é a densidade de partículas, na qual é utilizada para quantificar a densidade de íons, representados por n_i , incluindo cátions e ânions; elétrons, representados por n_e ; e a densidade total do plasma: n_p . No plasma, as partículas neutras se movem aleatoriamente em todas as direções, enquanto as partículas carregadas se movem à deriva devido à influência de um campo elétrico, caracterizando, assim, um movimento Browniano. Assim, quando as densidades de todas essas partículas são semelhantes ($n_p \approx n_i \approx n_e$), o plasma é caracterizado como estando em um estado de quase-equilíbrio elétrico. (21,22,24,25)

Plasmas constituem aproximadamente 99% da matéria no universo observável, como nebulosas, estrelas, ventos solares. Além disso, os plasmas também ocorrem naturalmente no

ambiente terrestre, como em relâmpagos e auroras boreais, bem como podem ser gerados artificialmente em ambiente laboratorial, através de descargas elétricas em gases. Diante disso, classificar a diversidade de tipos de plasmas que existem na natureza ou que podem ser gerados artificialmente abrange uma ampla gama de variedades. (4,20,23)

Com isso, o plasma pode ser classificado como quente ou frio, levando em consideração seu grau de ionização; térmico ou não-térmico, quanto à temperatura de elétrons; e como eletropositivamente ou eletronegativamente carregado. Ademais, quanto a seu equilíbrio térmico, podem ser descritos os plasmas frios como os de equilíbrio térmico e não-equilíbrio térmico, onde há baixo grau de ionização e os plasmas quentes, em seu alto grau de ionização. (23,24,26)

2.1.2 Plasma Frio Atmosférico

Plasma Frio Atmosférico (CAP), também conhecido como Plasma de Pressão Atmosférica Não Térmico (NTAPP) traz uma gama de vantagens e oportunidades para o campo da pesquisa. Sua versatilidade é notável, abrangendo campos diversos como biologia, medicina, materiais e física, que vão desde aplicações biomédicas, inativação de células e bactérias, até processamento de materiais e tratamento de superfícies. O CAP possibilita investigações detalhadas sobre as interações entre o plasma e uma variedade de materiais em condições ambientais, sem a necessidade de vácuo. Outrossim, o CAP apresenta uma abordagem sustentável para diversas aplicações, promovendo benefícios ambientais e para a saúde humana, além de possuir uma grande vantagem quanto seu relativo baixo custo de fabricação, sendo possível facilitar a redução de gastos pelo orçamento frente aos gastos de tratamentos convencionais na área da saúde. (4,5,27–29)

Uma característica relevante dos plasmas são suas diversas formas de geração, em variadas configurações. Mesmo que grande parte da matéria existente no universo seja plasma, a geração de plasma em pressão atmosférica pode ser dada por diferentes configurações e geometrias, podendo ser alimentada de variadas maneiras, como micro-ondas, corrente alternada (AC) e corrente contínua (DC). (27)

Dentre suas configurações, vale ressaltar as Descargas do tipo Corona, Descarga de Arco Deslizante, Jatos de Plasma de Pressão Atmosférica (APPJ), Descargas de Micro-ondas e Descarga por Barreira Dielétrica (DBD). (5)

2.1.2.1 Descarga Corona

Denominado de Corona devido à analogia feita pelo seu formato semelhante ao de uma coroa, as Descargas Corona são descargas autossustentadas, caracterizadas pela presença de um brilho luminoso concentrado no espaço ao redor de um eletrodo pontiagudo em um circuito elétrico sujeito a um campo elétrico altamente não uniforme, podendo ser considerada de brilho positivo, negativo ou de alta frequência, de forma a depender do campo elétrico, da polaridade dos eletrodos e da distribuição de potencial. (30–32)

A Descarga corona possui uma baixa densidade de corrente elétrica, além de ser uma descarga heterogênea. Dentre suas configurações, as mais comuns incluem arranjos de ponta-superfície, fio-superfície ou cabo coaxial em torno de um cilindro. (32,33)

Assim como os demais tipos de plasma, a descarga corona possui vantagens e desvantagens, podendo citar como desvantagem a perda de energia, bem como sua não uniformidade para tratamentos de superfícies. Por outro lado, a vantagem em sua utilização está em sua alta densidade de elétrons, assim como o alto volume de descarga. Além disso, esse tipo de descarga apresenta diversas aplicabilidades, como: síntese química, tratamento de superfícies, aplicações ao biodiesel e precipitação eletrostática. (30–34)

2.1.2.2 Descarga de Arco Deslizante

A Descarga de Arco Deslizante (Gliding Arc) é um sistema de Plasma Frio Atmosférico que opera em regime transiente, também conhecido como plasma "morno" devido a esse caráter transitório. Este sistema consiste em uma descarga elétrica formada entre dois eletrodos metálicos divergentes, separados em uma de suas extremidades por uma curta distância, comumente entre 1 e 3 mm, sendo um fluxo de gás de alta velocidade introduzido entre os eletrodos durante a operação. Esses sistemas geralmente operam em pressões atmosféricas ou superiores, alcançando potências de até 40 kW e funcionando em altas tensões, tipicamente entre 0,5 e 10 kV. Ainda sim, uma variedade de gases pode ser utilizada para sua operação, incluindo ar úmido, argônio (Ar), oxigênio (O₂), nitrogênio (N₂), hidrogênio (H₂), metano (CH₄) e outros. (35–38)

O funcionamento do Gliding Arc é caracterizado por três etapas distintas: a ruptura do gás, a fase de regime térmico e a fase de regime não-térmico, como demonstrado na **Figura 1**.

- **Ruptura do Gás:** Um campo elétrico de intensidade adequada tem o poder de iniciar a ruptura do gás, iniciando assim a formação do arco elétrico entre os eletrodos. É possível determinar o tempo de formação do arco (τ_i) com base na equação de concentração de elétrons.

$$\frac{dn_e}{dt} = k_I n_e n_g = \frac{n_e}{\tau_i}$$

Eq. 1

onde, t é o tempo em s e k_I é a constante de ionização.

- **Regime Térmico:** Após a formação do arco elétrico com uma estabilidade adequada, ele flui por meio do movimento convectivo entre os eletrodos, com uma velocidade próxima à velocidade de injeção do gás. Nesse estágio, o sistema atinge um regime térmico, caracterizado pelo equilíbrio termodinâmico. À medida que os arcos são produzidos em distâncias cada vez maiores entre os eletrodos, a tensão do arco aumenta proporcionalmente à separação entre eles. Esse regime permanece enquanto a coluna de plasma atinge um determinado comprimento (l), até alcançar um comprimento crítico ($l_{\text{crítico}}$), momento em que ocorre a transição para o regime não-térmico.
- **Regime não-térmico:** o regime não-térmico é atingido quando a perda de energia na coluna de plasma excede a energia fornecida pela fonte de alimentação, interrompendo o equilíbrio termodinâmico. Nesta fase, a descarga elétrica persiste até que a distância entre os eletrodos seja grande o suficiente para impedir a formação do arco elétrico entre eles. Assim, a descarga é interrompida e reiniciada com a ruptura do gás, resultando em um ciclo de descarga ou em uma descarga não estacionária.

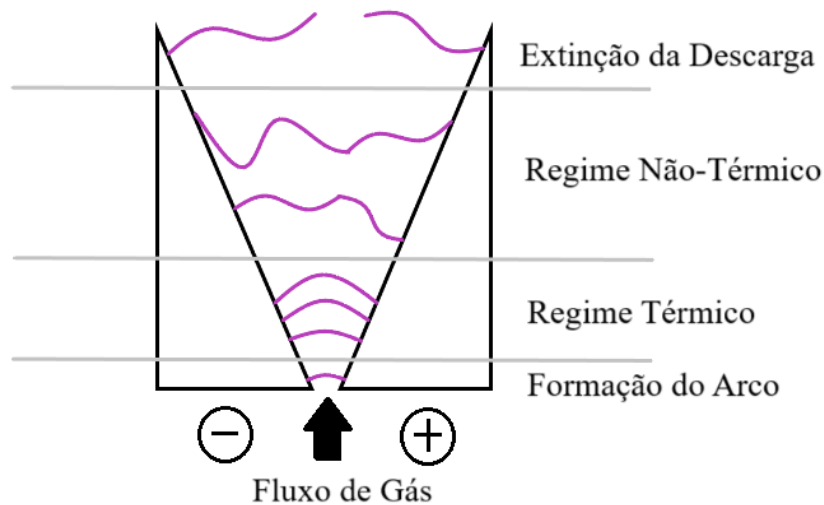


Figura 1 – Regime transiente da descarga de arco deslizante em função da distância de separação dos eletrodos.

2.1.2.3 Jatos de Plasma de Pressão Atmosférica (APPJ)

O Jatos de Plasma de Pressão Atmosférica (APPJ) é gerado através de dois eletrodos concêntricos pelos quais um gás flui. Esse gás é confinado entre os eletrodos e, quando uma tensão suficientemente alta é aplicada ao sistema, ocorre a ruptura do gás, resultando em uma descarga elétrica. Esta descarga é então impulsionada para a atmosfera pelo fluxo gasoso, conferindo ao jato sua forma característica. Porém, é importante destacar que o jato de plasma não é uma descarga elétrica por si só, mas sim uma forma de manifestação de outros tipos de descarga, como a descarga glow ou DBD. (19,33)

A tensão da descarga é dependente de dois fatores: o gás utilizado e o intervalo da descarga, ou seja, a distância entre o ânodo e cátodo. Além disso, cabe ressaltar que a energia térmica é um fator importante do APPJ, sendo determinada pela energia elétrica. (33)

Assim como outros tipos de plasmas, o APPJ possui vantagens e desvantagens. Logo, pode-se citar que a principal desvantagem sobre os APPJs é sua pequena capacidade de tratar ou revestir áreas mais amplas, fazendo com que esse tipo de plasma seja utilizado para tratamentos em áreas pontuais. Por outro lado, essa característica, quando necessária para pequenas áreas, pode ser considerada uma vantagem. Ademais, outra vantagem a ser citada é sua eficácia para processamentos de materiais, bem como para materiais sensíveis a danos térmicos. (19,33)

Outra característica na qual vale ressaltar são suas diversas aplicabilidades, sendo uma de grande destaque na área biomédica, atuando na ativação de líquidos para esterilização de superfícies e inativação de microorganismos; em adição, também se destacam a deposição de revestimentos e o tratamento de modificação de superfícies. (7,19,33)

2.1.2.4 Descarga de Barreira Dielétrica

Utilizado de forma pioneira por Werner Von Siemens, em 1857, a Descarga por Barreira Dielétrica (DBD) é uma configuração de plasma comumente utilizada que consiste em uma descarga autossustentada através de um arranjo de 2 eletrodos metálicos com um dielétrico entre eles. Neste cenário, uma corrente elétrica é aplicada entre os eletrodos, enquanto o dielétrico atua como uma espécie de barreira que impede a descarga direta entre eles. Com isso, a origem da descarga se dá por meio de microdescargas filamentosas, que se dispersam de forma aleatória no espaço e no tempo. Nesse contexto, o dielétrico desempenha o papel de distribuir essas microdescargas na superfície do eletrodo. Além disso, a quantidade de microdescargas é diretamente proporcional à tensão aplicada ao sistema. (39–42)

As configurações e princípios dos DBDs são definidos pela presença de material isolante ao longo do trajeto da descarga. Com isso, normalmente são utilizados materiais dielétricos como cerâmica, vidro, teflon, entre outros. Sendo que a escolha do material da barreira é importante, levando em consideração os efeitos de ionização, carregamento e penetração em superfícies. (39–41,43,44)

O DBD apresenta diversas aplicações possíveis. Dentre estas, destacam-se: geração de ozônio, tratamento de superfícies, processamentos de materiais, tratamento de células cancerígenas, aplicações na odontologia e o tratamento e ativação de líquidos. (28,39,41,45)

Assim, a eficiência da DBD está diretamente relacionada com as condições de descarga, como tensão aplicada, largura do intervalo, forma de onda da fonte, superfície e material do eletrodo, parâmetros temporais, como o tempo de exposição, bem como configuração geométrica do mesmo, podendo variar de incontáveis maneiras. (40,41,46)

Comparada aos jatos de plasma, a configuração DBD oferece a vantagem de proporcionar tratamentos homogêneos em áreas superficiais maiores, abrangendo vários centímetros, e volumes de líquido mais significativos. (46)

Desse modo, o sistema DBD apresenta uma série de vantagens, como seu modo de operação, no qual não necessita de um sistema de vácuo, bem como opera em pressão e temperatura ambiente, além de suas inúmeras configurações geométricas, podendo atender a necessidades específicas de largura e comprimento. (41)

Dentre as diversas configurações do DBD, as principais são as descargas de volume (VD), visto na **Figura 2** e descarga de superfície (SD), demonstrado na **Figura 3**. Sendo assim, de modo a formar um plasma de volume bem definido e uniforme, o VD é formado por uma descarga onde o volume gasoso é confinado entre eletrodos. (40,47)

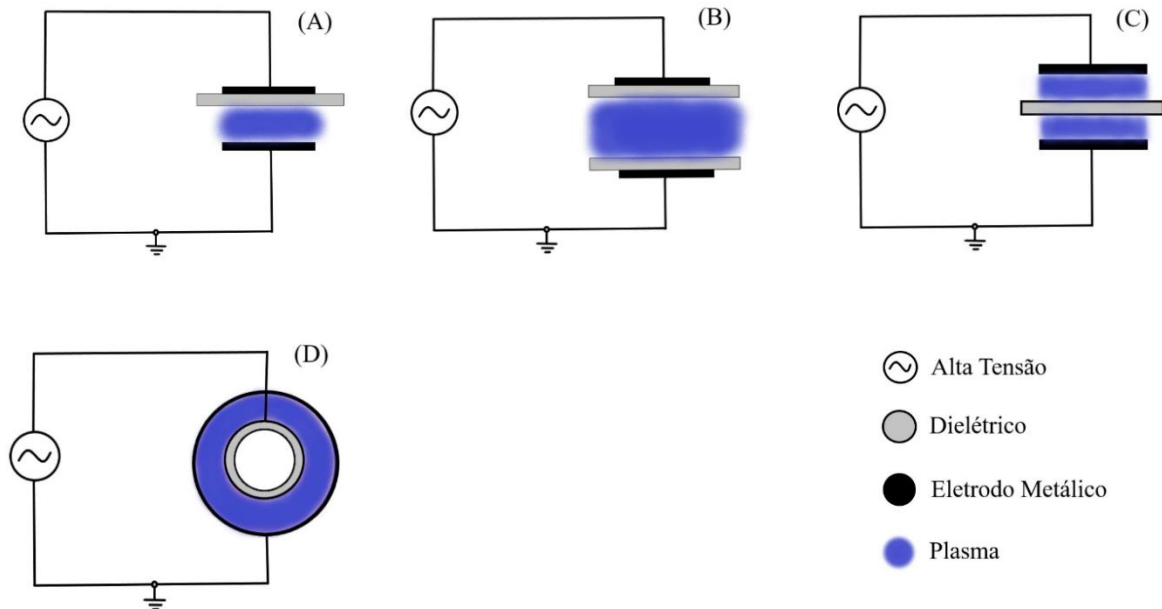


Figura 2 – Configurações do DBD de Volume: (A) Descarga Assimétrica, (B) Descarga Simétrica, (C) Descarga Flutuante, (D) Descarga Cilíndrica.

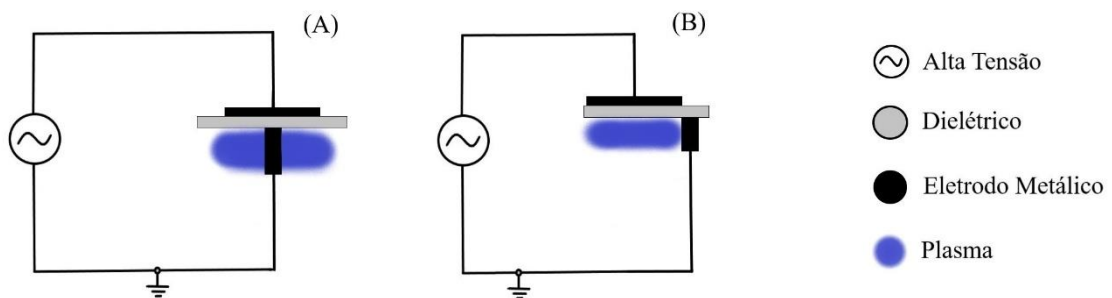


Figura 3 – Configurações do DBD de Superfície: (A) Descarga Simétrica e (B) Descarga Assimétrica.

Por fim, assim como os demais tipos de plasma citados acima, o DBD destaca-se em suas aplicações diversas, sendo elas: tratamento de superfícies, geração de ozônio, processamento de materiais, tratamento de líquidos, deposição por vapor químico, dentre outros. (35,39–42,46)

2.2 Ativação de Líquidos com Plasma

2.2.1 Processo de Ativação

A ativação de líquidos por plasma envolve expor o líquido desejado ao plasma durante um determinado período. Porém, antes de discorrer sobre o tema, deve-se antentar para um erro constantemente ocorrido quanto aos termos “tratamento” e “ativação”, uma vez que estes são processos distintos. (28,29)

O tratamento da água refere-se à utilização do plasma para remover compostos orgânicos e resíduos poluentes, bem como a descontaminação da mesma. Assim, o tratamento da água tem por objetivo purificar, restaurando a qualidade da água. Por outro lado, a ativação da água visa atribuir e melhorar propriedades físico-químicas a fim de utilizar a água para interação com superfícies, células, bactérias ou fungos. Tal diferença é demonstrada na **Figura 4**. (28,29,44,48)

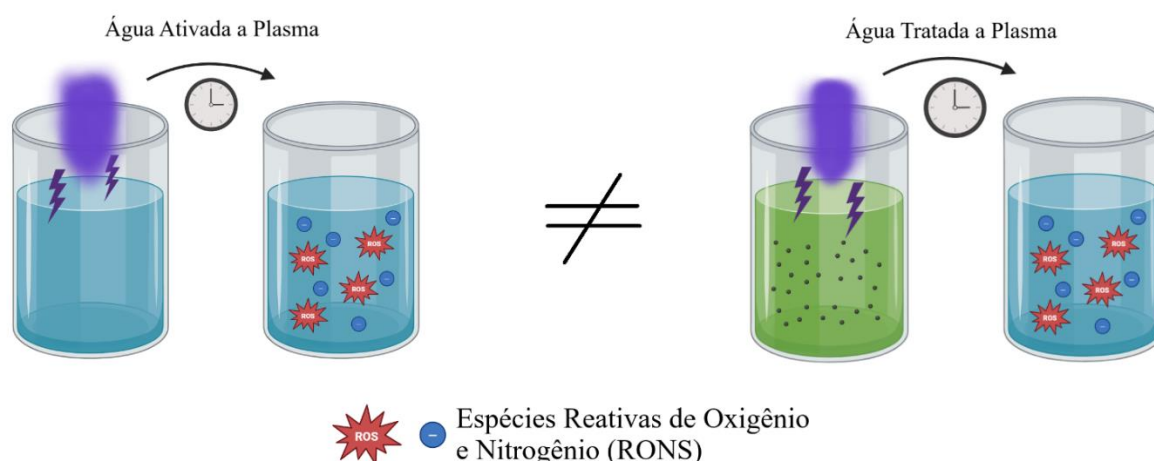


Figura 4 – Diferença entre Água Ativada a Plasma e Água Tratada a Plasma.

Quando as amostras entram em contato com o volume de plasma na área de descarga, ocorre uma interação entre os componentes do plasma, como a radiação UV e as espécies químicas reativas, e as próprias amostras. Esse contato direto permite uma interação eficaz entre as denominadas Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (RONS) e o líquido em questão. A efetividade dessa interação depende diretamente de uma série de fatores controlados, como: distância entre o eletrodo e a amostra, tempos de exposição, material do eletrodo, tensão e frequência aplicados e inúmeros outros parâmetros. (26,28,29,40,41,49)

2.2.2 Água Ativada a Plasma (PAW)

A Água Ativada por Plasma, do inglês *Plasma Activated Water* (PAW) tem ganhado destaque na pesquisa devido às suas propriedades únicas. A PAW pode ser produzida através

da ativação de água como matriz de ativação (água filtrada, água de torneira, água mineral, água destilada ou água deionizada), resultando em uma solução rica em RONS. Além disso, a PAW possui aplicações em diversas áreas, podendo ressaltar: aplicações biomédicas e médicas, odontologia, agricultura, tratamento de alimentos e desinfecção de superfícies. (3,28,29,50)

Com isso, muitas dessas aplicações são atribuídas as características da PAW de reagir com o meio em que é aplicada, muitas vezes atribuindo essa função às espécies de vida longa. Porém, cabe ressaltar que espécies de vida curta também possuem elevada atividade antimicrobiana, podendo auxiliar nestas reações, como o ácido peroxinitroso e o íon peroxinitrito. (51,52)

Quanto à química da PAW, este campo refere-se a sua composição, sendo dependente da natureza do plasma utilizado, bem como o tempo de sua interação com o líquido em questão. São levados em consideração a reatividade das espécies no líquido, assim como seu tempo de vida e solubilidade. (53,54)

Ademais, a química da PAW é dominada pela formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como H_2O_2 , O_3 , NO , NO_2 , e $ONOO^-$. Essas espécies são geradas pela interação do plasma com as moléculas de água e os gases dissolvidos na água. A produção de RONS, incluindo peróxido de hidrogênio, ozônio e radicais hidroxila, é fundamental para a atividade antimicrobiana da PAW. Essas espécies podem penetrar nas membranas celulares microbianas, causando danos oxidativos que levam à morte celular. (3,28,29)

As espécies presentes no sistema desempenham um papel fundamental, pois a química do plasma e a PAW são responsáveis por alterações significativas nos parâmetros físico-químicos, como pH, potencial de oxirredução (ORP), condutividade elétrica e total de partículas dissolvidas (TDS), além de influenciar diretamente a funcionalidade da PAW. A redução do pH da PAW, por exemplo, está relacionada ao aumento dos ácidos nítrico (HNO_3) e nitroso (HNO_2). ORP, condutividade e TDS dependem das espécies presentes e suas concentrações. A atividade reativa da PAW em processos de inativação microbiana deve-se à presença de espécies reativas de vida curta e longa, especialmente as RONS. (3,22,55,56)

Quanto as espécies citadas, é possível classificá-las quanto ao seu tempo de vida, podendo ser de vida curta ou vida longa, e quanto a sua formação, sendo espécies originais, primárias ou secundárias. Sendo assim, as espécies de vida curta são espécies que possuem um tempo de vida da ordem de femtomsegundos (10^{-15} s) até segundos. Por outro lado, espécies de vida longa podem apresentar tempo de vida da ordem de minutos, podendo chegar a dias. (28,50,53,57)

Contudo, cabe ressaltar que mesmo a água deionizada utilizada como matriz de ativação para a PAW sendo considerada um líquido com o maior número de estudos dedicados na literatura, uma vez que sua composição é considerada simples, garantindo reprodutibilidade e facilitando sua caracterização, por limitar o número de reações químicas, a PAW ainda apresenta limitações. Essas limitações podem ser atribuídas ao complexo estudo da formação e geração de espécies reativas e a dificuldade na compreensão do mecanismo de ação da PAW em determinadas áreas. Logo, mesmo que seja um objeto de estudo relativamente simples de se reproduzir, quando comparado a outros líquidos como os PAM's, a PAW ainda oferece grandes desafios a serem superados. (3,22,58)

2.2.3 Meio Ativado a Plasma (PAM)

Com resultados que vem ganhando a atenção científica, o meio ativado a plasma, do inglês *Plasma Activated Medium* (PAM), consiste no produto da ativação de um determinado meio de cultura de células, seja ele o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute) ou outro meio de interesse, no qual é exposto durante determinado tempo, trazendo para o PAM propriedades físico-químicas interessantes no campo da medicina, como a presença de RONS. (14,49,59)

De modo geral, a geração de PAM está muito ligada aos estudos sobre a utilização de plasma para o tratamento de células cancerígenas, uma vez que o mesmo é exposto ao plasma e colocado em contato com as células, a fim de ativar a cascata apoptótica destas células, denominado tratamento indireto. Além disso, estudos demonstram que, além do tratamento direto do CAP em células e tecidos, a utilização do tratamento indireto utilizando PAM tem demonstrado certa eficiência em atividade antitumoral em diversos tipos de câncer, como de ovário, colorretal e melanoma. (60,61)

Ainda neste cenário, relatos da indução apoptótica em células cancerígenas após exposição ao PAM são relatadas e demonstradas através de ensaios de análise morfológica e de viabilidade celular 24h após o primeiro contato. Com isso, pode-se citar que a PAM modula a progressão do ciclo celular e o acúmulo intracelular de RONS em células cancerosas e induz autofagia de células e, não somente, a PAM demonstrou ser capaz de reduzir significativamente tumores xenoenxertados em modelos murinos com modelos de câncer de ovário e pâncreas. (61,62)

Em adição, o PAM também é relatado na literatura como um excelente método de tratamento por sua seletividade às células cancerígenas, uma vez que, quando em contato com células saudáveis, não se demonstrou citotóxico. (46,61,63–65)

Contudo, mesmo que a PAM seja amplamente citada como uma ótima e promissora opção de inibição tumoral, a complexidade da composição química das soluções geradas por plasma, juntamente com sua reatividade e estabilidade, não apenas representa um desafio, mas também são a razão de líquidos ativados a plasma serem temas recentes na história, bem como abordagens ainda pouco aprofundadas e compreendidas. (3,46,62,64,65)

2.2.4 Meio de Cultura Celular

Meios de cultura, ou meios de cultivo, são preparações compostas por um conjunto de substâncias que promovem o desenvolvimento e crescimento celular. Estes meios podem ser líquidos, semissólidos ou sólidos e contêm constituintes naturais e/ou sintéticos. Cada tipo de meio é formulado para atender às necessidades específicas de diferentes microrganismos (66).

A seleção do meio de cultura é baseada nas necessidades particulares de cada célula ou microrganismo, garantindo o fornecimento dos nutrientes necessários para seu crescimento ideal. Além de promover a multiplicação de microrganismos, os meios de cultura também podem inibir certos microrganismos, identificar ou preservar a viabilidade dos mesmos. No presente trabalho, os meios de cultura selecionados foram o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) e o Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco).

O DMEM foi originalmente sugerido como meio Eagle com uma concentração quádrupla de aminoácidos e vitaminas pelos cientistas Renato Dulbecco e G. Freeman published in 1959. Histologicamente, quando se trata de viabilidade celular e manutenção de meios de cultura, o DMEM pode ou não conter soro bovino fetal, do inglês fetal bovine serum (FBS), o que impacta na degradação celular e biocompatibilidade com o meio de cultura (67).

No meio de cultura DMEM, depreende-se, conforme a **Tabela 1** representada, que tais nutrientes favorecem a nutrição e replicação celular de diferentes linhagens, os aminoácidos influenciam no crescimento celular, a glicose atua como fonte primária de energia tendo em vista sua participação nos diversos processos metabólicos celulares; e o bicarbonato de sódio, como uma solução-tampão, o que estabiliza o pH do meio para que não ocorra desnaturação de enzimas catalíticas necessárias para tais células (68).

O meio conhecido como Roswell Park Memorial Institute (RPMI) ou RPMI 1640 constitui uma formulação empregada em técnicas de cultivo celular de diversas linhagens diferentes, tais como cancerígenas - tumores, e melanomas - e crescimento de linfócitos humanos. Este meio tem sido amplamente adotado para o desenvolvimento de diversas linhagens celulares de mamíferos, bem como para o estímulo do crescimento de linfócitos humanos (69).

Como é possível observar nas **Tabelas 1 e 2**, os meios de cultura utilizados, RPMI e DEMEM, possuem uma rica composição. Ambos contêm componentes como diversos aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, além de D-Glicose, Vermelho Fenol e, no caso do RPMI, Glutaciona.

Tabela 1 – Fórmula do meio de cultura celular DMEM

Componentes	Peso molecular	Concentração (mg/L)	milimoles (mM)
Aminoácidos			
Glicina	75.0	30.0	0.4
L-Arginina hidrocloreídrica	211.0	84.0	0.39810428
L-Cistina 2HCl	313.0	63.0	0.20127796
L-Glutamina	146.0	584.0	4.0
L-Histidina hidrocloreídrica-H ₂ O	210.0	42.0	0.2
L-Isoleucina	131.0	105.0	0.8015267
L-Leucina	131.0	105.0	0.8015267
L-Lisina hidrocloreídrica	183.0	146.0	0.7978142
L-Metionina	149.0	30.0	0.20134228
L-Fenilalanina	165.0	66.0	0.4
L-Serina	105.0	42.0	0.4
L-Treonina	119.0	95.0	0.79831934
L-Triptofano	204.0	16.0	0.078431375
L-Tirosina sal dissódico di-hidratado	261.0	104.0	0.39847642
L-Valina	117.0	94.0	0.8034188
Vitaminas			
Cloreto de colina	140.0	4.0	0.028571429
D-Pantotenato de cálcio	477.0	4.0	0.008385744
Ácido fólico	441.0	4.0	0.009070295
Niacinamida	122.0	4.0	0.032786883
Piridoxina hidrocloreídrica	204.0	4.0	0.019607844
Riboflavina	376.0	0.4	0.0010638298
Tiamina hidrocloreídrica	337.0	4.0	0.011869436
i-Inositol	180.0	7.2	0.04
Sais Inorgânicos			
Cloreto de cálcio (CaCl ₂) (anh.)	111.0	200.0	18.018.018
Nitrato férrico (Fe(NO ₃) ₃ *9H ₂ O)	404.0	0.1	0.00024752476
Sulfato de magnésio (MgSO ₄) (anh.)	120.0	97.67	0.8139166
Cloreto de potássio (KCl)	75.0	400.0	53.333.335
Cloreto de sódio (NaCl)	58.0	6400.0	110.344.826
Fosfato monobásico de sódio (NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O)	138.0	125.0	0.9057971

Outros Componentes			
D-Glicose (Dextrose)	180.0	4500.0	25.0
Vermelho de Fenol	376.4	15.0	0.039851222

Tabela 2 – Fórmula do meio de cultura celular RPMI 1640

Componentes	Peso molecular	Concentração (mg/L)	Milimoles (mM)
Aminoácidos			
Glicina	75	10	0,13333334
L-Arginina	174	200	1,1494253
L-Asparagina	132	50	0,37878788
Ácido L-aspártico	133	20	0,15037593
L-Cistina 2HCl	313	65	0,2076774
Ácido L-Glutâmico	147	20	0,13605443
L-Glutamina	146	300	2,0547945
L-Histidina	155	15	0,09677419
L-Hidroxiprolina	131	20	0,15267175
L-Isoleucina	131	50	0,3816794
L-Leucina	131	50	0,3816794
Cloridrato de L-Lisina	183	40	0,21857923
L-Metionina	149	15	0,10067114
L-Fenilalanina	165	5	0,09090909
L-Prolina	115	20	0,17391305
L-serina	105	30	0,2857143
L-Treonina	119	20	0,16806723
L-Triptofano	204	5	0,024509804
Sal dissódico de L-tirosina di-Hidratado	261	29	0,11111111
L-Valina	117	20	0,17094018
Vitaminas			
Biotina	244	0,2	0,000819672
Cloreto de colina	140	3	0,02142857
D-Pantotenato de cálcio	477	0,25	0,000524109
Ácido fólico	441	1	0,002267573
Niacinamida	122	0,2	0,008196721
Ácido para-aminobenzóico	137	1	0,00729927
Cloridrato de piridoxina	206	1	0,004854369
Riboflavina	376	0,2	0,000531915
Cloridrato de tiamina	337	1	0,002976359
Vitamina b12	1355	0,005	3,69004E-06
I-Inositol	180	35	0,19444445
Sais Inorgânicos			
Nitrato de cálcio (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236	100	0,42372882
Sulfato de magnésio (MgSO ₄) anid.	120	48,84	0,407
Cloreto de potássio (KCl)	75	400	5,3333333
Cloreto de Sódio (NaCl)	58	6000	103,44827
Fosfato de Sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄) anidro	141,96	800	5,63539

Outros Componentes			
D-Glicose (Dextrose)	180	2000	11,111111
Glutaciona (reduzida)	307	1	0,003257329
Vermelho Fenol	376,4	5	0,013287341

2.3 Câncer

Como uma das principais causas de morte a nível mundial, ocupando o segundo lugar, o câncer se origina devido a mutações em genes que desregulam os processos celulares normais. Isso é possível por conta de alterações envolvendo dois tipos de genes: oncogenes, que potencializam o desenvolvimento do tumor, e supressores de tumor, no qual inibem a tumorigênese. (70)

No entanto, apenas uma mutação não é o suficiente para o desenvolvimento do câncer. Para isso, é necessário que várias mutações ocorram sucessivamente até que tecidos normais se tornem lesões. Ademais, vale ressaltar que tais mutações genéticas ocorrem de modo aleatório dentro do genoma, tornando a previsão do câncer impossível, salvo em casos isolados. (70)

A pesquisa sobre o câncer é uma das áreas da ciência mais fortemente financiadas em todo o mundo e, anualmente, milhares de artigos de pesquisa originais sobre o câncer são publicados, demonstrando como essa área tem atraído bastante atenção mundial. (2,71)

2.3.1 Melanoma

Nas últimas décadas, o câncer de pele se tornou um dos tipos de câncer mais comuns no Brasil. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de pele representa cerca de 30% de todos os diagnósticos de câncer no Brasil. A detecção precoce é crucial, pois possibilita um maior controle da doença e aumenta as chances de cura. No entanto, um dos principais desafios enfrentados nos tratamentos quimioterápicos tradicionais é a toxicidade dos agentes quimioterápicos, que podem causar efeitos adversos significativos nas células saudáveis dos pacientes.

O melanoma, tumor originado por um melanócito, no qual é a célula responsável pela pigmentação, é conhecido por sua natureza altamente agressiva e sua característica de ser um tumor extremamente imunogênico, uma vez que, dentre os cânceres, é o que possui a maior taxa de mutações. Os melanomas produzem uma ampla variedade de antígenos tumorais que são reconhecidos pelo sistema imunológico, tornando-os, por este motivo, altamente imunogênicos. Em comparação com outros tipos de câncer, é comum observar uma infiltração linfocítica expressiva no melanoma. (72–74)

Os melanócitos, presentes em sua maioria em células basais da epiderme, são os responsáveis por utilizar a enzima tirosinase para sintetizar a melanina, pigmento responsável pela proteção contra raios UV. Logo, a incidência de melanoma na raça branca, bem como em pessoas de cabelos ruivos ou loiros, com sardas e olhos claros tem uma tendência maior em adquirir este tipo de tumor, uma vez que estas características fazem com que a pele queime em contato com o sol, ao invés de adquirir bronzeamento natural. (70)

Diante disso, o melanoma mostra-se como a principal causa de morte por câncer de pele em todo o mundo, podendo afetar todas as idades, sendo que a idade média de diagnóstico para esta doença fique em torno de 50 anos de idade. (70)

Esse tipo de câncer em seu estágio inicial pode ser tratado com sucesso, tendo como principal abordagem a remoção cirúrgica, com taxas de sobrevivência frequentemente altas. No entanto, quando ocorrem metástases, as taxas de sobrevivência diminuem significativamente. Em caso de melanoma metastático a taxa de sobrevivência de pacientes varia entre 5 e 11 meses, com uma média de 9 meses de sobrevivência. (70,73)

Vale elucidar o comportamento de metástase de um câncer, sendo o processo pelo qual células cancerígenas se disseminam do tumor primário para outras partes do corpo, formando novos tumores secundários. No contexto do melanoma metastático, células cancerígenas invadem tecidos adjacentes e entram na corrente sanguínea ou no sistema linfático, migrando para órgãos distantes como fígado, pulmões, cérebro e ossos. Essas células se estabelecem em novos locais, iniciando o crescimento de novos tumores e dificultando o tratamento. (75,76)

Além disso, para o estadiamento e prognósticos do melanoma, utiliza-se o sistema TNM (Tumor, Linfonodos e Metástase), podendo também ser classificados em estágios, como demonstrado pela **Tabela 3**.

Tabela 3 – Estadiamento para o Melanoma

Estágio	Característica
I e II	Melanoma primário; clinicamente localizado
III	Envolvimento regional (linfonodos ou metástase em trânsito)
IV	Melanoma metastático; linfonodos regionais (pulmão, cérebro, fígado)

Ademais, quanto se tratando do melanoma, a correta identificação e classificação histopatológica como espessura do tumor, ulceração e taxa mitótica são essenciais para a tomada de decisão quanto ao tratamento a ser utilizado. (77)

Com relação a esses últimos três parâmetros, é válido elucidar o significado de cada um. Assim, leva-se em consideração um tumor como uma massa ou crescimento anormal de células que ocorre quando células se dividem e crescem de maneira desordenada, sendo benignos para não cancerosos e malignos para cancerosos. Por sua vez, a ulceração é a formação de uma lesão ou ferida aberta na pele ou em uma membrana mucosa que não cicatriza adequadamente, sendo um indicativo de agressividade do câncer. E, por fim, a taxa mitótica é um indicador da rapidez com que as células tumorais estão se dividindo e proliferando. (70,78,79)

Desta forma, os conceitos de tumor, ulceração e taxa mitótica são fundamentais para a compreensão do comportamento biológico dos cânceres. Tumores malignos, ao se tornarem ulcerados, indicam uma progressão da doença que pode estar associada a um comportamento mais invasivo. A taxa mitótica elevada reforça essa associação com a agressividade, demonstrando que o tumor está em um estado de rápida divisão celular, o que é um fator crítico na determinação do tratamento e prognóstico. (78,79)

2.3.2 Tratamento do câncer

Uma vez diagnosticado com o câncer, é preciso apontar que o tratamento adequado não se faz presente em boa parte dos países menos desenvolvidos. Com isso, a taxa de letalidade da doença nesses países é significativamente alta. (70)

Convém ressaltar que os três principais métodos de tratamento do câncer, cirurgia, radioterapia e quimioterapia, continuam sendo as principais opções de tratamento, mesmo após mais de 60 anos de uso ativo. No entanto, apesar dos avanços significativos na medicina, alguns tipos de câncer ainda apresentam resistência aos tratamentos disponíveis, tornando sua erradicação uma tarefa desafiadora. Certamente, empecilhos para terapias alternativas são enfrentados, como custos exorbitantes, desenvolvimento de resistência dos tumores à terapia, disponibilidade limitada e aplicabilidade restrita à um subconjunto específico. (43,71,80,81)

A abordagem convencional da quimioterapia inclui o uso de agentes citotóxicos, cujo mecanismo de ação reside na capacidade de induzir danos celulares, potencialmente letais para células sensíveis. Tais agentes podem agir tanto por meio da destruição direta das células quanto interferindo no processo replicativo das células em proliferação. No entanto, devido à sua falta de especificidade para células tumorais, esses agentes têm um índice terapêutico limitado,

podendo causar toxicidade significativa em tecidos normais que também estão em processo de proliferação. (71,82)

Por sua vez, a Radioterapia representa a terapia citotóxica mais eficaz disponível para o tratamento de cânceres sólidos localizados. A comprovação do sucesso dessa abordagem é evidente pelo fato de que pacientes com câncer continuam a receber radioterapia mesmo anos após sua invenção, apesar dos avanços em muitas outras modalidades de tratamento. Este tratamento baseia-se na utilização de um procedimento terapêutico localizado e não invasivo que utiliza radiação ionizante para induzir danos ao DNA das células cancerosas. Esses danos podem ocorrer por meio de quebras diretas e indiretas na cadeia dupla do DNA, resultando na interrupção do ciclo celular e na morte das células tumorais. Porém, assim como a quimioterapia, a radioterapia é mais eficiente em células com alta taxa de divisão e que são bastante oxigenadas. (70,83,84)

A imunoterapia, por exemplo, exige atenção especial a diversas ressalvas existentes. Apesar de oferecer benefícios terapêuticos que podem ser duradouros, é importante notar que apenas um subconjunto de pacientes responde positivamente a essa forma de tratamento. (80)

Apesar do sucesso notável do tratamento, é importante reconhecer que, em muitos contextos clínicos, a quimiorradiação frequentemente resulta em um aumento da toxicidade e oferece apenas melhorias modestas nos resultados. Com isso, é evidente que abordagens inovadoras para o tratamento do câncer são urgentemente necessárias. (71,83)

2.3.3 Plasma Frio Atmosférico e sua seletividade para células cancerígenas

O plasma frio atmosférico (CAP) é amplamente utilizado no campo da terapia do câncer. A capacidade do plasma frio de tratar vários tipos de câncer de forma eficaz, matando seletivamente as células cancerosas sem que isso afete os tecidos saudáveis já foi relatada na literatura. (43,45,85)

No entanto, entender o mecanismo por trás desse efeito anticancerígeno seletivo ainda é um desafio para a comunidade científica. Estudos relatam que fatores como o tipo de células e, conseqüentemente, de câncer, além de condições como a configuração de plasma utilizada e sua composição, têm forte influência no tratamento com CAP. (86,87)

Os principais responsáveis atribuídos pela eficácia da inativação celular cancerígena são as Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (RONS), pois estas espécies são aptas a desencadear respostas intracelulares específicas, uma vez que RONS possuem grandes propriedades oxidativas, podendo causar sofrimento ou estresse oxidativo. O que define se o tratamento com plasma irá induzir sofrimento ou estresse oxidativo é relativo à quantidade de

RONs que entram em contato com o alvo biológico, sendo esta contidade dependente do tipo de plasma utilizado e da resposta do sistema biológico em questão. (3)

Em grande parte, as células tumorais são mais sensíveis a estímulos oxidativos externos do que as células saudáveis. Porém, explicar esta suposta sensibilidade aumentada não é um trabalho trivial e, segundo *Woedtke et al.*, existem alguns lados a serem considerados para esta seletividade. (3,87,88)

O primeiro, leva em consideração o aumento do estado estacionário de níveis de ROS em células cancerígenas resultantes de alterações metabólicas. Com isso, a vulnerabilidade das células cancerígenas se dá pelo fato do limiar tóxico ser menor nestas células, quando comparados a células saudáveis. (3)

O segundo, remete à sensibilidade plasmática aumentada em células cancerígenas, explicada por um aumento seletivo de RONS intracelulares causados pelas alterações cancerígenas. Assim, é apontada a membrana celular, na qual funciona como a primeira linha de defesa contra o plasma devido à sua natureza hidrofílica, o que dificulta a difusão direta RONS, tornando-a limitada. No entanto, as aquaporinas, proteínas de canal transmembranar, facilitam a entrada das referidas espécies reativas nas células cancerígenas. Além disso, observa-se que células cancerígenas frequentemente apresentam menor teor de colesterol em suas membranas, tornando-as mais suscetíveis à peroxidação lipídica induzida pelas RONS e à formação de poros adicionais. Esses mecanismos são apontados como contribuintes para a maior sensibilidade das células cancerígenas ao tratamento com plasma, conforme representado pela **Figura 5**. (3)

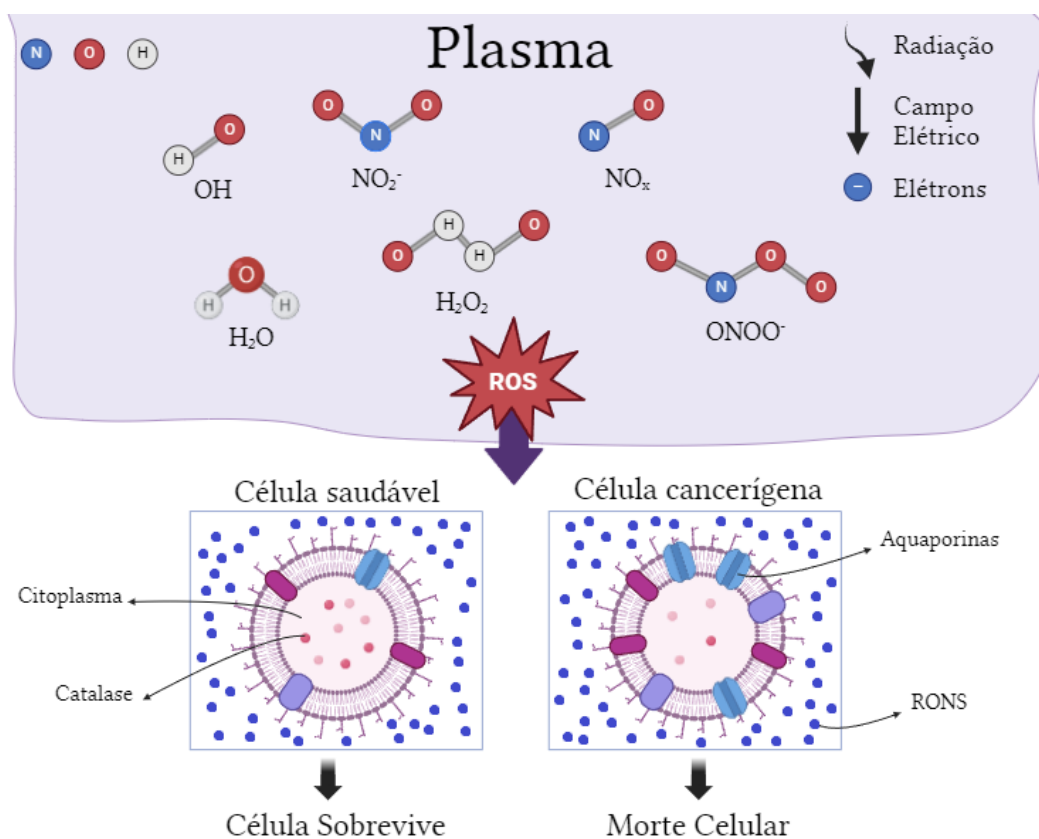


Figura 5 – Esquemática sobre a seletividade do plasma para células cancerígenas.

Ainda sim, vale ressaltar que a constituição do plasma não somente resume-se à RONS. Com isso, fatores como radiação, campos eletromagnéticos e geração de calor devem ser considerados. Porém, quanto ao calor gerado, mesmo que haja um discreto aumento da temperatura do meio, mostra-se não ser o suficiente para a inativação celular. Logo, nota-se que as RONS são o principal indício de responsabilidade por inativação celular, seja por métodos diretos ou indiretos. (85,87)

Além disso, as RONS, quando em contato com as células, estão sujeitas a interação com diversas moléculas, influenciando, assim, processos celulares. Sendo assim, é possível destacar o Cálcio (Ca^{2+}), um importante mensageiro regulador de funções celulares, podendo citar o metabolismo, a expressão genética e a sobrevivência da célula, bem como sua morte programada. (87,89)

Um dos meios de comunicação do cálcio é por meio de ROS, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (HO) e ânions superóxido (O_2^-). Estas moléculas, quando presentes em níveis moderados, significam significativos sinalizadores de processos fisiológicos, como a oxidação de proteínas, lipídios e polinucleolipídios. (89–91)

O Cálcio está presente nas células como um segundo mensageiro, localizado no lúmen do retículo endoplasmático. Este, por sua vez, é um componente celular composto por chaperonas

moleculares, enzimas e altas concentrações de ATP e cálcio. Sua principal função é assegurar o adequado enrolamento e maturação das proteínas, além de atuar como o principal reservatório de cálcio dentro da célula. Distúrbios nesse organelo, conhecidos como estresse do retículo endoplasmático, desencadeiam uma série de reações para restabelecer a homeostase, embora em excesso possam ser prejudiciais às células. Tais distúrbios estão frequentemente relacionados à redução dos níveis de cálcio no lúmen do retículo endoplasmático, causada pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzido pelo tratamento com plasma frio atmosférico (CAP). A perda de cálcio durante o estresse do retículo endoplasmático é mediada por transportadores sensíveis às ROS, permitindo sua liberação para o citosol. Além disso, este estresse acaba desencadeando um aumento de cálcio nas mitocôndrias e, assim, causando uma despolarização do potencial de membrana das mitocôndrias que, por sua vez, libera o citocromo c, ativando a apoptose. (87,89,90,92)

Diante disso, é notório que a homeostase mitocondrial do Ca^{2+} é essencial. Pois, a absorção do cálcio feita pelas mitocôndrias é de grande importância, uma vez que em níveis elevados, o cálcio pode ativar vias de morte celular, como a apoptose. (87,89,92)

Ademais, todos esses mecanismos de ação relatados são observados em células cancerígenas, de forma a não serem citotóxicos para células saudáveis, como demonstrados em diversos estudos. (46,61,63)

Por fim, como estudos recentes têm demonstrado, o tratamento com plasma frio atmosférico é capaz de desencadear múltiplos mecanismos de morte celular, incluindo apoptose e necrose. (43)

2.3.4 Viabilidade e Morte Celular

A morte celular programada, ou apoptose, é um mecanismo de eliminação de células indesejadas do sistema humano. Esse processo é caracterizado pela condensação da cromatina, redução do volume celular e clivagem do DNA. Além disso, envolve a perda de assimetria na membrana fosfolipídica, resultando na exposição de fosfatidilserina - um fosfolípídeo com carga negativa - na superfície da célula. Essa translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo da membrana plasmática é fundamental para que as células apoptóticas possam ser reconhecidas e eliminadas pelos macrófagos. Desta forma, a célula morre de maneira ordenada, sendo rapidamente eliminada, sem que uma resposta inflamatória prejudicial seja causada. (60,93)

Essa morte programada ocorre geralmente quando células são danificadas ou infectadas, sendo assim, uma forma de garantir a saúde do organismo. Além disso, a apoptose também

ocorre com o intuito de manter e desenvolver organismos, como no caso do tamanho de tecidos, por exemplo, no qual necessitam que células morram na mesma taxa em que são produzidas. (60,89)

A apoptose é um processo altamente regulado que é controlado por vias intrínseca, de dentro da célula, e extrínseca, de fora da célula. Destas, é importante ressaltar a via intrínseca, na qual é dependente da mitocôndria. Assim, a célula, quando exposta a estresse, como o dano ao DNA, tem como resposta a liberação de proteínas mitocondriais no citosol, geralmente residentes no espaço interno das organelas e controladas por vias apoptóticas intrínsecas, ou mitocôndrias, causando, assim, a apoptose. (60,89,94)

Com isso, destaca-se o citocromo c, uma proteína-chave na via intrínseca e um importante componente no qual é solúvel em água da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. É o citocromo c um dos responsáveis em ativar a cascata de eventos que levam à morte celular, uma vez que este, quando liberado para o citoplasma, interage com outras proteínas, como a Apaf1, que por sua vez, interage com a caspase-9 iniciadora, que ativam as caspases executoras para induzir a apoptose. Ademais, outra proteína a ser citada é a Bcl2, na qual é responsável por garantir que a célula morra somente quando for necessário, sendo ela a encarregada de liberar o citocromo c no citosol. (89)

Além disso, a morte celular por apoptose não é exclusiva, podendo também ocorrer a necrose. Essa, ao contrário da apoptose, é uma morte desordenada decorrente de lesão celular e provoca um aumento no volume dos organelos celulares, seguido de ruptura da membrana e, por fim, lise da célula, resultando no vazamento do seu conteúdo intracelular para o tecido circundante, causando danos e resposta inflamatória. Outrossim, isso geralmente é ocasionado devido a um dano agudo como, por exemplo, um trauma ou falta de suprimento sanguíneo. (60,89,94)

3 Materiais e Métodos

3.1 Sistema SDBD

O sistema de Descarga de Barreira Dielétrica de Superfície (SDBD) construído utilizou-se de um circuito de cobre impresso no exato formato de uma placa de cultura de 24 poços, de ambos os lados, em uma placa de fibra de vidro para atuar como barreira dielétrica, como demonstrado na **Figura 6**.

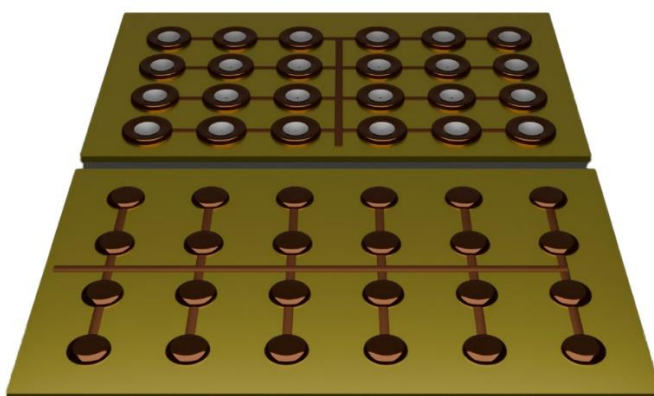


Figura 6 – Visão bilateral do Reator SDBD, apresentando uma placa de fibra de vidro com circuitos impressos em cobre em ambas as faces. O lado contendo círculos de menor diâmetro está conectado ao terminal de terra, enquanto o lado com círculos de maior diâmetro está ligado à fonte de alta tensão.

A placa de fibra utilizada para o sistema possui 13,1cm de comprimento, 9cm de largura e 3mm de espessura. Separados por um dielétrico de 3 mm de espessura, os eletrodos impressos de ambos os lados são de diâmetros diferentes. O lado conectado à Alta Tensão do sistema é composto por 24 eletrodos de diâmetro 16,25 mm, com um círculo em seu interior de diâmetro 10 mm. Já o lado aterrado possui 24 eletrodos de diâmetro 10 mm, de modo que o diâmetro deste eletrodo é exatamente igual ao diâmetro do círculo interior do outro lado do reator, de modo a obter uma matriz de plasma de superfície.

Além disso, é importante ressaltar que os eletrodos maiores são exatamente do mesmo diâmetro dos poços presentes na placa de cultura celular, bem como o reator DBD possui a exata dimensão da placa, para que seja possível um posicionamento preciso do reator, de modo a possibilitar a exposição individual de cada poço ao plasma gerado.

3.2 Caracterização Elétrica do Plasma DBD

O sistema DBD foi acoplado a uma Fonte de Alta Tensão AC Inergiae – Alternis ALT0215, operando à 15kHz de frequência e 5kV de tensão. Assim, a caracterização elétrica do plasma foi conduzida usando um Osciloscópio Keysight – DSOX1202A, com uma ponteira de alta tensão Tektronix - P6015A acoplada para medir a tensão da descarga e uma ponteira Agilent – N2869B com fator de ampliação de 100x para medir a tensão sobre o resistor de 10 Ω . O aparato experimental utilizado para a caracterização elétrica encontra-se na **Figura 7**.

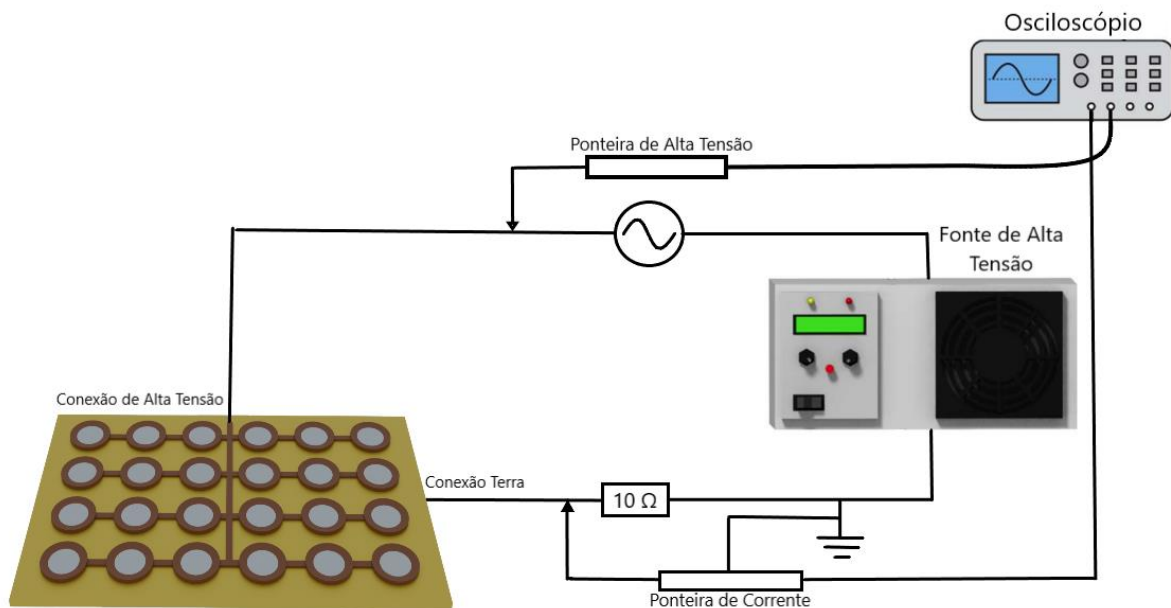


Figura 7 – Aparato experimental para realização da caracterização elétrica.

3.3 Caracterização Óptica do Plasma DBD

Foram realizadas medidas de Espectroscopia Óptica de Emissão (OES) do sistema de plasma utilizando um Espectrômetro Avantes SensLine AvaSpec-ULS-RS-TEC, em um intervalo compreendido entre 200 e 750 nm, utilizando o tempo de integração de 5 s. Ademais, o espectrômetro foi posicionado aproximadamente à 1cm do plasma, de modo a obter-se uma alta densidade óptica.

3.4 Caracterização Térmica do Plasma DBD

Com um sensor de fluxo térmico marca HIOKI, modelo LR8432-20, posicionado a 5 mm de distância do eletrodo, foi medida a temperatura. A temperatura e o fluxo térmico foram medidos durante 4 min a partir do instante que o plasma foi ligado.

3.5 Ensaio de Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Nanomateriais e Nanotoxicologia do ICT UNIFEP, coordenado pela Profa. Dra. Dayane Batista Tada.

3.5.1 Redução do Número de Amostragem

Para garantir a confiabilidade de todos os eletrodos do sistema DBD e reduzir o erro humano, além de obter maior controle nos ensaios microbiológicos realizados, foi decidido por reduzir a amostragem de 24 poços para 10 poços por placa de cultura. Essa decisão foi baseada no vasto número de poços disponíveis para tratamento celular. Com essa redução, é mantida uma amostragem considerável e, ao mesmo tempo, é minimizado o erro humano associado ao grande número de pipetagens, bem como diminui o risco de contaminação. Foi definido as linhas C e D, com colunas de 1 a 5, dos poços correspondentes aos pontos de plasma, como pode ser visto na **Figura 8**.

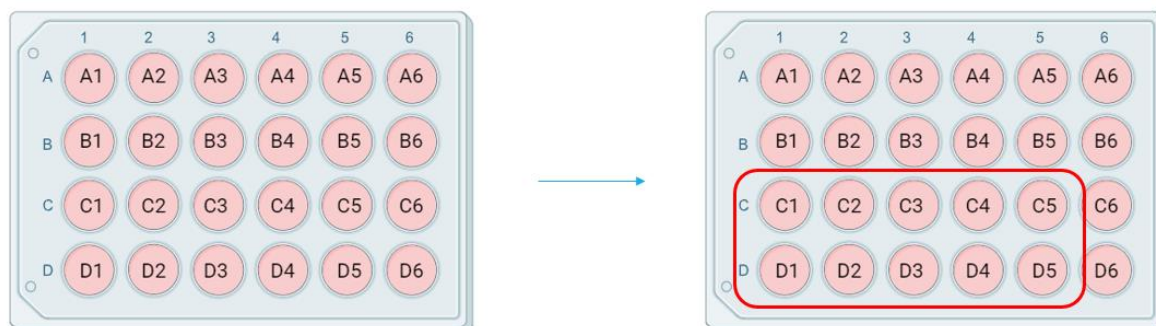


Figura 8 – Esquematização da placa de cultura de 24 poços, demonstrando quais poços foram utilizados para seguir com os ensaios realizados adiante.

A partir de então foi realizada a caracterização físico-química das soluções de meios de cultura RPMI de células tumorais (B16F10) e DMEM de células saudáveis (L929), antes e após ativação por plasma.

3.5.2 Preparação do meio de cultura RPMI

Para cultivo das células B16F10 foi necessário, primeiramente, realizar o preparo do meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI, Gibco), marca Thermo Fisher Scientific. Para isso, foram utilizados frascos autoclavados com água MilliQ, 1 L de água MilliQ para preparo do meio de cultura onde foi diluído 1 frasco em pó de DMEM suplementado com 10% (100 mL) de soro fetal bovino (SFB), 2,0 g de bicarbonato de sódio, 0,1 g de

estreptomicina e 0,025 g de ampicina. Todos esses procedimentos foram realizados em capela com fluxo laminar, utilizando agitador magnético. Em seguida, o meio filtrado para finalização do preparo.

3.5.3 Preparação do meio de cultura DMEM

Para cultivo das células L929 foi necessário, primeiramente, realizar o preparo do meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco), marca Thermo Fisher Scientific. Para isso, foram utilizados frascos autoclavados com água MilliQ, 1L de água MilliQ para preparo do meio de cultura onde foi diluído 1 frasco em pó de DMEM suplementado com 10% (100 mL) de soro fetal bovino (SFB), 3,7 g de bicarbonato de sódio, 0,1 g de estreptomicina e 0,025 g de ampicina. Todos esses procedimentos foram realizados em fluxo laminar, com agitador magnético e filtrado o meio para finalização do preparo.

3.5.4 Contagem de células B16F10

Primeiramente, as células foram retiradas da incubadora e todo o meio de cultura foi removido da garrafa. Em seguida, a garrafa foi lavada com 5 mL de PBS e 3 mL de tripsina foram adicionados para desprender as células aderidas ao fundo. A garrafa foi então colocada na incubadora por dois minutos para facilitar o processo. Após retirar a garrafa da incubadora, ela foi cuidadosamente agitada e as células foram observadas ao microscópio para confirmar que estavam soltas. Em seguida, o conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo Falcon para centrifugação, removendo a tripsina do contato com as células.

Após a centrifugação a 1500 RPM por 5 minutos, as células foram ressuspensas em 5 mL de meio de cultura. Em seguida, 1 mL deste conteúdo foi transferido para um novo tubo Falcon contendo 5 mL de meio de cultura, denominado Tubo 1. Do Tubo 1, foram retirados 90 μ L para a contagem celular utilizando a câmara de Neubauer. A câmara de Neubauer é uma lâmina de vidro com divisões que auxiliam na contagem celular, possuindo 9 quadrados de 1 mm² cada, dos quais apenas quatro quadrados externos são utilizados para a contagem das células.

Para a contagem, foram adicionados 10 μ L de azul de tripan aos 90 μ L de células em meio, levando essa diluição em consideração no cálculo final. Após a diluição, 10 μ L da suspensão celular foram pipetados na câmara de Neubauer, cobrindo-a com a lamínula de vidro. O espaço formado entre a lamínula e a câmara é de 0,1 mm. Assim, o volume determinado por cada quadrado é de 0,1 mm³, o que corresponde a 10⁻⁴ mL.

Após o procedimento da contagem, foi preparado uma suspensão de 65 mL com uma concentração de 10^5 células/mL.

3.5.5 Plaqueamento

Após a contagem de células, foi utilizada uma placa de 24 poços para o plaqueamento. Foram preparadas sete placas de 24 poços, sendo que, em cada placa, apenas 10 poços foram efetivamente plaqueados. Uma das placas foi utilizada como controle, enquanto as seis restantes foram distribuídas da seguinte forma: três para aplicação direta do plasma e três para aplicação indireta do plasma. Esse procedimento foi realizado primeiro para as células B16F10 e, na semana seguinte, para as células L929. Dessa forma, os procedimentos não foram exaustivos a ponto de causar erros humanos, garantindo um controle preciso de todos os passos.

O plaqueamento foi realizado utilizando o meio de cultura RPMI 1640 para as células B16F10 e o meio de cultura DMEM para as células L929, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino, gentamicina (0,025 g/L, Gibco) e estreptomicina/penicilina (0,1 g/L, Gibco). Para obter a concentração de 6×10^4 células/mL nos poços, foi verificado ao microscópio se todos os poços estavam igualmente plaqueados. Por fim, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂.

3.5.6 Tratamento das células e do meio de cultura

3.5.6.1 Método Direto

Após 24 horas, o meio de cultura de cada poço foi removido, deixando as células no fundo. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de meio de cultura novo em cada poço. O sistema SDBD foi então posicionado sobre a placa de cultura e permaneceu pelo tempo de tratamento estipulado, conforme mostrado na **Figura 8**, que ilustra tanto o método direto quanto o indireto. Em seguida, a placa de 24 poços foi incubada novamente por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂.



Figura 9 – Esquemática do método direto e indireto visualizado de maneira individualizada em apenas um poço de cultura celular.

Em seguida, a placa de 24 poços foi incubada novamente por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂.

3.5.6.2 Método Indireto

Passadas as 24 horas do plaqueamento, foi adicionado meio de cultura em outra placa de 24 poços, onde foi tratado com o plasma somente o meio de cultura, sem a presença das células. Em seguida, o meio de cultura de cada poço da placa de 24 poços que continham as células foi substituído por aquele ativado por plasma, como pôde ser visto na Figura 11. Em seguida, a placa de 24 poços foi incubada novamente por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂.

3.5.7 Avaliação de atividade metabólica pelo ensaio MTT

Após a incubação, foi removido todo o volume de cada poço, com cuidado para não remover as células. Em seguida, foi adicionado 1 mL de PBS em cada um dos poços e em seguida removidos. Com a luz do laboratório e da capela apagada, foi adicionado 1 mL de MTT na concentração de 0,5 mg/mL em cada poço, e a placa foi incubada por 3 horas a 37 °C e 5% CO₂.

Após este período, foi removido o conteúdo de cada poço e adicionado 1mL de DMSO puro. A placa foi levada para realizar a leitura da absorbância das placas em 540nm no leitor de placas Synergy H1 Biotek.

3.5.7.1 Leitura dos poços da placa de cultura celular

Para a realização da leitura dos poços, é configurado no leitor de placas Biotek o tipo de placa a ser lida, de modo que a leitura seja feita na exata ordem e configuração da placa. Para isso, o modelo de placa de 24 poços foi selecionado, fazendo com que o leitor organizasse os poços em grupos A, B, C e D, com numerações de 1 a 6 em cada grupo, sendo essas separações, referentes à localização de cada poço já padronizado de fábrica em cada placa, demonstrado, assim, pela **Figura 10**.

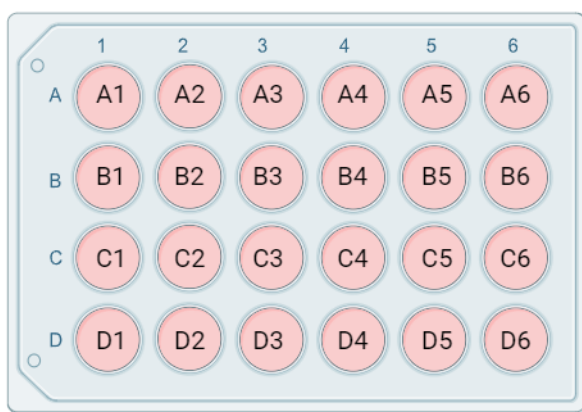


Figura 10. Separação em grupos da localização de cada poço de cultura celular, de modo a facilitar a leitura e identificação dos poços.

3.6 Produção do PAM e da PAW

Os meios de cultura RPMI 1640 ou DMEM foram expostos ao sistema SDBD retratado durante a **seção 3.1** para a produção do PAM. Foi utilizada uma voltagem de 5 kV e frequência

de 15,1 kHz. Essa mesma condição foi utilizada também para a produção da PAW, utilizando água deionizada para ativação.

Utilizando 10 poços da placa de cultura celular de 24 poços, sendo que cada poço possui 2,5ml, o sistema DBD fora sobreposto à placa de modo a ativar individualmente cada poço. Dessa forma, após cada um dos tempos de exposição (1 min, 2 min e 3 min) cada PAM foi caracterizado.

3.7 Caracterização do PAM e da PAW

O PAM e a PAW produzidos através do sistema DBD foram caracterizados utilizando um Medidor Multiparâmetros Metrohn – 913 pH Meter, a fim de obter os parâmetros como pH, TDS, ORP e σ elétrica. Além disso, foram realizados ensaios experimentais para medição do teor de NO_3^- , NO_2^- e H_2O_2 utilizando Fitas Reativas de Nitrito, Nitrato e Peróxido de Hidrogênio Quantofix (Sigma-Aldrich).

Ademais, também foram realizados ensaios matemáticos utilizando um Espectrofotômetro UV-vis Thermo Scientific – Genesys 180 no intervalo de 190 - 270 nm, com largura de banda de 2 nm, tempo de integração de 0,5 s e velocidade de medida de 120 nm/min. As curvas de absorvância das amostras de PAW e PAM foram obtidas usando uma cubeta de quartzo Kasvi - K22-135-Q com caminho óptico de 1 cm. Posteriormente, foi identificado nos espectros UV-vis da PAW diferentes espécies analisadas, tendo como picos centrais: NO_3^- (203 e 220 nm), NO_2^- (210 e 230 nm), HNO_2 (195 nm), H_2O_2 (próximo de 190 nm) e O_3 (entre 240 e 260 nm). (95–98)

3.8 Análise Estatística

Para a análise estatística, utilizou-se a análise de variância bidirecional (Two-Way ANOVA) para avaliar as interações entre os fatores considerados. Após a ANOVA, foram realizados testes post hoc de Tukey para comparações múltiplas, a fim de identificar diferenças significativas entre os grupos. As análises foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism, versão 10. Este procedimento permitiu a avaliação robusta das diferenças estatísticas, considerando tanto os efeitos principais quanto as interações entre os fatores analisados. A significância estatística foi estabelecida com um nível de confiança adequado, assegurando a validade das conclusões obtidas.

4 Resultados e Discussão

4.1 Análise do plasma DBD

4.1.1 Caracterização Térmica do Plasma

A fim de garantir a segurança da utilização do reator em experimentos com células *in vitro*, foi realizada a caracterização térmica do plasma DBD por meio do sensor de temperatura/fluxo térmico, conforme ilustrado na **Figura 10c**.

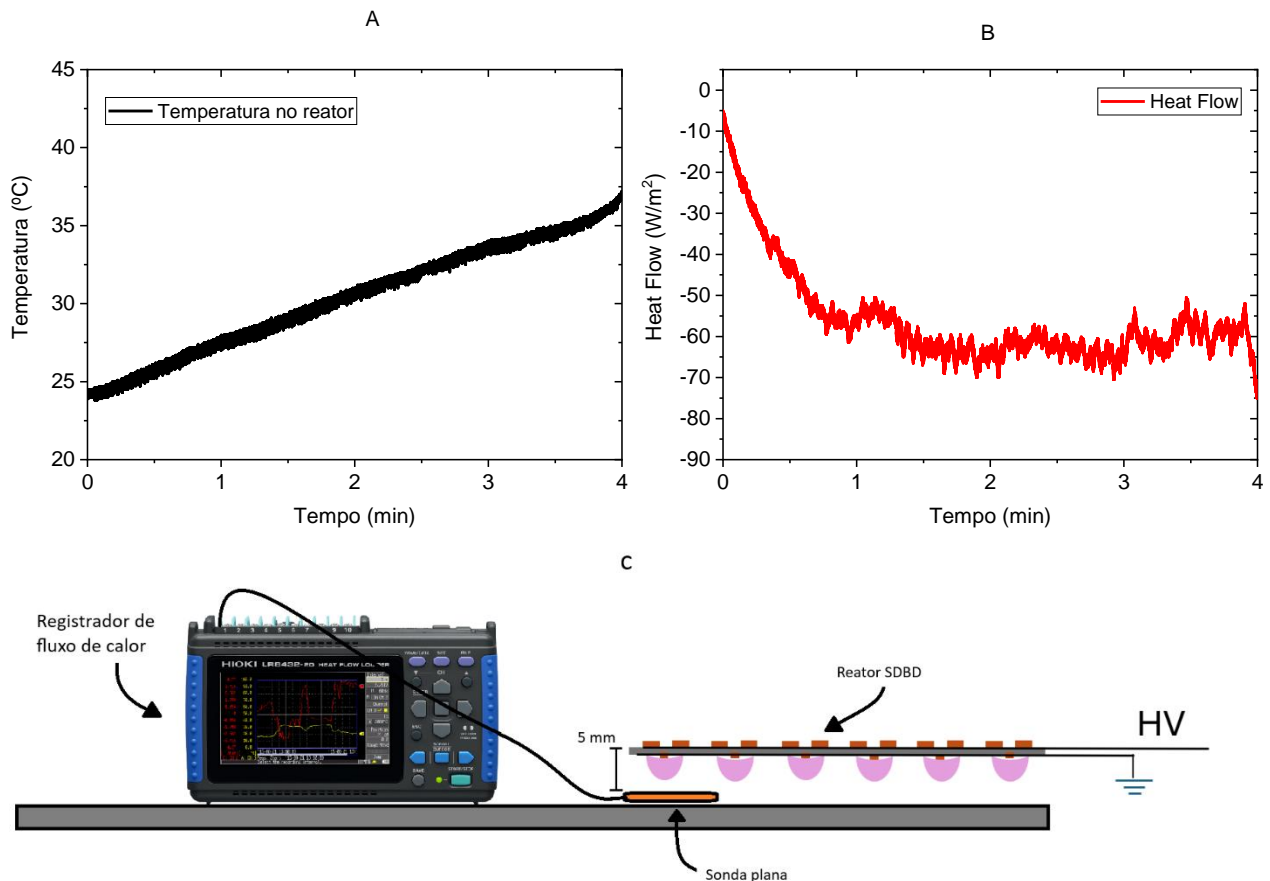


Figura 11 – (A) Variação da temperatura no reator de plasma DBD em função do tempo; (B) Fluxo térmico em função do tempo; (C) Esquemática do aparato experimental.

A **Figura 11a** mostra a variação da temperatura no reator de plasma DBD ao longo do tempo. A curva revela que a temperatura do reator aumenta gradualmente durante a operação, atingindo 33,6 °C após 3 minutos de funcionamento contínuo, sendo este o tempo máximo utilizado para os tratamentos durante os experimentos. Esse aumento gradual de temperatura deve-se ao fluxo de partículas (neutras e excitadas) provenientes do plasma DBD.

A **Figura 11b** apresenta a variação do fluxo térmico em função do tempo. No início da operação, o fluxo térmico é mais intenso e apresenta valores negativos acentuados, indicando

uma rápida transferência de calor do plasma, que está a uma temperatura significativamente mais alta, para a sonda mais fria. Esse comportamento inicial é explicado pela alta diferença de temperatura entre o plasma e a sonda, conforme a Lei Zero da Termodinâmica.

Com o passar do tempo, o fluxo térmico diminui em magnitude, aproximando-se do equilíbrio térmico. À medida que a sonda se aquece, a diferença de temperatura entre os dois sistemas diminui, resultando em uma taxa de transferência de calor menos intensa.

Essa caracterização é crucial para assegurar que a temperatura do reator não atinja níveis que possam comprometer a integridade das culturas celulares. A estabilização do fluxo térmico após os primeiros minutos de operação indica que o reator de plasma DBD não provoca um aumento contínuo e descontrolado de temperatura, mas sim um equilíbrio térmico, assegurando condições estáveis para as culturas celulares. A temperatura de 33,6°C após 3 minutos de operação está dentro de uma faixa segura para a maioria dos ensaios biológicos, já que está próxima da temperatura fisiológica (37°C).

Portanto, os dados obtidos confirmam que o reator pode ser utilizado com segurança em experimentos *in vitro* sem causar danos térmicos às células.

4.1.2 Caracterização Elétrica do Plasma DBD

A caracterização elétrica do reator de plasma DBD gerou gráficos de tensão e corrente, conforme mostrado na **Figura 12**. A **Figura 13** ilustra o sinal de potência em função do tempo.

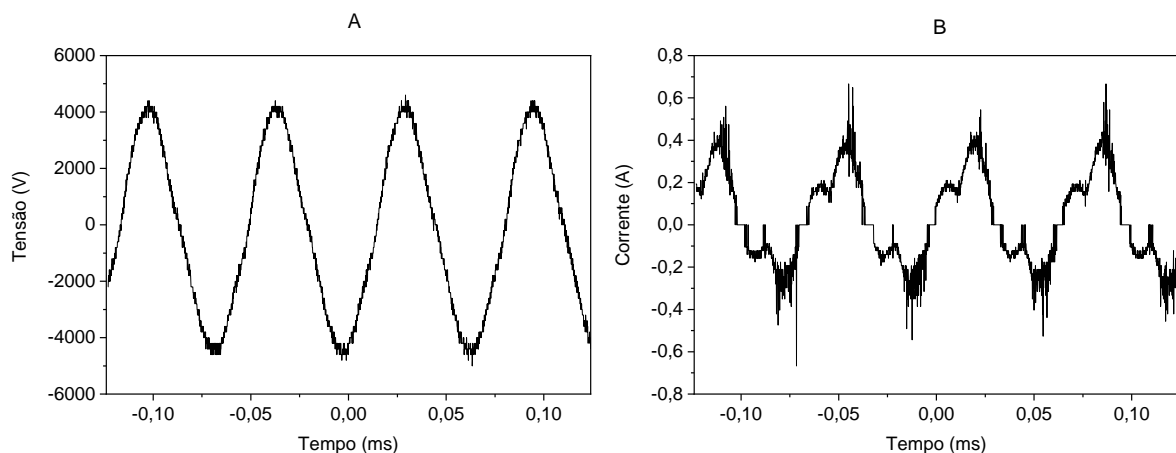


Figura 12 – (A) Sinal de tensão e (B) corrente obtido através do osciloscópio.

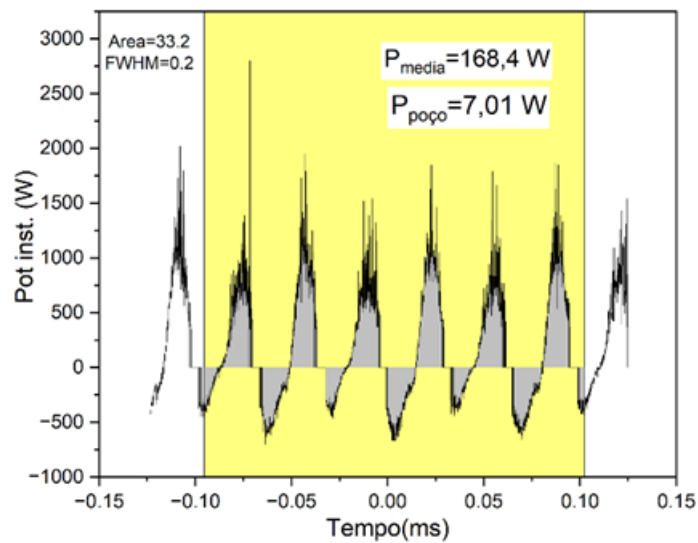


Figura 13 – Sinal de potência em variação com o tempo. O intervalo entre as linhas vermelhas delimita o período integrado para obtenção da potência média.

Com base nas medições obtidas pelo osciloscópio, foi realizada a integração de um período completo. Sendo assim, a potência média dissipada pôde ser determinada pela equação 1, onde $V(t)$ e $I(t)$ são a voltagem e corrente instantâneas (99):

$$P_m = \frac{1}{t} \int_0^t V(t)I(t)dt \quad \text{Eq. 2}$$

Com isso, considerando que a potência média é a área sob a curva dividida pelo tempo, obtém-se uma potência média de 168,4 W. E, supondo que os diferentes pontos de plasma possuem a mesma potência dissipada, a potência por poço é de 7,0 W.

Além disso, uma vez que não é possível medir a tensão e corrente em cada par de eletrodo, optou-se em determinar o potencial flutuante. A curva do potencial flutuante em função do tempo para cada par de eletrodo, distribuídos numa matriz 4x6, com linhas A, B, C e D, e colunas de 1 a 6, foi determinada. Observa-se que as curvas possuem a mesma forma e frequência, com leve diferenças de fase. Demonstrando, assim, a homogeneidade do potencial aplicado em cada um dos poços nos experimentos, conforme mostrado na **Figura 14**.

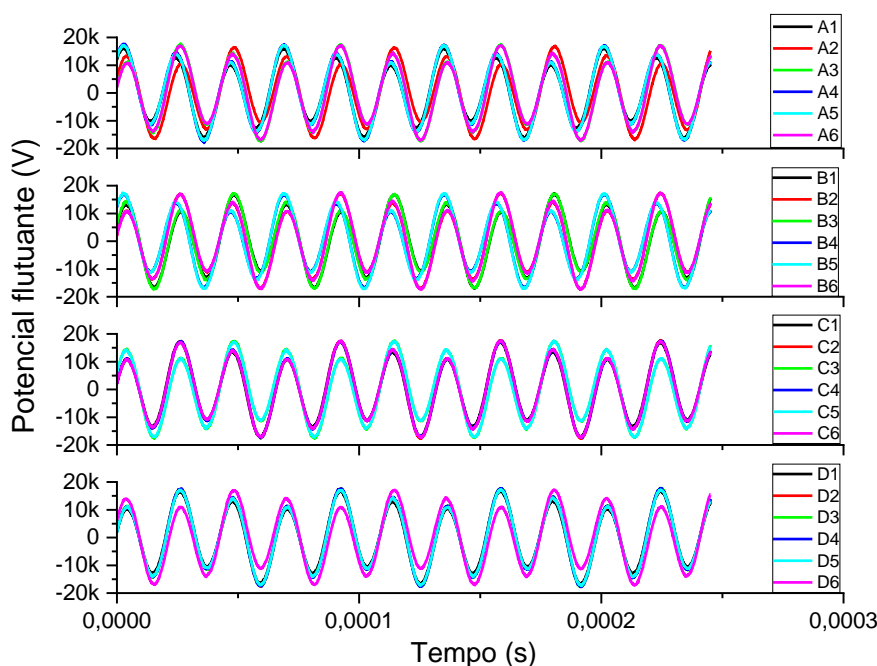


Figura 14 – Potencial flutuante obtido através da medição individual de cada um dos 24 eletrodos do reator DBD.

4.1.3 Caracterização Óptica do Plasma DBD

A caracterização óptica do plasma produzido pela fonte foi realizada com um espectrômetro marca Avantes, linha SensLine, modelo AvaSpec-ULS-RS-TEC, cobrindo o intervalo de 200 a 750 nm. Utilizou-se uma fibra óptica posicionada a aproximadamente 1 cm do plasma para captar o espectro emitido. As diferentes espécies detectadas estão ilustradas na **Figura 15**, podendo ser identificadas pelos seus picos ou bandas correspondentes.

Os picos identificados correspondem a diferentes espécies moleculares e atômicas presentes no plasma: NO (Óxido Nítrico) com pico observado a 298,5 nm; OH (Radical Hidroxila) com picos observados em 305 nm e 308 nm; N₂ (Nitrogênio Molecular) com o segundo sistema positivo identificado por picos em 315 nm, 336 nm e 356 nm; e N₂⁺ (Íon de Nitrogênio Molecular) com o primeiro sistema negativo apresentando picos em 380 nm, 405 nm e 426 nm (7,100–105).

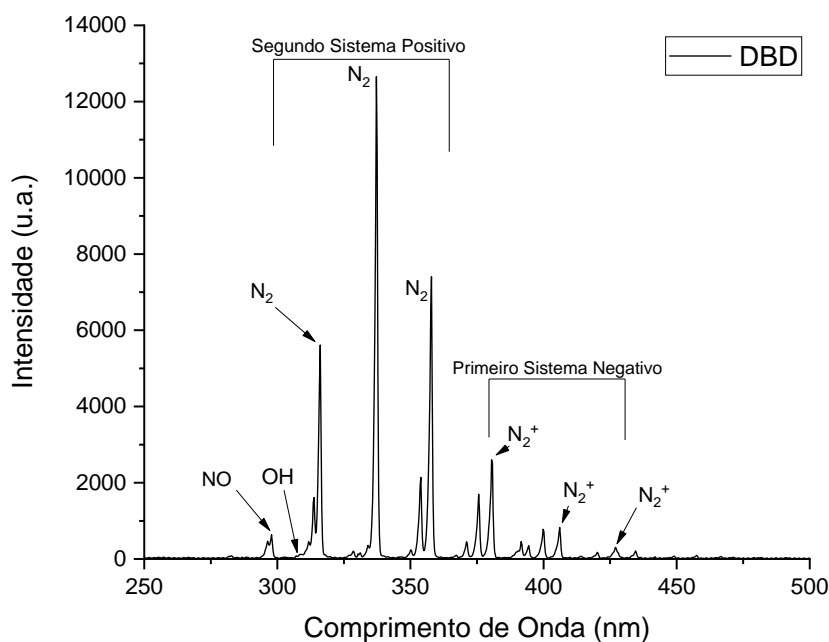


Figura 15 – Espectro OES do plasma DBD.

Essas medições ópticas são essenciais para a compreensão da composição e das propriedades do plasma DBD. A identificação das espécies presentes e suas concentrações oferece uma visão ampla dos processos químicos que ocorrem no plasma, além de suas potenciais aplicações. A presença de OH e NO indica a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), que são conhecidas por suas propriedades citotóxicas. Essas espécies podem dar origem a espécies como H_2O_2 através da presença de OH ($OH \rightarrow H_2O_2$); Peroxinitrito através de NO ($NO + O_2^- \rightarrow ONOO^-$) e Ácido Nitroso (HNO_2) através da reação $OH + NO \rightarrow HNO_2$. Essas espécies podem induzir danos oxidativos em células cancerígenas, levando à apoptose ou necrose celular. Assim, o plasma contendo RONS pode ser uma ferramenta eficaz para a inativação de células cancerígenas, contribuindo para tratamentos oncológicos menos invasivos.

Os picos em 315 nm, 336 nm e 356 nm, correspondentes ao segundo sistema positivo de N_2 , sugerem uma alta concentração de nitrogênio molecular no plasma, o que é relevante para a excitação e ionização das moléculas de nitrogênio. As transições eletrônicas no íon N_2^+ , observadas em 380 nm, 405 nm e 426 nm, indicam que o plasma possui energia suficiente para ionizar essas moléculas, um fator importante para a geração de RONS. Pois, as transições eletrônicas no íon N_2^+ observadas são indicativas de estados excitados de alta energia do nitrogênio molecular ionizado. Esses estados excitados são gerados quando as moléculas de N_2 são expostas a uma energia suficiente para ionizá-las, o que geralmente ocorre em plasmas de

alta energia. Esses processos podem levar a geração de RNS como NO e NO₂⁻, ou casar dissociação das moléculas de O₂ presentes no plasma, gerando ROS como O₃ e H₂O₂. Portanto, conhecendo os valores dos níveis energéticos dessas espécies N₂ é possível prever os tipos de reações que poderão ocorrer no líquido.

Além disso, de forma a demonstrar a homogeneidade do reator, foram obtidos os espectros para todos os 24 eletrodos do reator, como pode ser visto na **Figura 16**.

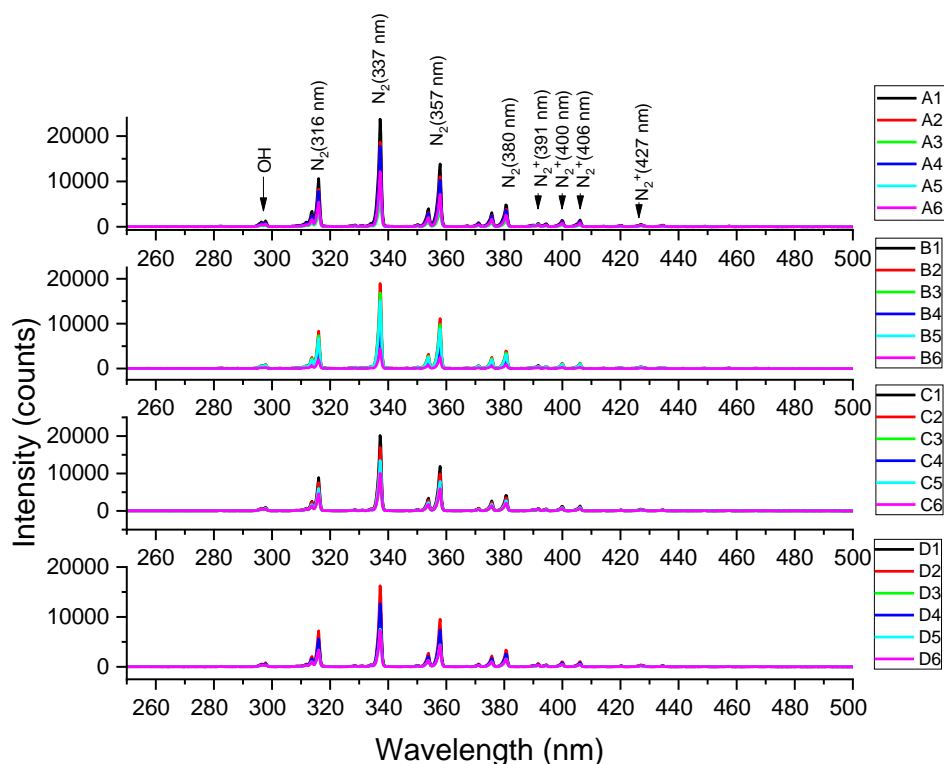


Figura 16 – Espectros OES de todos os 24 eletrodos do plasma DBD.

A diferença de intensidade que pode ser notada entre os espectros em cada ponto de plasma deve-se, provavelmente, à dificuldade experimental em manter a fibra posicionada na mesma distância e orientação, uma vez que o aparato utilizado para fixação da medição dos espectros pode variar em poucos milímetros entre o deslocamento de um eletrodo a outro.

4.2 Análise da água e meios de cultura

4.2.1 Caracterização Físico-química da PAW

O líquido ativado com o maior número de estudos publicados é a PAW, sendo assim, por sua caracterização bem fundamentada em diversas literaturas, uma vez que possui composição simples, garantindo reprodutibilidade e reduzindo o número de reações químicas ocorridas, facilitando sua caracterização. (3) Assim, buscou-se utilizá-la para justificar a caracterização físico-química das RONS infundidas nos líquidos pelo sistema DBD construído.

A caracterização Físico-química realizada busca descrever a composição dos PAM's (RPMI e DMEM) utilizados, a fim de avaliar o transporte de espécies reativas contidas nestes líquidos, na qual foram produzidas inicialmente no plasma e posteriormente carregadas através da interface plasma-líquido.

Para obtenção dos gráficos que serão apresentados a seguir, foram medidos os 10 poços selecionados da placa de cultura contendo PAW, onde foi assim feita a média dos valores obtidos em todos os poços, bem como o desvio padrão.

Assim, foram caracterizados primeiramente os aspectos físico-químicos da PAW, a fim de reafirmar a ativação homogênea produzida pelo reator, onde foram analisadas as variações de pH, TDS, ORP, Condutividade e Salinidade em função do tempo de ativação, como podem ser vistos pelas **Figuras 17 e 18 A, B, C e D.**

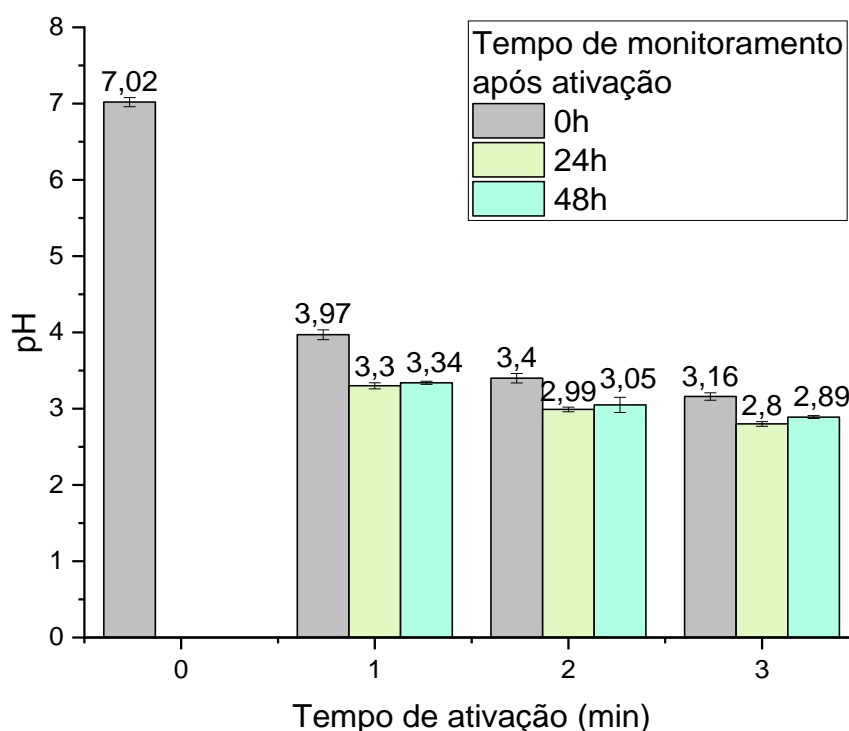


Figura 17 – Variação do pH da PAW em função do tempo de ativação monitorados imediatamente após a ativação e 24h e 48h após a ativação.

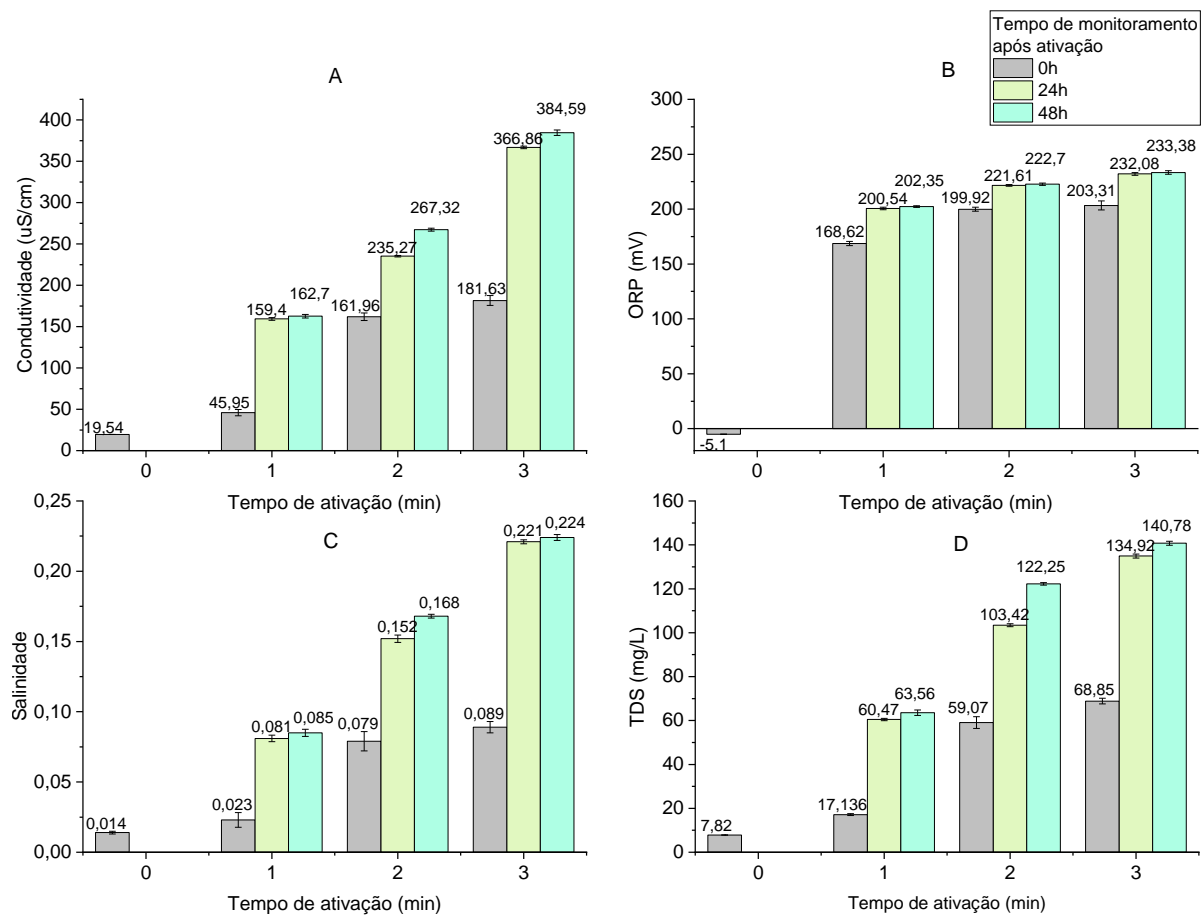


Figura 18 – (A) Variação de Condutividade Elétrica; (B) Variação de ORP; (C) Variação de Salinidade e (D) Variação de TDS em função do tempo de ativação.

Faz-se necessário ressaltar que o pH padrão da água deionizada é idealmente de 7, considerado um pH neutro. No entanto, na prática, a água deionizada pode apresentar variações no pH devido à absorção de dióxido de carbono (CO_2) do ar, que forma ácido carbônico (H_2CO_3) e pode reduzir o pH para valores pouco abaixo de 7. (3)

Ao analisar a **Figura 17**, é possível observar o principal parâmetro físico-químico de estudo da PAW, o pH. A **Figura 17** ilustra a variação do pH em função do tempo de ativação, sendo vista uma acidificação da água ativada por plasma, com a redução do pH de 7,02 para 3,16 imediatamente após 3 min de ativação, chegando a um pH de 2,8 24h após a ativação, uma vez que as reações continuam a ocorrer no líquidos após a ativação.

Essa diminuição do pH, ou seja, sua acidificação, está frequentemente atribuída pela literatura às espécies H_2O_2 , HNO_2 e HNO_3 . (3,11,53) Além disso, a variação do pH está diretamente relacionada com a concentração de H^+ vinda de espécies de vida longa, na qual são transportadas da região de plasma, para a região do líquido. (3)

Ocorreu, também, a caracterização de outros parâmetros do PAW, como o total de sólidos dissolvidos (TDS), potencial de oxiredução (ORP), condutividade elétrica e salinidade, como pode ser visto através da **Figura 18 A, B, C e D**.

A Condutividade elétrica é caracterizada por representar a facilidade de um determinado material ou meio de conduzir corrente elétrica. (22) Além disso, a condutividade é fortemente influenciada pelo pH da solução. (3) A água, por ser um meio dielétrico, possui sua condutividade diretamente ligada a presença de cátions e ânions. (22)

Dessa forma, a variação de condutividade elétrica visualizada demonstra um aumento, tanto em relação ao aumento do tempo de ativação, quanto ao aumento de horas decorridas da ativação. Isso se dá pelo fato do transporte de espécies do plasma e do gás para a região do líquido, dando origem aos portadores de carga (cátions e ânions) através da dissociação iônica, resultando em um aumento da condutividade.

Já o ORP, caracterizado por definir um caráter oxidante ou redutor, quando analisado, nota-se um valor caracterizado inicialmente como redutor de -5,1 mV, passando para um valor oxidante de 233,38 mV 48h após a ativação. (22,106,107) Além disso, o valor do ORP influencia diretamente o pH, uma vez que a concentração de prótons aumenta assim como o valor de ORP. Isso se dá por parte das reações redox dependem do poder oxidante do íon H^+ . (108,109)

Por sua vez, o TDS é caracterizado por expressar a concentração de íons inorgânicos dissolvidos na PAW. (110) Ao analisar a **Figura 18 D**, nota-se um comportamento semelhante ao da **Figura 18 A**, isso porque o aumento da concentração de íons na solução afeta a Condutividade Elétrica, pois íons livres na solução facilitam a movimentação de corrente elétrica, e influencia no aumento do TDS.

Por fim, enquanto o TDS quantifica sólidos dissolvidos em geral, a salinidade concentra-se em quantificar sais formados através do contato entre espécies do plasma com íons presentes no líquido, processo na qual desencadeia a cristalização e a formação de novos sais na solução. (111)

4.2.2 Caracterização físico-química dos meios de cultura ativado por plasma (PAM)

A compreensão físico-química do meio de cultura RPMI e DMEM ativado a plasma é essencial para avaliar os efeitos dos tratamentos com plasma em estudos sobre a terapia do câncer. No entanto, pela vasta composição dos meios de cultura, sua compreensão acaba sendo dificultada, significando uma grande barreira a ser superada cientificamente por diversos grupos

de pesquisa, necessitando, assim, da existência de pesquisas relacionadas ao comportamento do PAM, como apontado por Tanaka et. al. (3,112)

Além da caracterização realizada para a PAW, a mesma caracterização ocorreu para ambos os meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos, como pode ser visto nas figuras a seguir, na qual representam a variação de pH, ORP, TDS e Condutividade Elétrica em função do tempo, ao decorrer de 0h, 24h e 48h após a ativação, do meio de cultura DMEM, para cultivo de células L929 e RPMI, para cultivo de células B16F10.

Para os PAM's, ocorre uma cinética diferente da apresentada na PAW. Isso se deve pelo fato de Meios de Cultura ativados a plasma serem consideravelmente mais complexos quanto suas composições. Abaixo serão apresentados os dados intercalados entre ambos os PAM's produzidos a partir do meio de cultura DMEM e RPMI, sendo apresentados os dados relativos ao DMEM e ao RPMI lado a lado.

Enquanto para a PAW tem-se que o pH vai acidificando com o decorrer do tempo, para o PAM (DMEM) o resultado inicialmente não é alterado. Porém, quando monitorado durante 24h e 48h, o pH que antes estava próximo da neutralidade, agora passa a ser alcalino, como pode ser visto na **Figura 19**.

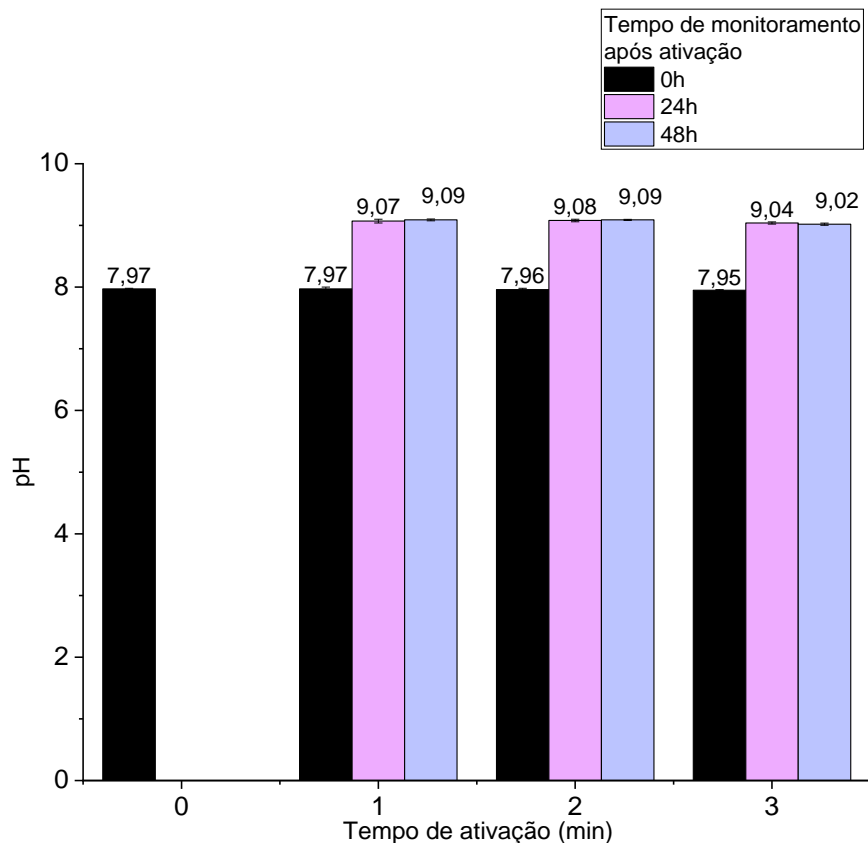
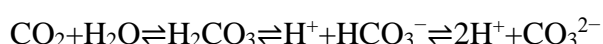


Figura 19 – Variação do pH em função do tempo de ativação do PAM (DMEM).

A **Figura 19** revela um comportamento distinto em relação à resistência à variação de pH. Inicialmente, o pH do DMEM é de aproximadamente 7,9, aumentando significativamente para 9,2 após 48 horas de tratamento. Esse comportamento de constância do pH logo após a ativação é retratado em outros estudos, como de Canal et. al, onde o PAM produzido em seu trabalho através do meio McCoy's também se manteve constante logo após a ativação, mesmo após um tempo de ativação de 30 minutos. (113)

O comportamento inicial de manter-se a neutralidade do pH logo após a ativação pode ser influenciado pela presença de compostos tampão no DMEM, que resistem a mudanças drásticas de pH. Assim, a adição de espécies reativas geradas pelo plasma ao DMEM altera o equilíbrio entre o ácido tampão e sua base conjugada, onde concentra-se o maior número de estudo dedicados a líquidos complexos, como cita Woedtke et al. (3)

Embora o tampão resista inicialmente a mudanças, a exposição prolongada ao plasma e a consequente produção de espécies reativas induzem um aumento no pH. Isso se dá devido à limitação da capacidade tampão em neutralizar as novas espécies reativas introduzidas, resultando em um ambiente mais alcalino após 48 horas. Uma hipótese para essa alcalinização pode ser levantada referente à interação do CO₂ presente na atmosfera que pode reagir com o plasma, podendo dissolver-se na solução aquosa formando ácido carbônico. A dissociação do ácido carbônico em bicarbonato e carbonato resulta em uma solução mais alcalina, podendo ser representada pela reação:



Já para o PAM (RPMI) o pH que inicialmente era de 7,41 chega a 8,25 após 48h de ativação, como pode ser visto na **Figura 20**. Esse comportamento é similar ao ocorrido com o PAM (DMEM), porém, o aumento de pH é relativamente menor, quando comparados. Enquanto para o primeiro o pH pouco variou logo após a ativação, para este ocorre, mesmo que pequena, um aumento do pH logo de início. A hipótese levantada quanto a isso está presente na análise da composição dos diferentes meios de cultura. Durante a preparação descrita nas **seções 3.5.1 e 3.5.2**, nota-se uma diferença entre as concentrações de bicarbonato de sódio utilizado. Enquanto para a preparação do DMEM são utilizados 3,7 g de NaHCO₃, para o RPMI são utilizados 2,0 g, um valor próximo da metade do anterior. Isso pode indicar o comportamento de estabilidade inicial sendo maior para o DMEM, que pouco variou após as ativações iniciais.

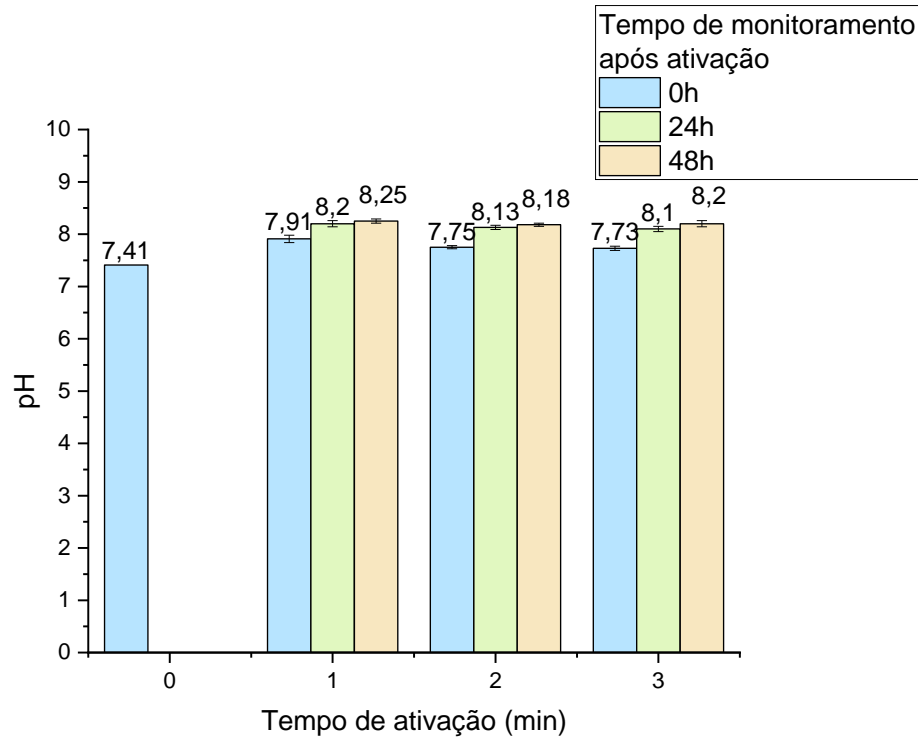


Figura 20 – Variação do pH em função do tempo de ativação do PAM (RPMI).

Um dos padrões mais facilmente identificados na diferença entre esses líquidos é o ORP, responsável por definir o caráter redutor ou oxidante de uma determinada solução. (22) A **Figura 21 A** ilustra a evolução do ORP em função do tempo de ativação, onde é possível observar a diminuição do ORP inicial de -62,5 mV para -133,05 mV passadas 48h de sua ativação. No entanto, vale ressaltar que logo após a ativação do meio, o ORP pouco variou em qualquer tempo de ativação utilizado. Já na **Figura 21 B**, nota-se um comportamento semelhante, porém, com uma variação muito menor à apresentada pelo meio DMEM.

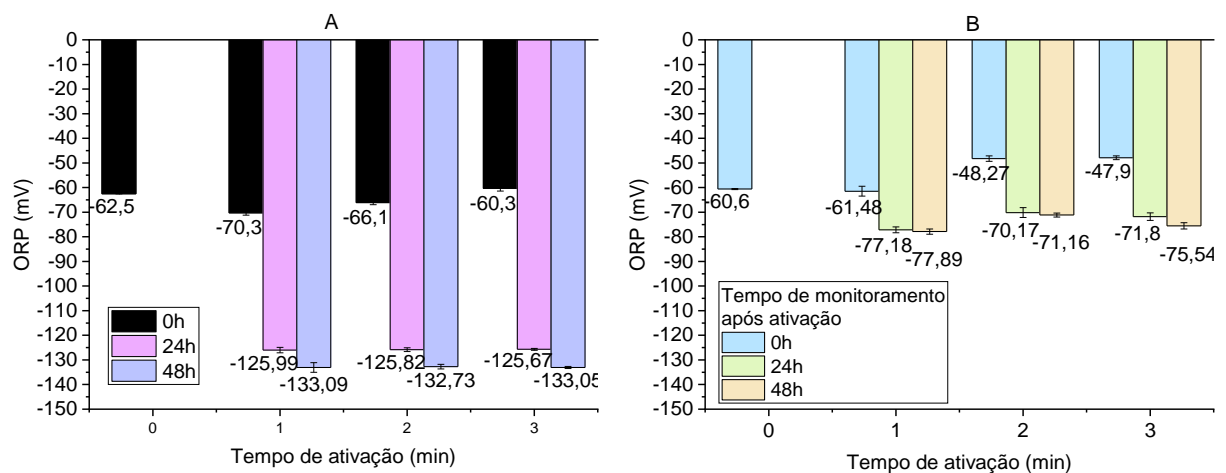


Figura 21 – Variação do ORP em função do tempo de ativação para o PAM (a) DMEM e (b) RPMI.

Um ORP mais negativo pode sugerir a predominância de espécies redutoras no meio. Durante a ativação pelo plasma, espécies reativas como os radicais livres podem reagir com compostos antioxidantes presentes no DMEM, resultando na neutralização de espécies oxidativas e a formação de um ambiente redutor. Este comportamento também pode ser influenciado pela composição específica do DMEM, que pode conter antioxidantes naturais ou aditivos que reagem com os produtos do plasma.

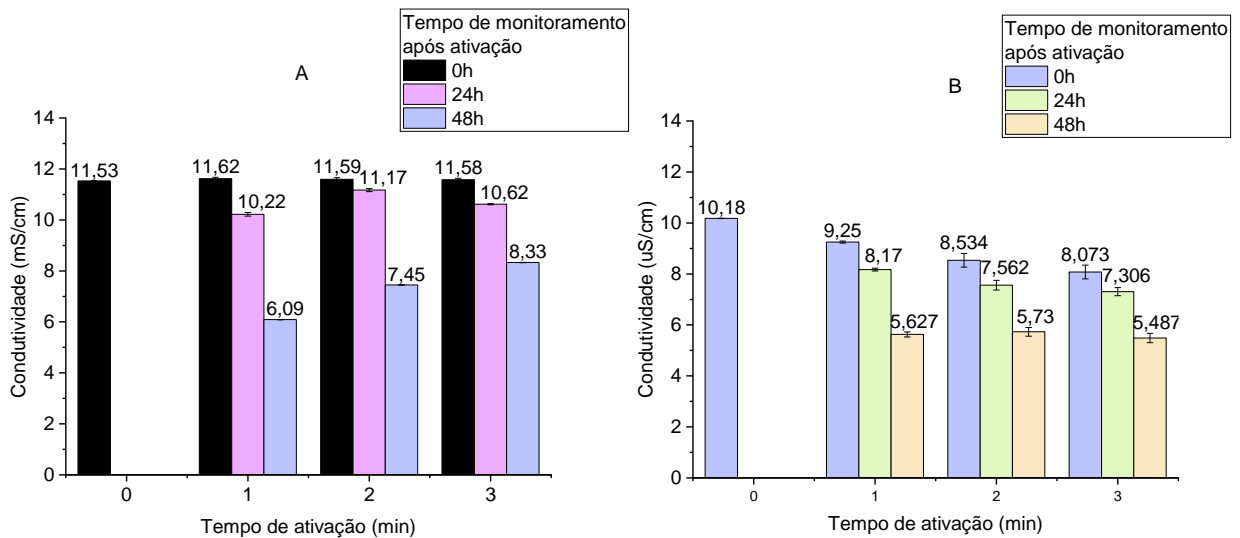


Figura 22 – Variação da Condutividade Elétrica em função do tempo de ativação para o PAM (a) DMEM e (b) RPMI.

A condutividade elétrica de um meio reflete sua capacidade de conduzir corrente elétrica, a qual é determinada pela presença de íons ou portadores de carga. A diminuição da condutividade elétrica pode ser atribuída à redução da concentração de íons livres no meio, resultante da precipitação de sais e formação de complexos insolúveis, o que corrobora com os resultados obtidos para a Salinidade do meio, na qual diminuiu com o decorrer do tempo.

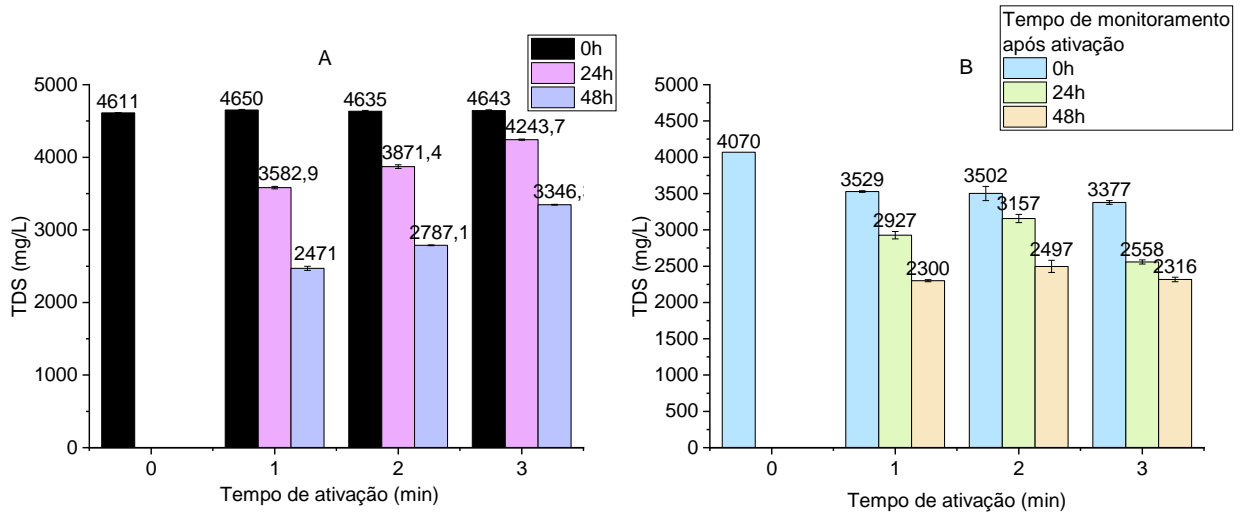


Figura 23 – Variação do TDS em função da variação do tempo de ativação para o PAM (a) DMEM e (b) RPMI.

Já o Total de Sólidos Dissolvidos (TDS), é referente ao número total de partículas dissolvidas em um sistema. A diminuição do TDS pode ser explicada pela precipitação de íons e formação de compostos insolúveis após a ativação pelo plasma. As espécies reativas geradas podem interagir com os componentes do meio, formando precipitados que se sedimentam ao longo do tempo, reduzindo a concentração de sólidos dissolvidos.

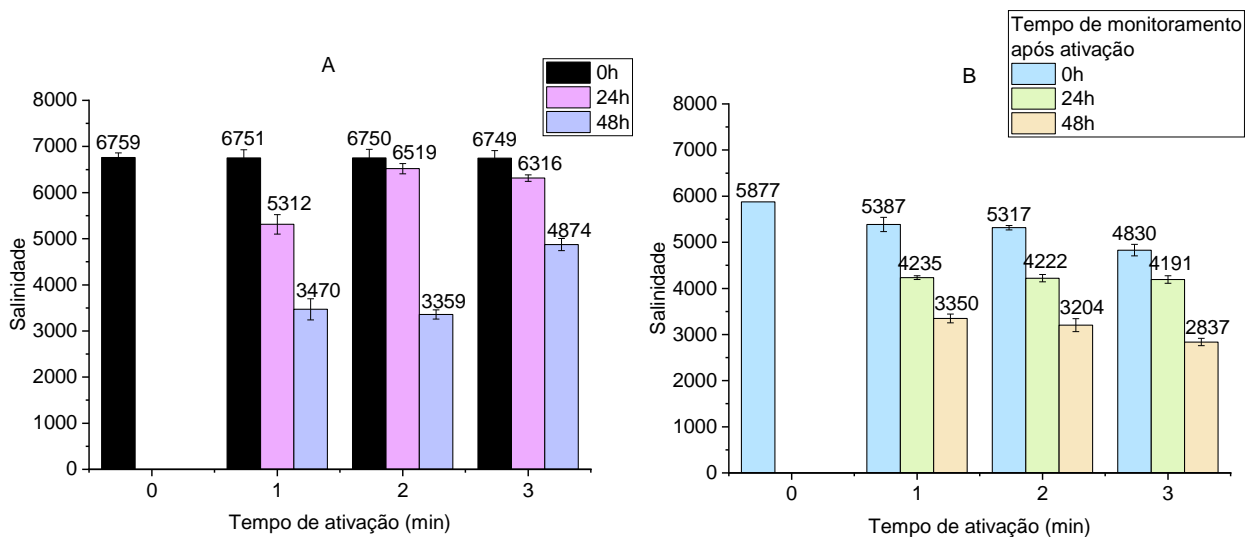


Figura 24 – Variação da Salinidade em função do tempo de ativação para o PAM (a) DMEM e (b) RPMI.

A redução da salinidade pode estar relacionada à formação de compostos insolúveis que precipitam, removendo íons do meio líquido. A interação do plasma com o meio DMEM pode gerar produtos que se complexam e precipitam, reduzindo assim a concentração de íons solúveis e, consequentemente, a salinidade.

4.3 Análise da composição química da PAW e dos PAMs

4.3.1 Estudo da uniformidade do plasma e da contaminação dos eletrodos nos diferentes poços tratados contendo água deionizada

O teste de uniformidade na ativação química dos multipontos de plasma foi realizado comparando as curvas de absorção UV-Vis, obtidas entre 190 e 280 nm, de água deionizada ativada em cada poço de cultura. Para pequena variação da concentração de uma das espécies produzidas pela ativação de plasma, há modificação da curva nessa faixa. Comparando o conjunto de curvas da **Figura 25**, pode-se perceber que as curvas são mais uniformes do que as dos gráficos da **Figura 26**. A principal diferença entre esses dois conjuntos de curvas é a limpeza dos eletrodos após o uso. Sabe-se, pela literatura, que superfícies de cobre tratadas por plasma sofrem efeito de envelhecimento devido a contaminantes orgânicos, o que pode alterar suas propriedades elétricas, alterando, conseqüentemente, a eficiência do reator. (114)

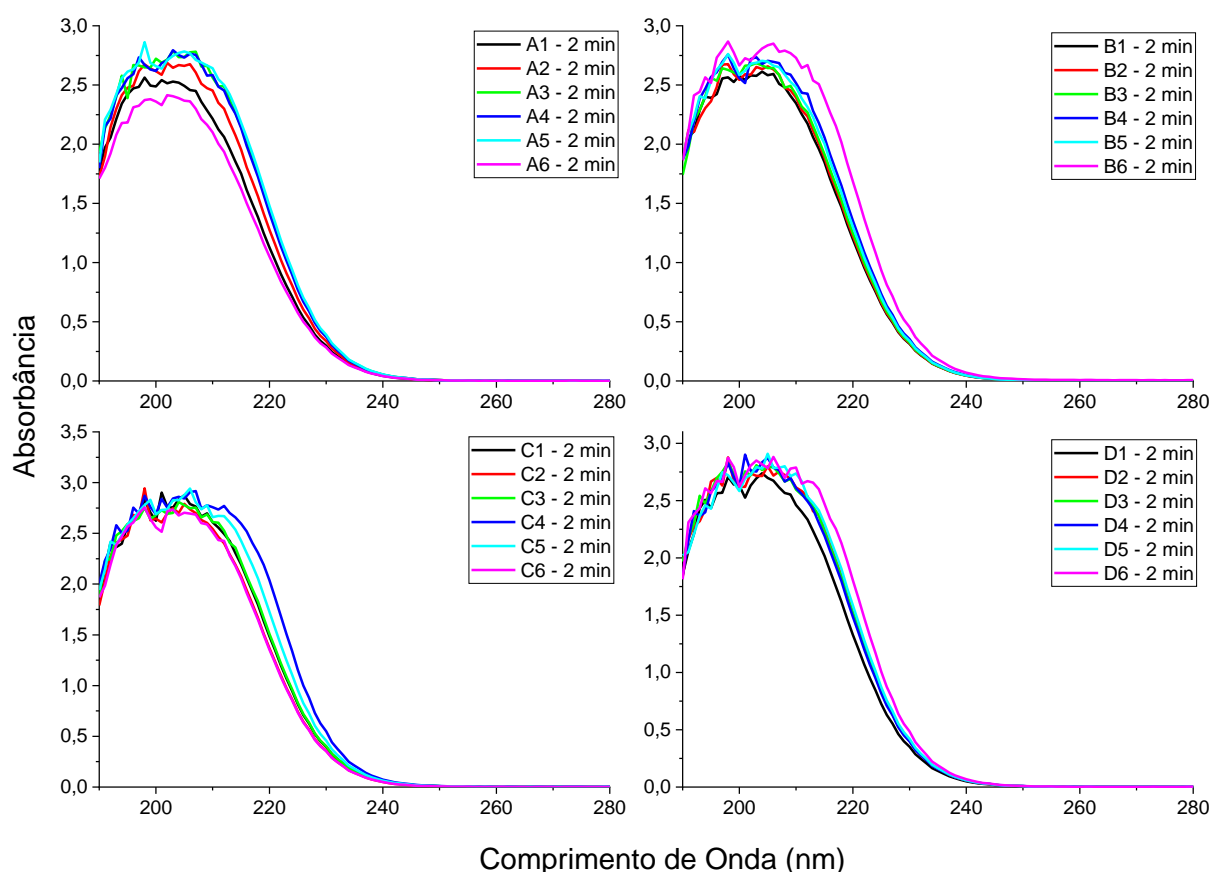


Figura 25 – Curva de absorbância para o tempo de 2 min de ativação de água deionizada com eletrodos livres de oxidação.

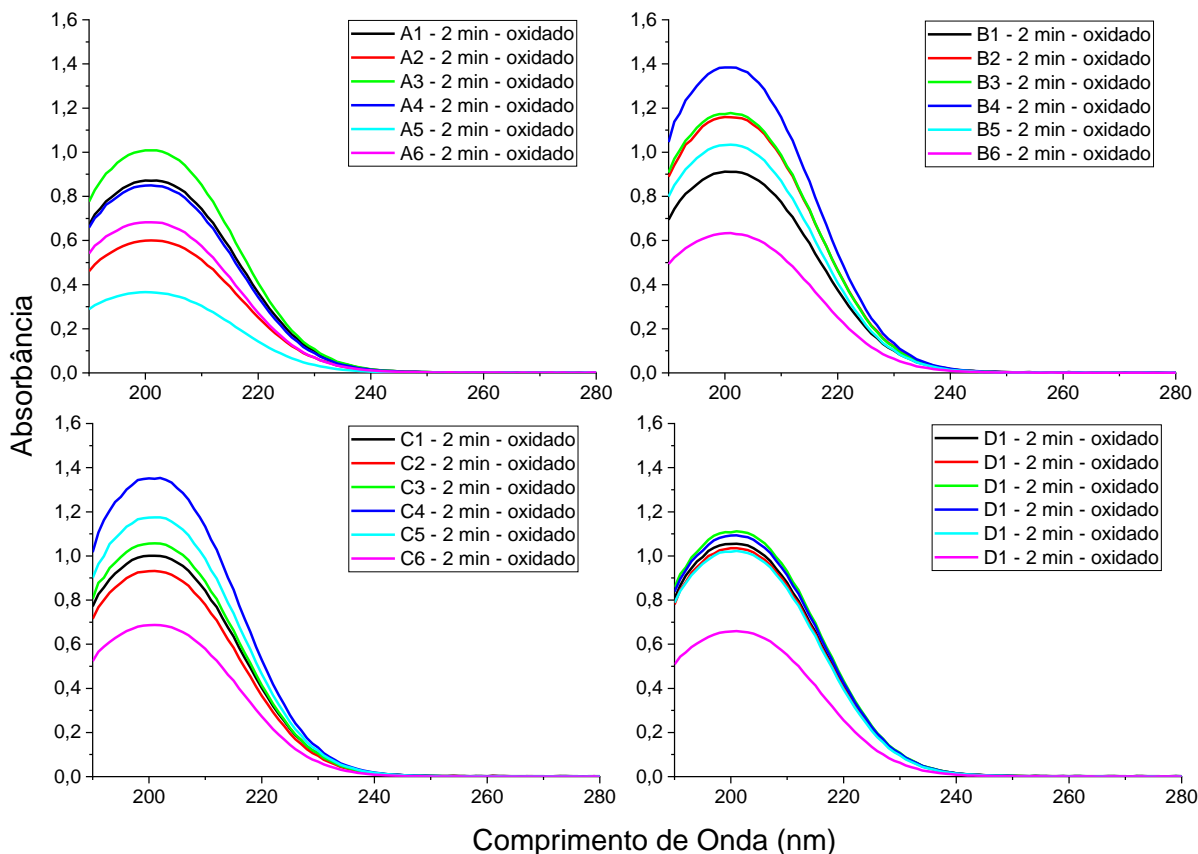


Figura 26 - Curva de absorvância para o tempo de 2 min de ativação de água deionizada com eletrodos oxidados.

Para a **Figura 26**, é possível observar o efeito que a contaminação do eletrodo causa em sua eficiência, afetando não somente a homogeneidade de sua utilização, como também sua capacidade de infundir espécies reativas no líquido, uma vez que a absorvância obtida para os líquidos ativados por eletrodos oxidados foi nitidamente menor, além de desigual, à absorvância obtida em eletrodos livres de oxidação.

4.3.2 Identificação dos espectros UV-Vis da PAW

Os espectros obtidos a partir dos eletrodos livres de contaminação mostram curva obtida pela ativação da PAW em função do tempo. As contribuições de cada uma das espécies podem ser obtidas através da identificação dos picos descritos na **seção 3.7**. Como pode ser visto na **Figura 27**, a identificação foi realizada para a PAW em tempos de 1, 2 e 3 minutos de ativação, onde é possível observar diversos picos referentes às suas respectivas espécies em um dado comprimento de onda.

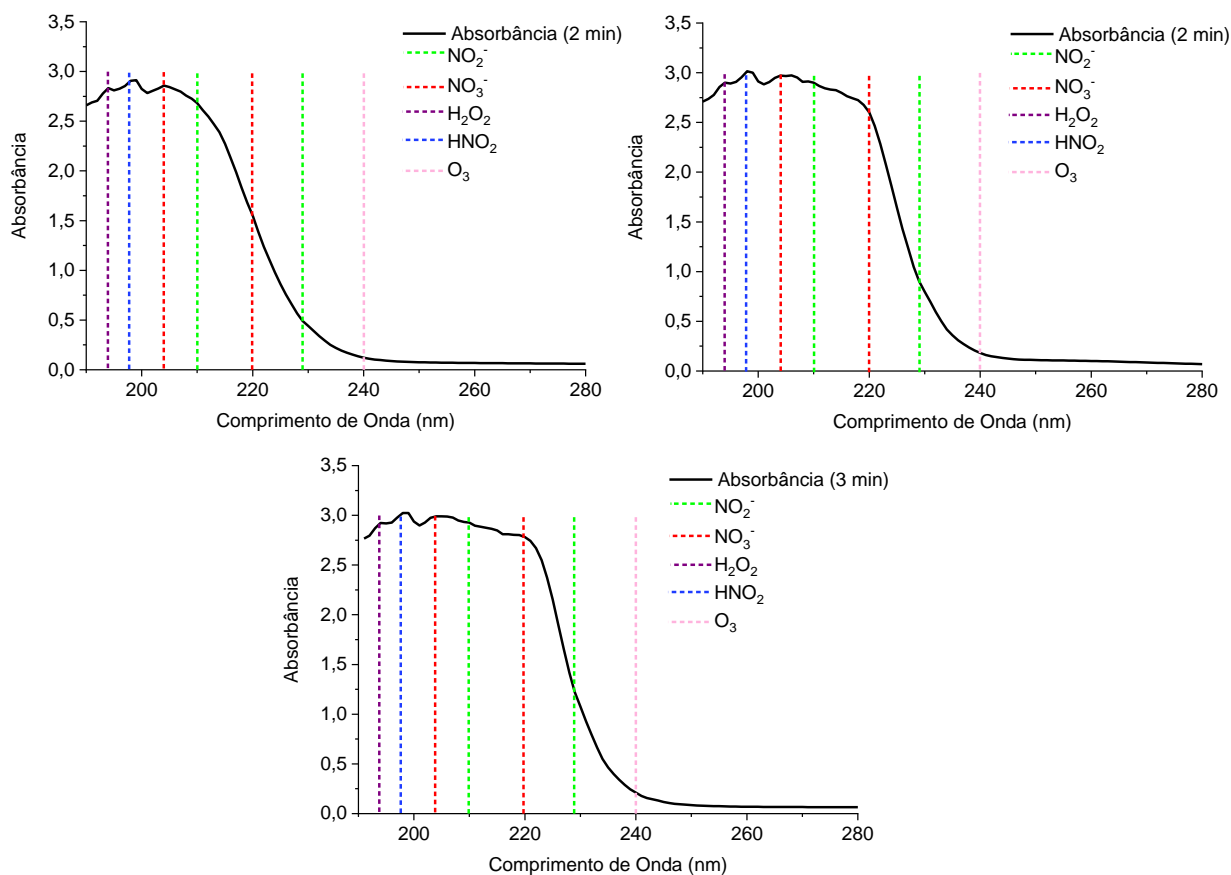


Figura 27 – Identificação do espectro UV-Vis da PAW de 1, 2 e 3 minutos de ativação.

Os espectros UV-Vis auxiliam na análise qualitativa da presença de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (RONS) na PAW. Embora esses espectros não forneçam uma análise quantitativa exata das concentrações das espécies reativas, eles permitem a detecção e a confirmação da presença dessas espécies na amostra. A partir da análise dos picos de absorbância, pode-se inferir a presença de várias RONS, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido nitroso (HNO_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e Ozônio (O_3). Essas espécies são fundamentais para o mecanismo de ação do plasma, influenciando diretamente as interações bioquímicas e os efeitos biológicos observados nas células tratadas. A partir da identificação dos espectros obtidos, têm-se um aumento linear na concentração de RONS em relação ao tempo de ativação da PAW, que é esperado, uma vez que a curva de absorbância vai aumentando conforme o tempo de ativação aumenta.

A identificação dos espectros obtidos revela um aumento linear na concentração de RONS em relação ao tempo de ativação da PAW, conforme esperado. Esse comportamento é evidenciado pelo aumento gradual das curvas de absorbância com o tempo de ativação, indicando uma produção contínua e acumulativa de RONS na solução. Este aumento linear é

consistente com a teoria de que a exposição prolongada ao plasma leva à geração de maiores quantidades de espécies reativas.

4.3.3 Efeitos do tempo de envelhecimento sobre a química da PAW

Por outro lado, como pode ser visto pela **Figura 28**, quando feito o monitoramento da PAW, sendo armazenada e monitorada durante 3 dias consecutivos, é visto uma diminuição na curva de absorbância dos espectros obtidos. Isso pode ser explicado devido à diminuição da concentração de espécies de vida longa que, com o passar dos dias, vão diminuindo suas concentrações na amostra.

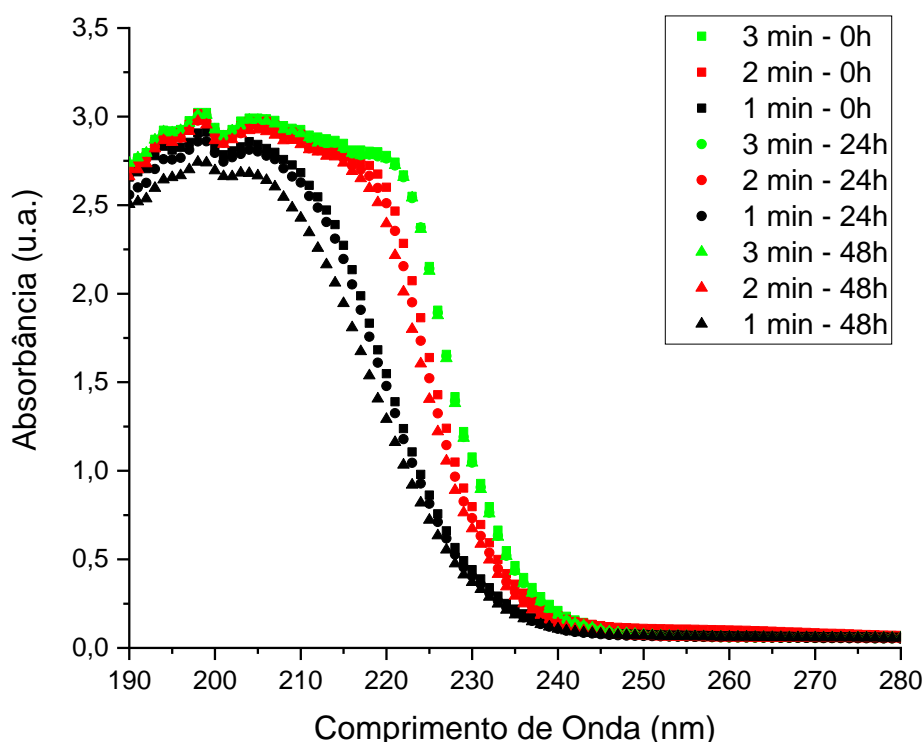


Figura 28 – Evolução das espécies em PAW para diferentes tempos de envelhecimento.

É possível notar que o tempo de ativação em que menos ocorreu diminuição da absorbância foi o de 3 minutos de ativação, sendo sua absorbância ao decorrer dos 3 dias, praticamente a mesma.

A avaliação da química da PAW ajuda a compreender os possíveis mecanismos de ação do plasma em líquidos. Com isso, identificar a diminuição de espécies com o decorrer do tempo auxilia no entendimento de sua cinética. Espécies de vida longa desempenham papéis cruciais na química da PAW e estão presentes de forma significativa nos espectros e análises realizadas.

4.3.4 Análise dos espectros UV-Vis do meio DMEM tratado por plasma

Além disso, foram obtidos também os espectros UV-Vis dos PAM's, realizando o acompanhamento durante 3 dias consecutivos, a fim de observar qualquer possível alteração. Porém, para o PAM obtido através da ativação de DMEM, como é visto na **Figura 29a**, quando observado de maneira ampla, praticamente não são observadas alterações, e mesmo quando observados os 3 diferentes minutos de ativação separadamente, na **Figura 29b**, pouco se observa em relação a qualquer alteração em seus espectros.

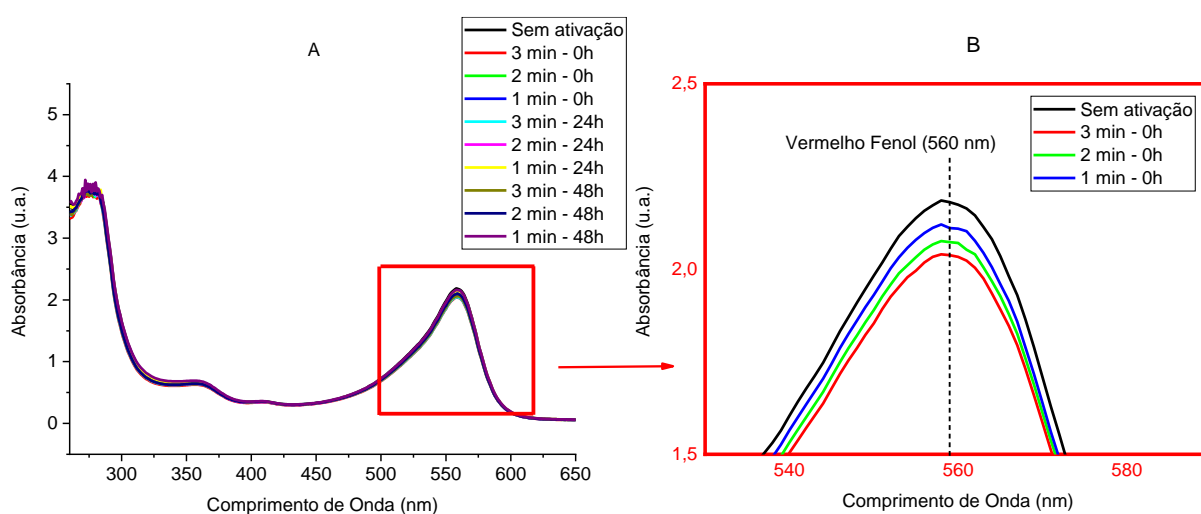


Figura 29 – (a) Espectros UV-Vis do PAM (DMEM) para 1, 2 e 3 minutos de ativação, com 3 tempos consecutivos de envelhecimento, (b) detalhe da variação da absorção em torno de 560 nm.

O espectro UV-Vis do DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ativado por plasma de DBD de superfície pode demonstrar diversas mudanças químicas que ocorrem devido ao tratamento com plasma. A ativação por plasma geralmente gera espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) e ozônio (O_3). Essas espécies podem ser detectadas indiretamente por suas interações com os componentes do meio, causando mudanças no espectro de absorvância, especialmente na faixa UV (abaixo de 400 nm).

O pico em torno de 280 nm está tipicamente associado a aminoácidos aromáticos, como triptofano, tirosina e fenilalanina. Modificações induzidas pelo plasma, como a oxidação, podem alterar as características de absorvância desses aminoácidos. Mudanças na intensidade do pico em torno de 280 nm podem indicar oxidação ou degradação desses aminoácidos aromáticos. Além disso, mudanças na absorvância na faixa visível (400-700 nm), particularmente em torno de 560 nm, podem sugerir a formação de nitrocompostos ou outros

cromóforos resultantes de interações com RONS. O óxido nítrico (NO) e espécies relacionadas podem reagir com compostos aromáticos para formar nitrocompostos aromáticos, que possuem características de absorvância distintas.

Proteínas no DMEM podem sofrer oxidação, levando a mudanças nos perfis de absorvância UV-Vis. A oxidação pode resultar na formação de novos cromóforos ou na degradação dos existentes. A diminuição da absorvância em torno de 560 nm com o aumento do tempo de ativação do plasma pode indicar oxidação ou desnaturação de proteínas. O efeito do tempo de ativação é claramente visível na diminuição progressiva da absorvância nessa região (**Figura 29b**). Quanto maior o tempo de ativação (de 1 para 3 minutos), maior é a diminuição da absorvância em torno de 560 nm, sugerindo um aumento na quantidade de RONS e, conseqüentemente, um maior grau de modificação química no DMEM. Este efeito indica que a interação do plasma com o meio é dependente do tempo, com maior exposição resultando em mudanças mais significativas na composição química do DMEM.

4.3.5 Análise dos espectros UV-Vis do meio RPMI tratado por plasma

Por outro lado, os espectros UV-Vis do meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) ativado por plasma de DBD de superfície traz consigo informações valiosas sobre as mudanças químicas ocorridas devido ao tratamento com plasma (**Figura 30**). A ativação por plasma de DBD no meio RPMI gera espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) e ozônio (O_3). Essas espécies podem ser inferidas indiretamente pelas mudanças nos espectros de absorvância, especialmente na faixa UV (abaixo de 400 nm). No espectro, observa-se um pico proeminente em torno de 280 nm, que pode ser atribuído a aminoácidos aromáticos como triptofano, tirosina e fenilalanina. A diminuição ou modificação na intensidade desse pico pode indicar a oxidação ou degradação desses compostos devido ao tratamento com plasma. Mudanças na intensidade desse pico ao longo dos dias de envelhecimento e diferentes tempos de ativação sugerem que as modificações químicas induzidas pelo plasma são persistentes e dependem do tempo de ativação.

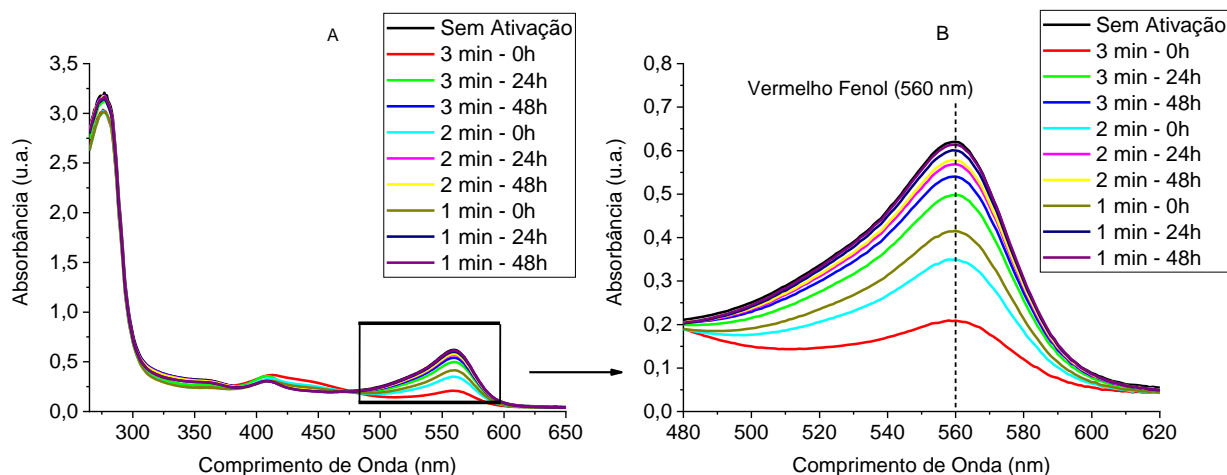


Figura 30 – (a) Espectros UV-Vis do PAM (RPMI) para 1, 2 e 3 minutos de ativação, com 3 tempos consecutivos de envelhecimento, (b) detalhe da variação da absorção em torno de 560 nm.

Além disso, mudanças na absorbância na faixa visível (480-620 nm), especialmente em torno de 560 nm, podem indicar a formação de nitrocompostos ou outros cromóforos como resultado das interações com RONS. A absorção em torno de 560 nm é reduzida com o aumento do tempo de ativação, indicando uma maior formação de nitrocompostos ou a degradação de moléculas coloridas presentes no meio. Proteínas presentes no meio RPMI podem sofrer oxidação, resultando em mudanças no perfil de absorbância UV-Vis. A oxidação de proteínas pode levar à formação de novos cromóforos ou à degradação dos existentes. A diminuição progressiva da absorbância em torno de 560 nm com o aumento do tempo de ativação sugere que as proteínas no meio estão sendo modificadas ou degradadas devido à interação com os RONS.

Já para os espectros obtidos para o PAM decorrente de meio RPMI, nota-se que há uma diferença considerável nessa faixa de comprimento de onda, como visto na **Figura 30**. A diferença entre os PAM's produzidos de meios de cultura diferentes é nítida neste momento, demonstrando comportamentos distintos em um mesmo comprimento de onda. O meio de cultura RPMI mostra-se mais suscetível a alterações em um mesmo período de ativação em relação ao DMEM. Esses dois meios de cultura possuem em sua formulação o fenol vermelho, cuja absorbância é sensível ao pH. Quando o valor do pH diminui, o vermelho de fenol torna-se amarelo e apresenta maior absorvância a 415 nm. Quando o valor do pH aumenta, o vermelho de fenol fica roxo e a absorbância a 560 nm aumenta.

O efeito do tempo de ativação é claramente visível na diminuição da absorbância na região de 560 nm (115). Quanto maior o tempo de ativação (de 1 a 3 minutos), maior é a diminuição

da absorvância, indicando um aumento na quantidade de RONS gerados e, conseqüentemente, um maior grau de modificação química no RPMI. A análise ao longo dos dias de envelhecimento mostra que essas mudanças são estáveis ao longo do tempo, sugerindo que os efeitos do plasma não são temporários, mas sim persistentes. O tratamento com plasma pode levar à formação de metabólitos secundários, que exibem picos de absorvância distintos. Estes metabólitos resultam de interações complexas entre RONS e moléculas orgânicas presentes no meio RPMI. A presença desses metabólitos pode ser inferida pelas mudanças no espectro de absorvância ao longo dos diferentes tempos de ativação e dias de envelhecimento.

4.3.6 Análise das RONS na PAW e nos PAMs

Com o intuito de confirmar a presença de Nitrito, Nitrato e Peróxido de Hidrogênio depositados na PAW pelo plasma, foram medidas as concentrações dessas espécies reativas por meio de fitas reagentes de Nitrito, Nitrato e Peróxido de Hidrogênio, como pode ser visto pela **Tabela 4**. Desta forma, é possível observar o aumento de espécies reativas conforme o aumento de tempo de ativação. Porém, essas mesmas amostras foram monitoradas durante 24h e 48h após a ativação, a fim de confirmar a diminuição de RONS com o decorrer do tempo, como foi mostrado através das análises UV-Vis. Essa análise está presente juntamente com o primeiro momento medido após a ativação das amostras, na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Concentração de Nitrito, Nitrato e Peróxido de Hidrogênio na PAW após tempo de ativação (1 min, 2 min e 3 min) e do tempo de monitoramento após a ativação (0h, 24h e 48h)

Plasma Activated Water - PAW	Tempo de monitoramento após ativação	Tempo de ativação		
		1 min	2 min	3min
Nitrito	0h	1 mg/L	1~5 mg/L	5 mg/L
	24h	0 mg/L	1 mg/L	1~5 mg/L
	48h	0 mg/L	0 mg/L	0 mg/L
Nitrato	0h	10 mg/L	25 mg/L	100 mg/L
	24h	0~10 mg/L	10~25 mg/L	50 mg/L
	48h	0~10 mg/L	10 mg/L	25~50 mg/L
Peróxido de Hidrogênio	0h	10 mg/L	10~25 mg/L	25 mg/L
	24h	5~10 mg/L	10 mg/L	10~25 mg/L
	48h	5 mg/L	5~10 mg/L	10 mg/L

Tendência semelhante aconteceu também no DMEM e no RPMI ativados pelo plasma, ativados em 1, 2 e 3 min, como pode ser visto pela **Tabela 4**, respectivamente. Desta forma, foi também possível observar o aumento de espécies reativas conforme o aumento de tempo de ativação e, ao contrário da PAW, houve maior conservação das espécies nos líquidos ao decorrer do tempo.

Assim como as concentrações de Nitrito, Nitrato e Peróxido de Hidrogênio encontrados para PAW, neste caso para o DMEM foram encontradas concentrações de Nitrato e Peróxido de Hidrogênio similares. Porém, é possível observar que para Nitrito, os valores são relativamente mais altos. Além disso, quando observados os acompanhamentos de 24h e 48h, é vista uma menor redução nas concentrações de NO_2^- , NO_3^- e H_2O_2 , ocorrendo um decaimento menor para todas as medições realizadas. Além do mais, cabe ressaltar que para ambos os meios de cultura, os valores iniciais para NO_2^- , NO_3^- e H_2O_2 sem ativação foram considerados como 0, uma vez que não demonstram reação com as fitas colorimétricas quando em contato com os meios sem ativação.

Quando comparada a **Tabela 4** com a **Tabela 5**, nota-se também uma concentração maior de NO_2^- nas duas últimas figuras. Isso ocorre pois o plasma, ao reagir com os aminoácidos presentes nos meios de cultura utilizados, pode gerar NO_2^- . (116)

Tabela 5 – Concentração de Nitrito, Nitrato e Peróxido de Hidrogênio nos PAM's após tempo de ativação (1 min, 2 min e 3 min) e do tempo de monitoramento após a ativação (0h, 24h e 48h)

PAM - DMEM	Tempo de monitoramento após ativação	Tempo de ativação		
		1 min	2 min	3min
Nitrito	0h	10 mg/L	20 mg/L	40 mg/L
	24h	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
	48h	1 mg/L	5 mg/L	10~20 mg/L
Nitrato	0h	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
	24h	10 mg/L	25~50 mg/L	50~100 mg/L
	48h	0~10 mg/L	25 mg/L	50 mg/L
Peróxido de Hidrogênio	0h	10 mg/L	10~25 mg/L	25 mg/L
	24h	5~10 mg/L	10~25 mg/L	10~25 mg/L
	48h	5 mg/L	10 mg/L	10~25 mg/L
PAM - RPMI	Tempo de monitoramento após ativação	Tempo de ativação		
		1 min	2 min	3min
Nitrito	0h	10 mg/L	10~20 mg/L	20 mg/L
	24h	5~10 mg/L	10~20 mg/L	10~20 mg/L
	48h	5 mg/L	10 mg/L	10~20 mg/L
Nitrato	0h	100~250 mg/L	100~250 mg/L	250~500 mg/L
	24h	100~250 mg/L	100~250 mg/L	250~500 mg/L
	48h	100 mg/L	100~250 mg/L	100~250 mg/L
Peróxido de Hidrogênio	0h	10 mg/L	20 mg/L	25 mg/L
	24h	8 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
	48h	5 mg/L	8 mg/L	15 mg/L

Diferente do PAM produzido utilizando o meio DMEM, o uso do meio RPMI resultou em um comportamento significativamente distinto, com níveis de nitrato consideravelmente mais altos, enquanto a produção de nitrito foi menor em comparação com a concentração obtida com o DMEM (**Figura 32**). Isso corrobora com a complexidade de estudo do PAM relatado pela revisão de Woedtke et al., que cita a diferença notada na facilidade de reprodutibilidade de estudos relacionados a PAW, enquanto para o PAM, seu estudo ainda é um desafio devido à sua complexa composição. Essa diferença entre os meios pode também ser notada na **seção 4.2.2**, onde os parâmetros físico-químicos demonstram essa variação entre os meios. (3)

A **Figura 32** ilustra as concentrações de nitrito, nitrato e peróxido de hidrogênio no PAM produzido a partir dos meios DMEM e RPMI, medidas em diferentes tempos de ativação (1, 2 e 3 minutos) e após 0, 24 e 48 horas. No DMEM, a concentração de nitrito aumenta significativamente com o tempo de ativação, atingindo 1,84 mg/L após 3 minutos, mas diminui ao longo do tempo de envelhecimento, sugerindo degradação ou reações subsequentes. Em contraste, o RPMI apresenta concentrações de nitrito menores, com um máximo de 0,92 mg/L após 3 minutos de ativação, também decrescendo com o tempo. Para os nitratos, o DMEM mostra uma concentração inicial alta, alcançando 12,4 mg/L após 3 minutos de ativação, que diminui para cerca de 6,2 mg/L após 24 e 48 horas. O RPMI, por outro lado, registra concentrações de nitrato significativamente mais altas, atingindo 24,8 mg/L após 3 minutos e diminuindo para 12,4 mg/L ao longo do tempo, indicando uma maior formação de nitratos no RPMI durante a ativação por plasma.

As concentrações de peróxido de hidrogênio aumentam com o tempo de ativação em ambos os meios. No DMEM, a concentração atinge 0,85 mg/L após 3 minutos, decrescendo ligeiramente para 0,68 mg/L após 48 horas. O RPMI apresenta um comportamento semelhante, com 0,68 mg/L logo após a ativação e uma redução para 0,51 mg/L após 48 horas. Em resumo, o RPMI tende a produzir concentrações mais altas de nitrato, enquanto o DMEM gera mais nitrito. As concentrações de peróxido de hidrogênio são similares entre os meios, com o DMEM mantendo níveis ligeiramente mais altos após 48 horas. Essas diferenças refletem a influência das distintas composições químicas dos meios de cultura na formação e estabilidade das espécies reativas geradas pela ativação por plasma.

4.4 Ensaio de Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade são técnicas *in vitro* cruciais para avaliar a segurança e eficácia de novos compostos e tratamentos. Esses ensaios são amplamente utilizados para

validar e classificar o nível de toxicidade de substâncias em diferentes tipos de células. Os resultados a seguir remetem aos ensaios de citotoxicidade realizados com as células B16F10-Nex2 (melanoma metastático) e L929 (fibroblastos) utilizando o reator SDBD.

4.4.1 Ensaio Direto

Nos ensaios diretos, as células são expostas diretamente ao plasma, permitindo uma interação imediata com as espécies reativas geradas pelo tratamento. Para as células B16F10, a viabilidade celular foi medida após 24h e 48h de tratamento utilizando o ensaio MTT, com tempos de exposição ao plasma de 1, 2 e 3 minutos.

Para as células B16F10, a viabilidade celular diminuiu significativamente após a aplicação direta do CAP. Após 1 minuto de exposição, a redução na viabilidade não foi suficiente para ser considerada citotóxica (<70%), conforme a norma ISO 10993-5. No entanto, com 2 minutos de tratamento, a viabilidade caiu para níveis citotóxicos, atingindo cerca de 50% no tratamento direto. O tratamento direto de 3 minutos resultou em uma viabilidade de aproximadamente 30% após 24h e 13% após 48h, indicando uma alta citotoxicidade e eficácia do tratamento ao longo do tempo, como pode ser visto na **Figura 31**. Tal fato corrobora com os dados obtidos por Jo et. al, onde seus dados, quando comparadas as viabilidades celulares entre 24h e 48h, mostram que em 48h a viabilidade foi reduzida significativamente, obtendo uma redução aproximada da metade do valor de viabilidade de 24h. (116)

Para os fibroblastos L929, a viabilidade celular não atingiu níveis citotóxicos em nenhum dos tempos de tratamento direto. Porém, para 3 minutos de exposição direta, a viabilidade celular se aproximou do limiar tóxico, sugerindo uma maior sensibilidade das células L929 a tempos mais prolongados de tratamento direto e, se levado em consideração o desvio padrão, este parâmetro pode ser considerado já citotóxico.

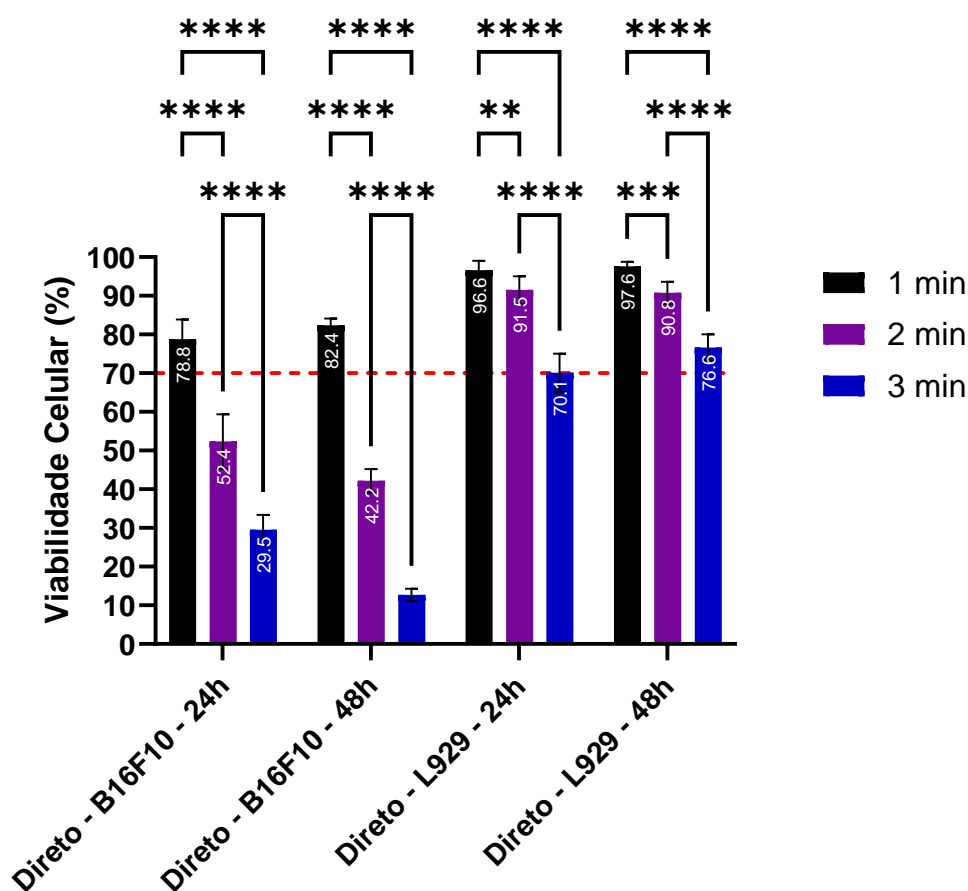


Figura 31 – Viabilidade celular em função do tempo de ativação de 1 min, 2 min e 3 min após 24h e 48h da ativação para o método direto em células B16F10 e L929. Os resultados foram fornecidos através da média \pm SD (n = 10) Two-way ANOVA com nível de confiança de 95% (** p = 0,0081, *** p = 0,0003 **** p = < 0,0001)

4.4.2 Ensaio Indireto

Nos ensaios indiretos, o meio de cultura é previamente ativado pelo plasma em uma outra placa de cultura celular de 24 poços antes de ser aplicado às células, permitindo que apenas espécies reativas de vida longa interajam com as células.

Para as células B16F10, a viabilidade celular também diminuiu significativamente com o tratamento indireto. Após 2 minutos de tratamento indireto, a viabilidade celular reduziu para níveis citotóxicos, com uma maior redução observada após 48h. O tratamento indireto de 3 minutos resultou em viabilidades de 51,6% após 24h e níveis semelhantes ao tratamento direto após 48h, indicando que espécies reativas de vida longa têm um papel crucial na citotoxicidade do plasma.

Para as células L929, o tratamento indireto resultou em uma redução muito menor na viabilidade celular. Mesmo após 3 minutos de exposição indireta, a viabilidade permaneceu alta, com mínima de 79% após 24h e 77% após 48h, indicando que células saudáveis são menos afetadas pelo tratamento indireto, como demonstra a **Figura 32**.

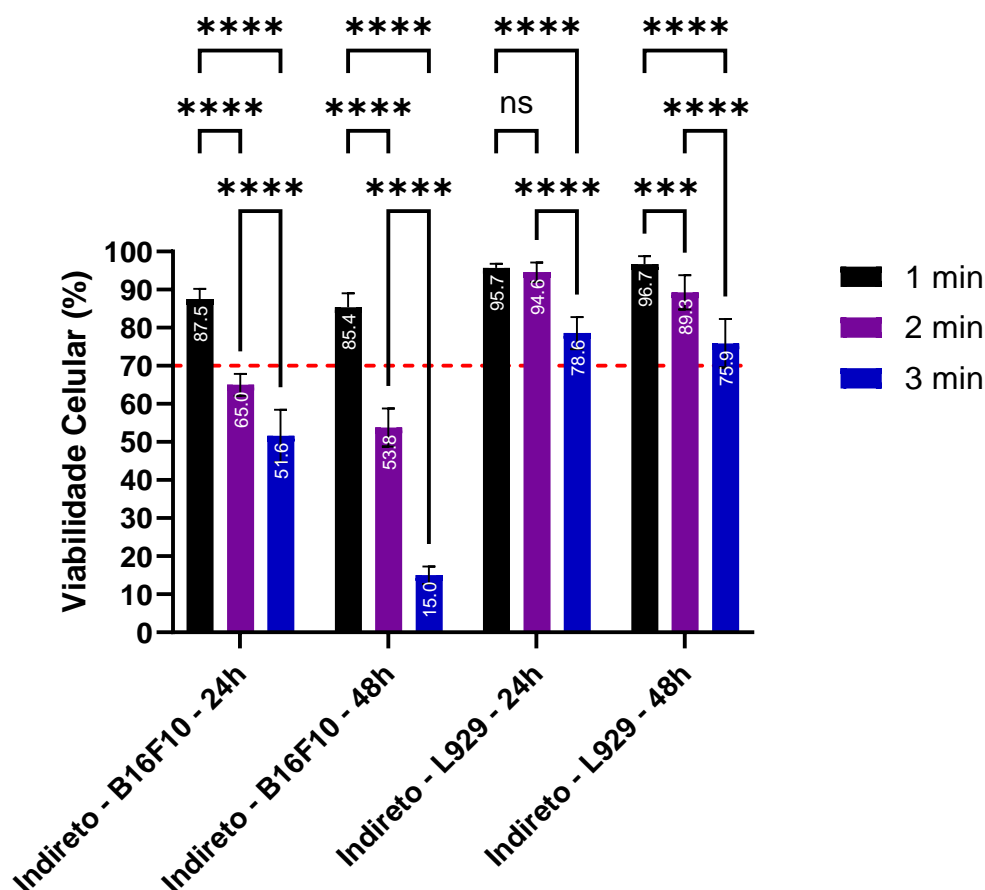


Figura 32 – Viabilidade celular em função do tempo de ativação de 1min, 2min e 30min após 24h e 48h da ativação para o método indireto em células B16F10 e L929. Os resultados foram fornecidos através da média \pm SD (n = 10) Two-way ANOVA com nível de confiança de 95% (ns = não há significância, *** p = 0,0002 **** p = < 0,0001)

4.4.3 Comparação entre os ensaios diretos e indiretos

A comparação entre os métodos diretos e indiretos de aplicação do CAP, presentes nas **Figuras 31 e 32**, revela diferenças significativas na eficácia e seletividade do tratamento entre as células saudáveis e cancerígenas, assim como relatado em (3,87,88).

Em termos de eficácia, o método direto mostrou maior eficácia na redução da viabilidade das células B16F10, especialmente após 48h. Isso pode ser atribuído à maior concentração de espécies reativas de curta vida e fatores físicos, como a radiação UV,

diretamente impactando as células. O método indireto, embora menos eficaz inicialmente, ainda mostrou uma redução significativa na viabilidade celular das B16F10, especialmente após 48h, sugerindo que as espécies de longa vida, como NO_2^- , NO_3^- e H_2O_2 encontrados durante as análises colorimétricas do PAM, possuem alta relevância para o efeito antitumoral do PAM. Isso se dá pelo fato de células cancerígenas possuírem uma expressão aumentada de aquaporinas, além de estarem sob estresse oxidativo e possuir um nível basal relativamente alto de RONS, sendo assim, uma mesma concentração de RONS para ambas as células pode ser significativamente letal para células cancerígenas. (3,117)

Além disso, assim como relatado em outros estudos, as RONS podem significativamente afetar células cancerígenas. Como relatado no estudo de Sato et al, onde células HeLa foram afetadas pelo PAM (118), ou como observado em Tanaka et al, onde o PAM causou morte seletiva em células de glioblastoma, condizentes com apoptose. (63)

Na busca pela compreensão dos mecanismos seletivos antitumoral do PAM, em um estudo Kurake et. al (2016) sugere que H_2O_2 apresenta um efeito de eliminação de células cancerígenas, sendo potencializado sinergicamente pelo NO_2^- . Além de poderem gerar peroxinitrito (ONOO^-) ou outras espécies reativas desconhecidas durante a ativação do meio, no caso do estudo em questão, o DMEM, devido a sua rica composição. (119) Além disso, também é apontado que o H_2O_2 atua como um dos principais fatores anticancerígenos no PAM, quando utilizado meio de cultura sem um eliminador de H_2O_2 , o piruvato de sódio, como foi o caso. (120)

Além disso, quando levadas em consideração as análises colorimétricas dos PAMs, a susceptibilidade do meio de cultura RPMI (meio celular utilizado nas células cancerígenas) para absorção de maior quantidade de Nitrato também pode contribuir para uma maior inativação das células B16F10.

No que diz respeito à seletividade, ambos os métodos demonstraram alta seletividade, afetando significativamente as células cancerígenas B16F10 enquanto mantinham as células saudáveis L929 relativamente viáveis. A menor eficácia observada no método indireto para as células saudáveis destaca seu potencial aplicação em terapias que necessitam de maior seletividade e menor toxicidade para células não cancerígenas.

A análise dos resultados de citotoxicidade indica que o CAP pode ser uma abordagem promissora para o tratamento do câncer, oferecendo uma alta taxa de seletividade e minimizando os efeitos colaterais em tecidos normais. Ademais, a menor eficácia observada na aplicação indireta pode ser explicada pela menor quantidade ou ausência de espécies de vida curta presentes no líquido. No entanto, mesmo a aplicação indireta mostra uma redução

significativa da viabilidade celular com tempos de exposição mais longos, o que pode ser vantajoso para aplicações clínicas onde o contato direto do tumor com o plasma pode ser difícil.

4.5 Mecanismos de ação dos tratamentos direto e indireto

4.5.1 Mecanismo de Ação do Tratamento Direto

No tratamento direto, as células são expostas diretamente ao plasma, o que implica a interação imediata com as RONS de vida curta e longa, bem como com outros fatores físicos, como a radiação UV e a emissão de elétrons energizados (veja Figura 5). (8,10,17,117,121,122) Esse contato direto resulta em uma série de reações químicas e físicas que danificam as células cancerígenas.

1. **RONS de Vida Curta e Impacto Imediato:** A exposição direta ao plasma permite que espécies altamente reativas como os radicais OH, O, e espécies excitadas de N_2^+ e NO causem danos imediatos às membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos das células cancerígenas. Essas espécies de vida curta são particularmente eficazes na indução de peroxidação lipídica e danos ao DNA, levando à apoptose ou necrose celular. (121)
2. **Radiação UV e Efeito Físico:** A radiação UV gerada pelo plasma também contribui para o dano celular, causando rompimento de cadeias de DNA e gerando espécies reativas secundárias, amplificando o estresse oxidativo nas células. Esse efeito é particularmente acentuado em células cancerígenas, que já estão sob estresse oxidativo, tornando-as mais suscetíveis aos danos induzidos pelo plasma. (10)
3. **Potencialização do Efeito Citotóxico em Células B16F10:** As células cancerígenas B16F10, devido à sua alta expressão de aquaporinas e ao ambiente oxidativo intrínseco, são mais vulneráveis à ação das RONS. A rápida entrada de H_2O_2 e outras espécies através das aquaporinas pode aumentar o estresse oxidativo, resultando em apoptose seletiva das células cancerígenas. (121,122)
4. **Impacto Menor nas Células L929:** Embora as células saudáveis L929 também estejam expostas ao plasma, sua menor suscetibilidade ao estresse oxidativo e a menor permeabilidade celular para RONS limitam o impacto citotóxico, mantendo a viabilidade celular mais alta em comparação com as células cancerígenas. (3)

4.5.2 Mecanismo de Ação do Tratamento Indireto

No tratamento indireto, o meio de cultura é previamente ativado pelo plasma, e apenas as espécies reativas de vida longa, como H_2O_2 , NO_2^- , NO_3^- , são transferidas para as células, resultando em um efeito citotóxico mais controlado e específico (**Figura 33**) (121).

1. **Acúmulo e Liberação de RONS de Vida Longa:** As RONS geradas no meio ativado, especialmente H_2O_2 , NO_2^- e NO_3^- , são estáveis o suficiente para interagir com as células ao longo do tempo. Essas espécies podem penetrar nas células cancerígenas e, devido ao seu alto estresse oxidativo, induzir danos seletivos ao DNA e mitocôndrias, promovendo apoptose. (121)
2. **Efeito Sinérgico do H_2O_2 e NO_2^- :** O H_2O_2 pode ser convertido em espécies mais reativas como o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) dentro das células, enquanto o NO_2^- pode reagir com outras espécies para formar peroxinitrito (ONOO^-), uma potente molécula citotóxica. A combinação dessas espécies amplifica o efeito antitumoral do tratamento indireto. (51)
3. **Diferença entre DMEM e RPMI:** O meio RPMI, devido à sua composição, mostrou maior absorção de NO_3^- , o que pode ter contribuído para uma maior eficácia na inativação das células B16F10. Já o DMEM, com menor capacidade de absorver NO_3^- , pode ter um efeito citotóxico menos pronunciado, mas ainda significativo devido ao H_2O_2 e NO_2^- .
4. **Preservação das Células L929:** As células saudáveis L929, ao serem expostas ao meio ativado, demonstram maior resistência às RONS de vida longa. A presença de antioxidantes e a menor permeabilidade para H_2O_2 e NO_2^- em células não cancerígenas podem explicar a menor citotoxicidade observada, destacando a seletividade do tratamento.

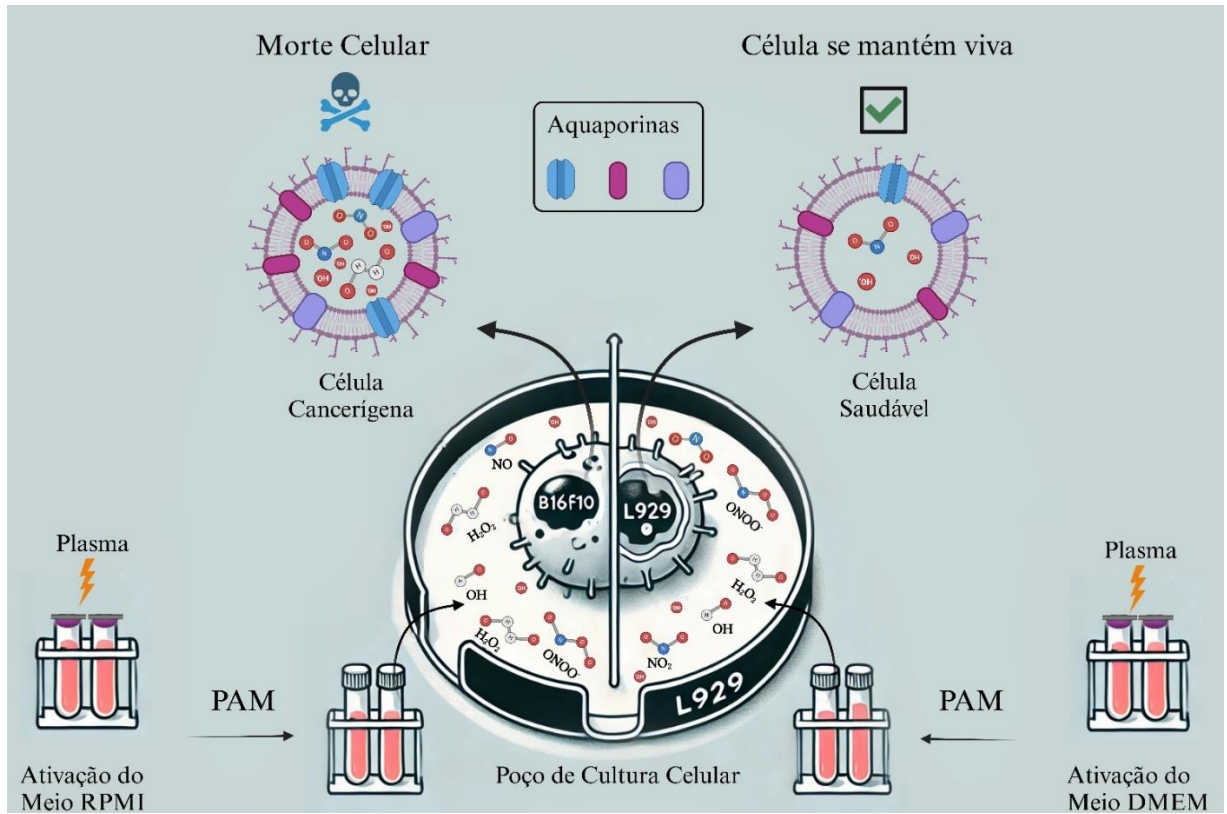


Figura 33 – Diferença do efeito do método indireto em células B16F10 e L929 e ação das espécies reativas de vida longa nas respectivas células.

5 Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que o plasma DBD de superfície possui um grande potencial terapêutico para o tratamento de células cancerígenas, especialmente as células B16F10. A caracterização térmica do plasma DBD garantiu a segurança para o uso em experimentos *in vitro*, mantendo a temperatura dentro de uma faixa segura para as culturas celulares, sem causar danos térmicos. As análises elétricas e óptica do plasma confirmaram a homogeneidade da aplicação do potencial e a presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), como NO, OH, e N_2^+ , que são cruciais para o efeito citotóxico observado.

A caracterização físico-química da água ativada por plasma (PAW) e dos meios de cultura ativados por plasma (PAMs) revelou comportamentos distintos entre os diferentes líquidos tratados. A PAW, com uma composição mais simples, apresentou uma diminuição significativa no pH e um aumento na condutividade elétrica e no ORP com o tempo de ativação. Em contrapartida, os meios de cultura, especialmente o RPMI, mostraram uma maior suscetibilidade à formação de nitratos, o que pode ter contribuído para os efeitos citotóxicos observados. As diferenças na composição dos PAMs, particularmente entre DMEM e RPMI, refletiram nas variações dos parâmetros físico-químicos como pH, ORP, condutividade e TDS, sugerindo uma maior complexidade na interação do plasma com líquidos complexos.

Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que o tratamento direto com plasma DBD foi mais eficaz na redução da viabilidade das células B16F10. Esse efeito pode ser atribuído à alta concentração de RONS de vida curta e à presença de fatores físicos, como a radiação UV, que são determinantes para o efeito antitumoral. O tratamento indireto, embora menos eficaz no curto prazo, também mostrou uma redução significativa da viabilidade das células B16F10 ao longo do tempo, destacando a importância das RONS de vida longa, como NO_2^- , NO_3^- e H_2O_2 , na citotoxicidade do plasma.

A comparação entre os métodos de tratamento direto e indireto evidenciou a alta seletividade do plasma DBD, que afetou significativamente as células cancerígenas, preservando a viabilidade das células saudáveis L929. Esta seletividade é um fator crítico para a aplicação clínica do plasma em terapias contra o câncer, minimizando os efeitos colaterais em tecidos normais.

Embora o tratamento direto tenha se revelado mais potente em comparação ao tratamento indireto, cabe ressaltar o tratamento indireto como método mais seguro para células saudáveis, levando em consideração este trabalho, uma vez que o mesmo foi capaz de causar dano

considerável a células cancerígenas sem se aproximar significativamente do limiar tóxico para células saudáveis.

Concluindo, o estudo demonstra que o plasma DBD de superfície, tanto em abordagens diretas quanto indiretas, possui um efeito antitumoral promissor. Sua capacidade de gerar e sustentar espécies reativas que são seletivamente citotóxicas para células cancerígenas sugere que o plasma DBD pode ser desenvolvido como uma terapia inovadora e menos invasiva para o tratamento de câncer. As diferenças na eficácia dos tratamentos direto e indireto, influenciadas pelas características dos meios de cultura, indicam a necessidade de otimizar as condições de tratamento e aprofundar a compreensão dos mecanismos seletivos de ação do plasma. No final, propusemos mecanismos de ação específicos para os métodos direto e indireto, considerando as características das duas linhas celulares estudadas, o que reforça o potencial do plasma DBD como uma ferramenta terapêutica eficaz e segura, aplicável em uma variedade de contextos clínicos.

6 Trabalhos Futuros

Com base nos resultados obtidos e nas observações realizadas no presente trabalho, a sugestão para trabalhos futuros é de:

- Estender os períodos de observação além de 48 horas, com o intuito de identificar efeitos tardios do tratamento com plasma em células cancerígenas e saudáveis.
- Realizar análises detalhadas de expressão gênica e proteômica para identificar as vias de sinalização celular afetadas pelo tratamento com plasma.
- Realizar ensaios de Citometria de Fluxo para análise dos ensaios microbiológicos, a fim de obter parâmetros físico-químicos com maior precisão para os efeitos do plasma nas células.
- Aumentar o tempo de exposição de tratamento para verificar uma possível inibição de 100% de células B16F10, sem causar dano considerável em células L929.
- Conduzir ensaios FTIR e RAMAN para distintos tempos de ativação nos meios RPMI e DMEM, a fim de observar possíveis alterações relevantes e levantar hipóteses que se sustentem para gerar novos estudos sobre a compreensão do PAM.
- Realizar um estudo comparativo entre diversos meios de cultura para construção de um estudo detalhado, algo que falta na literatura, segundo relatado também por Tanaka et al. (112)
- Testar o efeito do plasma em uma variedade maior de linhagens celulares cancerígenas, incluindo diferentes tipos de câncer e diferentes estados de malignidade.
- Realizar estudos em modelos animais para avaliar a eficácia e segurança do tratamento com plasma em um contexto mais complexo e próximo da realidade clínica.

7 Referências

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* maio de 2024;74(3):229–63.
2. Yin W, Wang J, Jiang L, James Kang Y. Cancer and stem cells. Vol. 246, *Experimental Biology and Medicine.* SAGE Publications Inc.; 2021. p. 1791–801.
3. Von Woedtke T, Laroussi M, Gherardi M. Foundations of plasmas for medical applications. *Plasma Sources Sci Technol.* 1º de maio de 2022;31(5).
4. Braný D, Dvorská D, Halašová E, Škovierová H. Cold atmospheric plasma: A powerful tool for modern medicine. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2020.
5. Bárdos L, Baránková H. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. Vol. 518, *Thin Solid Films.* 2010. p. 6705–13.
6. Kuchenbecker M, Bibinov N, Kaemling A, Wandke D, Awakowicz P, Viöl W. Characterization of DBD plasma source for biomedical applications. *J Phys D Appl Phys.* 2009;42(4).
7. Miranda FS, Tavares VKF, Gomes MP, Neto NFA, Chiappim W, Petraconi G, et al. Physicochemical Characteristics and Antimicrobial Efficacy of Plasma-Activated Water Produced by an Air-Operated Coaxial Dielectric Barrier Discharge Plasma. *Water (Switzerland).* 1º de dezembro de 2023;15(23).
8. Alizadeh E, Ptasińska S. Recent Advances in Plasma-Based Cancer Treatments: Approaching Clinical Translation through an Intracellular View. Vol. 1, *Biophysica.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2021. p. 48–72.
9. Privat-Maldonado A, Bogaerts A. Plasma in cancer treatment. Vol. 12, *Cancers.* MDPI AG; 2020. p. 1–3.

10. Kumar Dubey S, Dabholkar N, Narayan Pal U, Singhvi G, Kumar Sharma N, Puri A, et al. Emerging innovations in cold plasma therapy against cancer: A paradigm shift. Vol. 27, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2022. p. 2425–39.
11. Raud S, Raud J, Jõgi I, Piller CT, Plank T, Talviste R, et al. The Production of Plasma Activated Water in Controlled Ambient Gases and its Impact on Cancer Cell Viability. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 1º de setembro de 2021;41(5):1381–95.
12. Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, et al. Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemo-resistant ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One*. 18 de dezembro de 2013;8(12).
13. Faramarzi F, Zafari P, Alimohammadi M, Moonesi M, Rafiei A, Bekeschus S. Cold Physical Plasma in Cancer Therapy: Mechanisms, Signaling, and Immunity. Vol. 2021, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2021.
14. Saadati F, Mahdikia H, Abbaszadeh HA, Abdollahifar MA, Khoramgah MS, Shokri B. Comparison of Direct and Indirect cold atmospheric-pressure plasma methods in the B16F10 melanoma cancer cells treatment. *Sci Rep*. 1º de dezembro de 2018;8(1).
15. Ishikawa K, Takeda K, Yoshimura S, Kondo T, Tanaka H, Toyokuni S, et al. Generation and measurement of low-temperature plasma for cancer therapy: a historical review. Vol. 57, *Free Radical Research*. Taylor and Francis Ltd.; 2023. p. 239–70.
16. Srivastav M, Dony EC. A Review on Therapeutic Potential of Cold Atmospheric Plasma Therapy in Oral Cancer: Emerging Trends and Amelioration. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. 2023;
17. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied plasma medicine. Vol. 5, *Plasma Processes and Polymers*. 2008. p. 503–33.

18. Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, Van Dijk J, et al. Plasma medicine: An introductory review. Vol. 11, *New Journal of Physics*. 2009.
19. Laroussi M, Akan T. Arc-free atmospheric pressure cold plasma jets: A review. Vol. 4, *Plasma Processes and Polymers*. 2007. p. 777–88.
20. Fridman G. *Direct Plasma Interaction with Living Tissue*. 2008.
21. K. Huang. *Statistical Mechanics, 2a*, Wiley. 1987;
22. Thirumdas R, Kothakota A, Annapure U, Siliveru K, Blundell R, Gatt R, et al. Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. Vol. 77, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 21–31.
23. Tabares FL, Junkar I. Cold plasma systems and their application in surface treatments for medicine. *Molecules*. 1º de abril de 2021;26(7).
24. M.A Lieberman AJL. *PRINCIPLES OF PLASMA DISCHARGES AND MATERIALS PROCESSING*. 2005.
25. Chen Q, Li J, Li Y. A review of plasma-liquid interactions for nanomaterial synthesis. *J Phys D Appl Phys*. 23 de setembro de 2015;48(42).
26. Sakudo A, Yagyu Y, Onodera T. Disinfection and sterilization using plasma technology: Fundamentals and future perspectives for biological applications. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.
27. Tendero C, Tixier C, Tristant P, Desmaison J, Leprince P. Atmospheric pressure plasmas: A review. Vol. 61, *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. Elsevier; 2006. p. 2–30.

28. Milhan NVM, Chiappim W, Sampaio A da G, da Cruz Vegian MR, Pessoa RS, Koga-ito CY. Applications of Plasma-Activated Water in Dentistry: A Review. Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2022.
29. Sampaio A da G, Chiappim W, Milhan NVM, Botan Neto B, Pessoa R, Koga-Ito CY. Effect of the pH on the Antibacterial Potential and Cytotoxicity of Different Plasma-Activated Liquids. Int J Mol Sci. 1º de novembro de 2022;23(22).
30. Goldman' M, Goldman' A, Sigmond2 RS. The corona discharge, its properties and specific uses. Vol. 57, Pure & Appi. Chem. 1985.
31. Schütze A, Jeong JY, Babayan SE, Park J, Selwyn GS, Hicks RF. The Atmospheric-Pressure Plasma Jet: A Review and Comparison to Other Plasma Sources. Vol. 26, IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE. 1998.
32. Kogelschatz U. Atmospheric-pressure plasma technology. Em: Plasma Physics and Controlled Fusion. 2004.
33. Penkov O V., Khadem M, Lim WS, Kim DE. A review of recent applications of atmospheric pressure plasma jets for materials processing. J Coat Technol Res. 1º de março de 2015;12(2):225–35.
34. Cubas ALV, Machado MM, Pinto CRSC, Moecke EHS, Dutra ARA. Biodiesel production using fatty acids from food industry waste using corona discharge plasma technology. Waste Management. 1º de janeiro de 2016;47:149–54.
35. Fridman G, Brooks AD, Balasubramanian M, Fridman A, Gutsol A, Vasilets VN, et al. Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric-pressure plasma on bacteria. Plasma Processes and Polymers. 23 de maio de 2007;4(4):370–5.
36. Czemichowski A. Gliding arc. Applications to engineering and environment control. Vol. 66, Pure &Appl. Chern. 1994.

37. Lie L. Characteristics of Gliding Arc Discharge Plasma Characteristics of Gliding Arc Discharge Plasma * [Internet]. 2006. Disponível em: <http://iopscience.iop.org/1009-0630/8/6/06>
38. Wang W, Mei D, Tu X, Bogaerts A. Gliding arc plasma for CO₂ conversion: Better insights by a combined experimental and modelling approach. *Chemical Engineering Journal*. 2017;330:11–25.
39. Laroussi M. A Brief Note on the History of the Dielectric Barrier Discharge and Its Application for Biological Decontamination. *IEEE Trans Radiat Plasma Med Sci*. 1^o de janeiro de 2022;6(1):121–5.
40. Brandenburg R. Corrigendum: Dielectric barrier discharges: progress on plasma sources and on the understanding of regimes and single filaments (*Plasma Sources Science and Technology* (2017) 26 (053001) DOI: 10.1088/1361-6595/aa6426). Vol. 27, *Plasma Sources Science and Technology*. Institute of Physics Publishing; 2018.
41. Takaki K, Hatanaka Y, Arima K, Mukaigawa S, Fujiwara T. Influence of electrode configuration on ozone synthesis and microdischarge property in dielectric barrier discharge reactor. *Vacuum*. 4 de setembro de 2008;83(1):128–32.
42. Eliasson B, Egli W, Kogelschatz U. Modelling of dielectric barrier discharge chemistry. Vol. 66, *Pure & Appl. Chsm*. 1994.
43. Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology [Internet]. 2013. Disponível em: <http://www.medicalgasresearch.com/content/3/1/21>
44. Alves Junior C. Plasma frio atmosférico – novas oportunidades de pesquisa numa plataforma versátil e portadora de futuro. Vol. 25, *Revista Materia*. Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2020. p. 1–7.

45. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, et al. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. *PLoS One*. 12 de novembro de 2013;8(11).
46. Azzariti A, Iacobazzi RM, Di Fonte R, Porcelli L, Gristina R, Favia P, et al. Plasma-activated medium triggers cell death and the presentation of immune activating danger signals in melanoma and pancreatic cancer cells. *Sci Rep*. 1º de dezembro de 2019;9(1).
47. Kogelschatz U, Eliasson B, Egli W. Dielectric-barrier discharges. Principle and applications. *Journal De Physique IV : JP*. 1997;7(4):47–66.
48. Jiang B, Zheng J, Qiu S, Wu M, Zhang Q, Yan Z, et al. Review on electrical discharge plasma technology for wastewater remediation. Vol. 236, *Chemical Engineering Journal*. 2014. p. 348–68.
49. Adachi T, Tanaka H, Nonomura S, Hara H, Kondo SI, Hori M. Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial-nuclear network. *Free Radic Biol Med*. 2015;79:28–44.
50. Von Woedtke T, Oehmigen K, Brandenburg R, Hoder T, Wilke C, Hähnel M, et al. Plasma-liquid interactions: Chemistry and antimicrobial effects. Em: *NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology*. 2012. p. 67–78.
51. Dascalu A, Pohoata V, Shimizu K, Sirghi L. Molecular Species Generated by Surface Dielectric Barrier Discharge Micro-plasma in Small Chambers Enclosing Atmospheric Air and Water Samples. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 1º de janeiro de 2021;41(1):389–408.
52. Hoeben WFLM, van Ooij PP, Schram DC, Huiskamp T, Pemen AJM, Lukeš P. On the Possibilities of Straightforward Characterization of Plasma Activated Water. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 2019;39:597–626.
53. Julák J, Hujacová A, Scholtz V, Khun J, Holada K. Contribution to the Chemistry of Plasma-Activated Water. *Plasma Physics Reports*. 1º de janeiro de 2018;44(1):125–36.

54. Bradu C, Kutasi K, Magureanu M, Puač N, Živković S. Reactive nitrogen species in plasma-activated water: Generation, chemistry and application in agriculture. Vol. 53, Journal of Physics D: Applied Physics. Institute of Physics Publishing; 2020.
55. Anderson CE, Cha NR, Lindsay AD, Clark DS, Graves DB. The Role of Interfacial Reactions in Determining Plasma–Liquid Chemistry. Plasma Chemistry and Plasma Processing. 1º de novembro de 2016;36(6):1393–415.
56. Kamgang-Youbi G, Herry JM, Brisset JL, Bellon-Fontaine MN, Doubla A, Naïtali M. Impact on disinfection efficiency of cell load and of planktonic/adherent/ detached state: Case of *Hafnia alvei* inactivation by Plasma Activated Water. Appl Microbiol Biotechnol. dezembro de 2008;81(3):449–57.
57. Lindsay A, Anderson C, Slikboer E, Shannon S, Graves D. Momentum, heat, and neutral mass transport in convective atmospheric pressure plasma-liquid systems and implications for aqueous targets. J Phys D Appl Phys. 23 de setembro de 2015;48(42).
58. Bruggeman PJ, Kushner MJ, Locke BR, Gardeniers JGE, Graham WG, Graves DB, et al. Plasma-liquid interactions: A review and roadmap. Vol. 25, Plasma Sources Science and Technology. Institute of Physics Publishing; 2016.
59. Malyavko A, Yan D, Wang Q, Klein AL, Patel KC, Sherman JH, et al. Cold atmospheric plasma cancer treatment, direct: Versus indirect approaches. Vol. 1, Materials Advances. Royal Society of Chemistry; 2020. p. 1494–505.
60. Alberts B. Biologia Molecular da Célula.
61. Yoshikawa N, Liu W, Nakamura K, Yoshida K, Ikeda Y, Tanaka H, et al. Plasma-activated medium promotes autophagic cell death along with alteration of the mTOR pathway. Sci Rep. 1º de dezembro de 2020;10(1).

62. Chauvin J, Gibot L, Griseti E, Golzio M, Rols MP, Merbahi N, et al. Elucidation of in vitro cellular steps induced by antitumor treatment with plasma-activated medium. *Sci Rep*. 1º de dezembro de 2019;9(1).
63. Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, et al. Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase. Vol. 1, *Plasma Medicine*. 2011.
64. Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Hori M, Kikkawa F. Selective cytotoxicity of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma against ovarian clear-cell carcinoma. *Springerplus*. 30 de dezembro de 2014;3(1).
65. Xiang L, Xu X, Zhang S, Cai D, Dai X. Cold atmospheric plasma conveys selectivity on triple negative breast cancer cells both in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 20 de agosto de 2018;124:205–13.
66. De Carvalho Do Prado IA, Rodrigues Teodoro G, Khouri S. METODOLOGIA DE ENSINO DE MICROBIOLOGIA PARA ENSINO FUNDAMENTAL E MÉDIO [Internet]. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/resumo/res-met.html>
67. Bahrami N, Farzin A, Bayat F, Goodarzi A, Salehi M, Karimi R, et al. Optimization of 3D Alginate Scaffold Properties with Interconnected Porosity Using Freeze-drying Method for Cartilage Tissue Engineering Application. *Arch Neurosci*. 30 de julho de 2019;6(4).
68. Wolnicka-Glubisz A, Nogal K, Żądło A, Płonka PM. Curcumin does not switch melanin synthesis towards pheomelanin in B16F10 cells. *Arch Dermatol Res*. 1º de janeiro de 2015;307(1):89–98.
69. Rani U, Singh M, Saith A, Jain S, Aggarwal A, Aggarwal S. Evaluation of use of RPMI medium to preserve cell morphology for pleural/peritoneal fluid cytology. *J Cytol*. 2022;39(1):26.

70. Goldman L, Schafer AI. Goldman Cecil Medicina [Internet]. Elsevier Brasil; 2014. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=cc6GBAAAQBAJ>
71. Yuzhalin AE. Redefining cancer research for therapeutic breakthroughs. *Br J Cancer*. 2024;
72. Tagliaferri L, Lancellotta V, Fionda B, Mangoni M, Casà C, Di Stefani A, et al. Immunotherapy and radiotherapy in melanoma: a multidisciplinary comprehensive review. Vol. 18, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Taylor and Francis Ltd.; 2022.
73. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. Vol. 20, *Cancer Biology and Therapy*. Taylor and Francis Inc.; 2019. p. 1366–79.
74. Hartman RI, Lin JY. Cutaneous Melanoma—A Review in Detection, Staging, and Management. Vol. 33, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2019. p. 25–38.
75. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature*. 2003;3.
76. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: An awakening field. Vol. 14, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2014. p. 611–22.
77. Abbas O, Miller DD, Bhawan J. Cutaneous Malignant Melanoma: Update on Diagnostic and Prognostic Biomarkers [Internet]. 2014. Disponível em: www.amjdermatopathology.com
78. John. Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Eighth Edition Cancer Staging Manual. 2017;

79. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology*. 20 de dezembro de 2009;27(36):6199–206.
80. Kaufman HL, Kirkwood JM, Hodi FS, Agarwala S, Amatruda T, Bines SD, et al. The society for immunotherapy of cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. Vol. 10, *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2013. p. 588–98.
81. Haslam A, Prasad V. Estimation of the percentage of us patients with cancer who are eligible for and respond to checkpoint inhibitor immunotherapy drugs. Vol. 2, *JAMA Network Open*. American Medical Association; 2019.
82. Reginelli A, Vacca G, Zanaletti N, Troiani T, Natella R, Maggialetti N, et al. Diagnostic value/performance of radiological liver imaging during chemotherapy for gastrointestinal malignancy: A critical review. Vol. 90, *Acta Biomedica*. Mattioli 1885; 2019. p. 51–61.
83. Schae D, McBride WH. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. Vol. 12, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 527–40.
84. Chen W, Chiang CL, Dawson LA. Efficacy and safety of radiotherapy for primary liver cancer. Vol. 10, *Chinese Clinical Oncology*. AME Publishing Company; 2021.
85. Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality [Internet]. Vol. 8, *Oncotarget*. 2017. Disponível em: www.impactjournals.com/oncotarget/
86. Biscop E, Lin A, Van Boxem W, Van Loenhout J, De Backer J, Deben C, et al. Influence of cell type and culture medium on determining cancer selectivity of cold atmospheric plasma treatment. *Cancers (Basel)*. 1º de setembro de 2019;11(9).

87. Semmler ML, Bekeschus S, Schäfer M, Bernhardt T, Fischer T, Witzke K, et al. Molecular mechanisms of the efficacy of cold atmospheric pressure plasma (CAP) in cancer treatment. Vol. 12, *Cancers*. MDPI AG; 2020.
88. Aggarwal V, Tuli HS, Varol A, Thakral F, Yerer MB, Sak K, et al. Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. Vol. 9, *Biomolecules*. MDPI AG; 2019.
89. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. Vol. 6, *Redox Biology*. Elsevier B.V.; 2015. p. 260–71.
90. Ermak G, Davies KJA. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. Vol. 38, *Molecular Immunology*. 2001.
91. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. Vol. 15, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 411–21.
92. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. Vol. 4, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003. p. 552–65.
93. D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Vol. 43, *Cell Biology International*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 582–92.
94. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular 8ª EDIÇÃO*.
95. Oh JS, Szili EJ, Ogawa K, Short RD, Ito M, Furuta H, et al. UV-vis spectroscopy study of plasma-activated water: Dependence of the chemical composition on plasma exposure time and treatment distance. *Jpn J Appl Phys*. 1º de janeiro de 2018;57(1).
96. Liu Z, Zhou C, Liu D, He T, Guo L, Xu D, et al. Quantifying the concentration and penetration depth of long-lived RONS in plasma-activated water by UV absorption spectroscopy. *AIP Adv*. 1º de janeiro de 2019;9(1).

97. Tachibana K, Nakamura T. Comparative study of discharge schemes for production rates and ratios of reactive oxygen and nitrogen species in plasma activated water. *J Phys D Appl Phys.* 18 de julho de 2019;52(38).
98. Birkmann J, Pasel C, Luckas M, Bathen D. Uv spectroscopic properties of principal inorganic ionic species in natural waters. *Water Pract Technol.* 1º de dezembro de 2018;13(4):879–92.
99. Ashpis DE, Laun MC, Griebeler EL. Progress toward accurate measurement of dielectric barrier discharge plasma actuator power. Em: *AIAA Journal.* American Institute of Aeronautics and Astronautics Inc.; 2017. p. 2254–68.
100. Lehmann A, Pietag F, Arnold T. Human health risk evaluation of a microwave-driven atmospheric plasma jet as medical device. *Clin Plasma Med.* 1º de dezembro de 2017;7–8:16–23.
101. Machala Z, Janda M, Hensel K, Jedlovský I, Leštinská L, Foltin V, et al. Emission spectroscopy of atmospheric pressure plasmas for bio-medical and environmental applications. *J Mol Spectrosc.* junho de 2007;243(2):194–201.
102. Šimečková J, Krčma F, Kľofáč D, Dostál L, Kozáková Z. Influence of plasma-activated water on physical and physical-Chemical soil properties. *Water (Switzerland).* 1º de setembro de 2020;12(9).
103. Lommatzsch U, Pasedag D, Baalman A, Ellinghorst G, Wagner HE. Atmospheric pressure plasma jet treatment of polyethylene surfaces for adhesion improvement. Em: *Plasma Processes and Polymers.* 2007.
104. Molina R, Lalueza A, López-Santos C, Ghobeira R, Cools P, Morent R, et al. Physicochemical surface analysis and germination at different irrigation conditions of DBD plasma-treated wheat seeds. *Plasma Processes and Polymers.* 1º de janeiro de 2021;18(1).

105. Zaplotnik R, Primc G, Vesel A. Optical emission spectroscopy as a diagnostic tool for characterization of atmospheric plasma jets. Vol. 11, Applied Sciences (Switzerland). MDPI AG; 2021. p. 1–22.
106. Lin CM, Chu YC, Hsiao CP, Wu JS, Hsieh CW, Hou CY. The optimization of plasma-activated water treatments to inactivate *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) on shell eggs. *Foods*. 2019;8(10).
107. Zhao YM, Patange A, Sun DW, Tiwari B. Plasma-activated water: Physicochemical properties, microbial inactivation mechanisms, factors influencing antimicrobial effectiveness, and applications in the food industry. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 1^o de novembro de 2020;19(6):3951–79.
108. Wu S, Zhang Q, Ma R, Yu S, Wang K, Zhang J, et al. Reactive radical-driven bacterial inactivation by hydrogen-peroxide-enhanced plasma-activated-water. *European Physical Journal: Special Topics*. 1^o de agosto de 2017;226(13):2887–99.
109. Copeland A, Lytle DA. Measuring the oxidation-reduction potential of important oxidants in drinking water. Vol. 106, *Journal - American Water Works Association*. American Water Works Association; 2014. p. E10–20.
110. Rathore V, Patel D, Butani S, Nema SK. Investigation of Physicochemical Properties of Plasma Activated Water and its Bactericidal Efficacy. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 1^o de maio de 2021;41(3):871–902.
111. Melo TF de, Rocha LC, Silva RP, Pessoa RS, Negreiros AMP, Sales Júnior R, et al. Plasma–Saline Water Interaction: A Systematic Review. Vol. 15, *Materials*. MDPI; 2022.
112. Tanaka H, Bekeschus S, Yan D, Hori M, Keidar M, Laroussi M. Plasma-treated solutions (Pts) in cancer therapy. Vol. 13, *Cancers*. MDPI AG; 2021.

113. Canal C, Fontelo R, Hamouda I, Guillem-Martí J, Cvelbar U, Ginebra MP. Plasma-induced selectivity in bone cancer cells death. *Free Radic Biol Med*. 1º de setembro de 2017;110:72–80.
114. Prysiazhnyi V, Slavicek P, Cernak M. Aging of plasma-activated copper and gold surfaces and its hydrophilic recovery after water immersion. *Thin Solid Films*. 1º de janeiro de 2014;550:373–80.
115. Sharma K, Fizet KJ, Montgomery KR, Smeltzer NA, Sikorski MH, Brown KG, et al. A simple colorimetric experiment using mammalian cell culture to study metabolism. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 1º de março de 2021;49(2):271–7.
116. Jo A, Joh HM, Bae JH, Kim SJ, Chung JW, Chung TH. Plasma-Activated Media Produced by a Microwave-Excited Atmospheric Pressure Plasma Jet Is Effective against Cisplatin-Resistant Human Bladder Cancer Cells In Vitro. *Int J Mol Sci*. 1º de janeiro de 2024;25(2).
117. Kim SJ, Chung TH. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Sci Rep*. 3 de fevereiro de 2016;6.
118. Sato T, Yokoyama M, Johkura K. A key inactivation factor of HeLa cell viability by a plasma flow. *J Phys D Appl Phys*. 21 de setembro de 2011;44(37).
119. Kurake N, Tanaka H, Ishikawa K, Kondo T, Sekine M, Nakamura K, et al. Cell survival of glioblastoma grown in medium containing hydrogen peroxide and/or nitrite, or in plasma-activated medium. *Arch Biochem Biophys*. 1º de setembro de 2016;605:102–8.
120. Li Y, Tang T, Lee H, Song K. Cold atmospheric pressure plasma-activated medium induces selective cell death in human hepatocellular carcinoma cells independently of singlet oxygen, hydrogen peroxide, nitric oxide and nitrite/nitrate. *Int J Mol Sci*. 1º de junho de 2021;22(11).

121. Sklias K, Sousa JS, Girard PM. Role of short- and long-lived reactive species on the selectivity and anti-cancer action of plasma treatment in vitro. *Cancers (Basel)*. 2 de fevereiro de 2021;13(4):1–31.
122. Yusupov M, Yan D, Cordeiro RM, Bogaerts A. Atomic scale simulation of H₂O₂ permeation through aquaporin: toward the understanding of plasma cancer treatment. *J Phys D Appl Phys*. 28 de março de 2018;51(12):125401.

FOLHA DE REGISTRO DO DOCUMENTO

1. CLASSIFICAÇÃO/TIPO DM	2. DATA 26 de agosto de 2024	3. REGISTRO N° DCTA/ITA/DM-078/2024	4. N° DE PÁGINAS 100
5. TÍTULO E SUBTÍTULO: Explorando o potencial terapêutico do plasma frio no tratamento de células B16F10: um estudo comparativo de abordagens diretas e indiretas.			
6. AUTOR(ES): Luan Gonçalves de Lima			
7. INSTITUIÇÃO(ÕES)/ÓRGÃO(S) INTERNO(S)/DIVISÃO(ÕES): Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA			
8. PALAVRAS-CHAVE SUGERIDAS PELO AUTOR: 1. Terapia do Câncer; 2. Meio de Cultura Ativado a Plasma; 3. Plasma frio atmosférico (CAP)			
9. PALAVRAS-CHAVE RESULTANTES DE INDEXAÇÃO: Plasmas (Física); Plasmas frios; Pressão atmosférica; Radiação ultravioleta; Câncer; Medicina; Físico-Química; Física.			
10. APRESENTAÇÃO: <input checked="" type="checkbox"/> Nacional <input type="checkbox"/> Internacional ITA, São José dos Campos. Curso de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Física. Área de Física de Plasmas. Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa; coorientador: Prof. Dr. Clodomiro Alves Júnior. Defesa em 20/08/2024. Publicada em 2024.			
11. RESUMO: O interesse crescente no uso do plasma frio à pressão atmosférica (CAP) como terapia contra o câncer tem ganhado destaque significativo recentemente. O CAP se apresenta como uma alternativa terapêutica promissora para o combate a tumores, graças à sua habilidade de induzir a morte seletiva de células tumorais. Descobertas mais recentes apontam que o plasma afeta as células cancerígenas não apenas de forma direta, mas também de maneira indireta, por meio do tratamento com meio ativado por plasma (PAM, <i>plasma activated medium</i>), preparado previamente. Diante disso, este estudo foca na utilização e caracterização do plasma de descarga de barreira dielétrica superficial (SDBD, <i>surface dielectric barrier discharge</i>) como possível tratamento para as células B16F10, um modelo celular amplamente utilizado para estudos de melanoma. O experimento contempla tanto abordagens de tratamento diretas quanto indiretas. Um plasma SDBD foi empregado em uma placa de 24 poços, onde células cancerígenas B16F10 foram cultivadas em meio RPMI, com densidade de 6.10^4 células/mL por poço e, a efeitos de comparação, células saudáveis L929 (fibroblastos) foram cultivadas em meio DMEM, com igual densidade por poço. No tratamento direto, o plasma SDBD foi aplicado diretamente sobre o meio de cultura que continha as células B16F10, variando os tempos de exposição entre 1, 2 e 3 minutos. Diferentemente da aplicação direta, o tratamento indireto consistiu na irradiação do meio de cultura, que, após ser exposto ao plasma, foi transferido para outra placa contendo as células. As propriedades físico-químicas do plasma SDBD gerado, incluindo a composição das espécies reativas, foram determinadas por meio de espectroscopia de emissão óptica (OES) e análises elétricas. Os PAM's, por sua vez, foram caracterizados utilizando espectrofotometria UV-Vis e um medidor multiparâmetros. A influência dos tratamentos com plasma SDBD na viabilidade celular foi avaliada em ambas as abordagens, direta e indireta, através do ensaio MTT, 24h e 48h após a ativação. Dentre os diferentes tempos de ativação testados, a exposição de 3 minutos mostrou ser a mais eficaz, resultando em uma redução de 13% na viabilidade celular para o método direto e de 15% para o indireto. A variação nos resultados entre os métodos direto e indireto e a diferença entre citotoxicidade para células L929 e B16F10 pode ser atribuída a certos fatores. O primeiro, pelo fato de células cancerígenas possuírem um nível aumentado de espécies reativas em seu interior, além do aumento do número de aquaporinas. O segundo, refere-se aos métodos de tratamento, pois, no tratamento direto, pelo menos três fatores são relevantes: espécies reativas de curta duração (O_3^- e OH), espécies de longa duração (H_2O_2 , NO_2^- , NO_3^- e HNO_2) e fatores físicos (radiação UV). Em contrapartida, no tratamento indireto, apenas as espécies de longa duração são consideradas.			
12. GRAU DE SIGILO: <input checked="" type="checkbox"/> OSTENSIVO <input type="checkbox"/> RESERVADO <input type="checkbox"/> SECRETO			