

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**SAMAYSA DE LIMA LINS**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM  
LQM168 E QUANTUM DOTS**

Maceió – AL

2020

**Samaysa de Lima Lins**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM  
LQM168 E QUANTUM DOTS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientação: Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino**

**Co orientação: Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino**

Maceió – AL

2020

**Catálogo na fonte Universidade  
Federal de Alagoas Biblioteca Central**

**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

L759s Lins, Samaysa de Lima.

Síntese e caracterização de lipossomas funcionalizados com LQM168 e quantum dots  
/ Samaysa de Lima Lins. – 2021.  
79 f. : il. color.

Orientador: Thiago Mendonça de Aquino.

Co-orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.

Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de  
Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 75-79.

1. Lipossomos. 2. Quinolinas. 3. Eletroquímica. I. Título.

CDU: 615.15



**Ata de Exame defesa de dissertação**

Aos **dezesete dias** do mês de fevereiro de **2020**, às treze horas e trinta minutos, reuniu-se na Sala do PPGQB/UFAL, a banca examinadora composta pelo docente doutor, Thiago Mendonça de Aquino, e pelas docentes doutoras. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, Camila Braga Dornelas e Fabrícia da Rocha Ferreira, para o exame de defesa da dissertação intitulada: "**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM LQM168 E QUATUM DOTS**", elaboradora pela mestranda **Samaysa de Lima Lins**, regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Nível Mestrado, sob a orientação do **Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino**, que presidiu os trabalhos. Após apresentação por 42 minutos, a mestranda foi arguida pela banca. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 15:30 horas, os examinadores consideram a dissertação () **APROVADA** OU () **APROVADA COM RESTRIÇÃO**, emitindo o seguinte parecer: Conforme sugestões da banca examinadora

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 16:35 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Mestrado, lavrei a presente ata que segue assinada pela Banca Examinadora e pela mestranda.

**Maceió, 17 de fevereiro de 2020**

**Presidente (Orientador):** Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino

**Coorientadora:** Profa. Dra. Fabiane Caxico De Abreu Galdino

**Examinadora Interna:** Profa. Dra. Camila Braga Dornelas

**Examinadora Externa:** Profa. Dra. Fabrícia da Rocha Ferreira

**Mestranda:** Samaysa de Lima Lins

Dedico este trabalho a minha família a quem eu amo incondicionalmente.

- + A minha mãe Lanuzia Maria de Lima minha fortaleza. meu maior exemplo de dedicação e perseverança,
- + Ao meu pai Célio Dias Lins (*in memoriam*) por me permitir conquistar o mundo através do conhecimento,
- + A minha irmã Aline de Lima Lins por todo o apoio e incentivo,
- + Aos meus sobrinhos Samuel e Lucas que são a alegria dos meus dias,
- + Ao meu vovozinho lindo Milton Vicente de Lima meu sinônimo de amor, carinho e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

“Não se amoldem ao padrão deste mundo, mas transformem-se pela renovação da sua mente, para que sejam capazes de experimentar e comprovar a boa, agradável e perfeita vontade de Deus.” (Romanos 12:2). Agradeço a Deus por seu infinito amor, por estar comigo em todos os momentos me dando força, sabedoria e por me mostrar o caminho a seguir quando tudo parece não ter sentido algum.

Aos meus pais Célio (*in memoriam*) e Lanúzia, agradeço por todo amor e dedicação. Os primeiros professores, sem sombra de dúvidas, são os nossos pais; eles são responsáveis por construir o nosso caráter, nos repassar os valores da vida e nos ensinam que através do amor, da humildade, da luta diária com honestidade e perseverança podemos transpor qualquer obstáculo, e vocês, mesmo sem ter tido a oportunidade de estudar, me ensinaram que o conhecimento é a maior riqueza que um ser humano pode ter. Amo vocês!

A minha irmã Aline, agradeço por todo apoio, por acreditar em meu trabalho e ser minha maior incentivadora através de suas atitudes diárias. Sua determinação em tudo o que se propõe a fazer nos motiva a sermos pessoas melhores.

Aos meus sobrinhos Samuel e Lucas, que me ensinam diariamente a ser uma pessoa melhor, e através de suas vidas me proporcionam experienciar o mais puro amor.

Aos meus irmãos paternos Sandro e Sérgio, agradeço por toda confiança, incentivo, atenção e carinho. Por serem essas pessoas maravilhosas que sempre lutam por nossa felicidade.

Ao meu avô Milton, patriarca da família Lima, agradeço do fundo do meu coração todo amor e carinho a mim conferido, por me ensinar que a maior riqueza que podemos ter nessa vida está nas coisas que vem do coração.

As minhas amigas do CEFET-AL Andressa, Edlaine, Edlla, Eveline, Gabriella, Laura, Maria Helena, Nara, Sendy, Ticiane e Vivianne, agradeço por todo apoio, incentivo e compreensão principalmente nos momentos que eu não pude ser tão presente devido as obrigações do dia a dia. O apoio de vocês durante esses 12 anos de amizade foi e é fundamental para que hoje eu chegasse até aqui.

Aos amigos Farmacêuticos Alessandro, Gabriele, Geraldo, Ilza Fernanda, Roberta e Pooline agradeço pela companhia diária durante os 5 anos de graduação. Cada um de vocês com sua forma de ser, de pensar e de agir contribuíram para a

minha formação. Nossa graduação foi bem mais além do que compartilhar os ensinamentos adquiridos em sala de aula. Com vocês eu pude aprender a amar e respeitar pessoas completamente diferentes de mim, com pensamentos e opiniões distintas, mas que me completam e me fazem ser quem eu sou hoje; obrigada por cada sorriso, por cada trabalho, por cada JRCF... por aquele misto de “não aguento mais você” com “cadê você que ainda não chegou?!” Sem vocês essa jornada não teria sentido algum.

Aos amigos do laboratório, Alysson, Ângladis, Anna Caroline, Emanuelle, Elvis, Fabrícia, Guimarães, Iago, João Cesar, João Palmeira, Leyllanne, Marilya, Renata, Sara agradeço por serem essas pessoas tão divertidas e que tornam os meus dias mais leves e felizes em meio às nossas lutas científicas. Obrigada por cada dúvida sanada, por cada problema resolvido, por cada conversa “altamente científica” realizada em nossa copa, obrigada pelas “arengas” e por tudo o que vivemos e que me faz acreditar que estou no caminho certo.

Aos amigos da UFAL, Aldy, Andresa, Camila, Daniel, Ivis, Jadriane, Jessika Lane, Jorge, Luís Paulo, Paulo, Sâmia, Tiago, por todo apoio durante essa fase. A ajuda de vocês diretamente e/ou indiretamente foi essencial para que pudesse chegar até aqui.

Aos amigos do HG, agradeço a cada um de vocês Ana Alice, Ambrosiete, Arthur, Chirlei, Erivandra, Ewandro, Fábio, João, Lavinya, Marcelo, Marciele, Michele, Nayara, Rosimeire, Thacylane por serem instrumentos de Deus em minha vida me dando forças para continuar firme na fé mesmo diante das adversidades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Thiago Aquino, agradeço pela confiança a mim conferida em poder fazer o mestrado sob sua orientação. Obrigada pelo seu SIM ainda no processo seletivo de mestrado em janeiro de 2018 e por toda confiança em meu trabalho durante esse tempo.

À minha co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiane Caxico, minha eterna gratidão, por toda paciência, por todos os ensinamentos, por sua alegria, pelos os puxões de orelha e conselhos, por ter acreditado em mim, por todo incentivo à pesquisa, por ser essa “mãezona” que a vida acadêmica me deu. Sem a sua dedicação e carinho por seus alunos e por sua profissão nada disso seria possível.

A FAPEAL e CAPES, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho, e a agência financiadora CNPq pelo apoio financeiro ao grupo.

## RESUMO

A indústria farmacêutica vem investido no desenvolvimento de novas estratégias para obtenção de fármacos e formas farmacêuticas a fim de promover uma quimioterapia mais segura e eficaz para o paciente. Uma nova estratégia que vem se destacando é a elaboração de moléculas híbridas com a finalidade de proporcionar um efeito farmacológico potencializado e uma diminuição da toxicidade; outra estratégia bastante utilizada é a associação de fármacos a sistemas carreadores a fim de promover uma melhora das propriedades físico-químicas da molécula, assim como proporcionar uma entrega direcionada. Com a intenção de promover o aumento da solubilidade e estabilidade da LQM168 (a qual apresenta núcleos quinolina e tiazolidina, com atividade antitumoral comprovada), o presente trabalho tem como objetivo sintetizar lipossomas e lipossomas funcionalizados com CdSe/CdS, associados a LQM168 e avaliar a formação dos conjugados. Os lipossomas catiônicos e os conjugados estudados foram sintetizados através do método de hidratação do filme lipídico e caracterizados utilizando AFM, UV-Vis e FTIR. Os estudos eletroquímicos para a LQM 168 foram realizados em meio aprótico (DMF+TBAP) e em meio prótico (PBS pH: 7,0) em um sistema eletroquímico constituído por 3 eletrodos (eletrodo de trabalho: carbono vítreo, referência: Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup>, contra eletrodo: fio de platina). Nos estudos de voltametria cíclica (VC), a LQM 168 apresentou um perfil eletroquímico de natureza reversível com valores de potencial redox favoráveis aos processos fisiológicos de transferências de elétrons ( $E_{pa}$ : -0,056V e  $E_{pc}$ : -0,085V). No comportamento da LQM168 frente ao ssDNA e o dsDNA por voltametria de pulso diferencial (VPD), foi observado uma interação da LQM168 com as bases guanina e adenina sem ocasionar a quebra da fita de dupla hélice do DNA; a LQM168 em presença de oxigênio não promoveu a geração de ERO's. Os estudos de interação entre a LQM 168 e os lipossomas por UV-Vis demonstraram o suprimento da banda em 315nm e um deslocamento batocrômico e hipocrômico da banda em 415nm; a interação da LQM168 com lipossomas por fluorescência foi possível avaliar pela diminuição da intensidade da fluorescência; por FTIR, a caracterização do complexo foi verificada pelo suprimento das bandas em 815 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento C-Cl e pela permanência da banda em 1477 cm<sup>-1</sup> referente ao metil na posição 4 do anel tiazolidínico. Os lipossomas unilamelares catiônicos são uma alternativa promissora para driblar os fatores físico-químicos da LQM168 permitindo o aumento da sua estabilidade e solubilidade em meio aquoso. O uso de lipossomas e lipossomas-CdSe/CdS se demonstraram eficazes para o aumento da solubilidade e estabilidade da LQ168; a avaliação da formação dos conjugados foi comprovada pelo uso das técnicas de AFM, FTIR e UV-vis pela observação das mudanças de morfologia e dos espectros obtidos respectivamente. Através das técnicas eletroquímicas foi possível propor um mecanismo redox para LQM168, classificar o comportamento eletroquímico e os processos eletródicos ocorridos, assim como avaliar possíveis mecanismos de ação que podem estar associados à molécula.

Palavras-chave: Lipossomas. Quinolina-tiazolidina. eletroquímica.

## ABSTRACT

The pharmaceutical industry has been investing in the development of new strategies for obtaining drugs and pharmaceutical forms safer and effective to promote more effective chemotherapy for the patient. A new strategy that stands out is the development of hybrid molecules for providing an improved pharmacological effect and a decrease in toxicity; another strategy is the association of drugs with carrier systems in order to promote an improvement in the physicochemical properties of the molecules as well a targeted delivery. To increase the solubility and stability of LQM168 (which presents quinoline and thiazolidine nuclei with proven antitumor activity), the present work aims to synthesize liposomes and liposomes functionalized with CdSe/CdS, associate with LQM168 and evaluate the formation of conjugates by microscopic, spectroscopic and electrochemical techniques. The cationic unilamellar liposomes and conjugates studied were synthesized by the hydration of lipid films method and characterized using AFM, UV-VIS and FTIR. Electrochemical studies for LQM 168 were performed in aprotic medium (DMF+TBAP) and in protic medium (PBS pH 7.0) in electrochemical system consisting on 3 electrodes (working electrode: glassy carbon; reference electrode: Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup>; counter electrode: platinum wire). In VC studies, LQM 168 presented a reversible electrochemical profile with redox potential values favorable to physiological electron transfer processes ( $E_{ap}$ : -0.056V and  $E_{cp}$ : -0.085V). In the behavior of LQM168 against ssDNA and dsDNA by VPD, an interaction of LQM168 with the guanine and adenine bases was observed without causing the DNA double strand break; in the presence of oxygen, LQM168 did not promote the generation of ERO's. Interaction studies between LQM168 and liposomes by UV-VIS presented the band supression at 315nm and a bathochromic and hypochromic band shift at 415nm; the complex formation was confirmed by FTIR due to a band supression at  $815\text{cm}^{-1}$  for the C-Cl stretching and the permanence of the band at  $1477\text{cm}^{-1}$  for the methyl in the position 4 of the ring. Cationic unilamellar liposomes are a promising alternative to overcome the physicochemical factors of LQM168 allowing increased stability and solubility in aqueous medium; The use of electrochemical techniques enable to propose a redox mechanism for LQM168, to classify the electrochemical behavior and the electrodic processes that occurred, as well to evaluate possible mechanisms of action that may be associated with the molecule.

Keywords: Unilamellar liposomes. Quinoline-thiazolidine. Electrochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mecanismo de síntese da LQM168. ....	20
<b>Figura 2</b> - Representação dos lipossomas e sua constituição. ....	23
<b>Figura 3</b> - Tipos de lipossomas que podem ser obtidos a partir do método clássico. ....	26
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática dos lipossomas convencionais e não convencionais. ....	27
<b>Figura 5</b> - Métodos eletroanalíticos .....	30
<b>Figura 6</b> - Aplicação de potencial para voltametria cíclica. (A) Potencial com varredura linear; (B) potencial com varredura em escada. ....	32
<b>Figura 7</b> - Representação esquemática do potencial aplicado e dos processos resultantes de voltametria cíclica. ....	32
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em VPD. Instrumentos analógicos (a), instrumentos digitais (b). ....	34
<b>Figura 9</b> - Estrutura química da LQM 168. ....	36
<b>Figura 10</b> - Método de preparação dos lipossomas. ....	39
<b>Figura 11</b> - Sistema utilizado nos estudos eletroquímicos. ....	41
<b>Figura 12</b> - Sistema eletroquímico utilizado no estudo da LQM 168 em presença de oxigênio. ....	43
<b>Figura 13</b> - Método de preparo do ssDNA. ....	44
<b>Figura 14</b> - Construção do biossensor de DNA. ....	46
<b>Figura 15</b> - Sistema utilizado nos estudos eletroquímicos do biossensor de dsDNA .....	46
<b>Figura 16</b> – Imagens de AFM dos lipossomas não conjugados .....	48
<b>Figura 17</b> – Imagens de AFM dos lipossomas conjugados com CdSe/CdS. ....	49
<b>Figura 18</b> – Imagens de AFM dos lipossomas conjugados com CdSe/CdS e LQM168. ....	50
<b>Figura 19</b> - Espectro de absorção de UV-Vis a LQM168 em diferentes concentrações – (A) LQM168 no tempo 0h; (B) LQM168 após 24h. ....	51
<b>Figura 20</b> - Espectro de absorção de UV-Vis dos conjugados – (A) LIPO:LQM168 e LIPO:QD:LQM168 no tempo 0h; (B) LIPO:LQM168 e LIPO:QD:LQM168 após 24h. ....	52

<b>Figura 21</b> - Espectro de UV-Vis para a formação do complexo LIPO:LQM168 em meio aquoso na proporção de 1:2 (m/m). (A) LIPO:LQM168 não sonificado; (B) LIPO:LQM168 sonificado. ....	52
<b>Figura 22</b> - Espectro de UV-Vis para a formação do complexo LIPO:QD:LQM168 em meio aquoso na proporção de 1:2 (m/m). (A) LIPO:QD:LQM168 não sonificado; (B) LIPO:QD: LQM168 sonificado. ....	53
<b>Figura 23</b> - Espectro de FTIR-ATR da LQM168.....	54
<b>Figura 24</b> - Espectro de FTIR-ATR para (A) Lipossomas não conjugados; (B) lipossomas-CdSe/CdS; (C) Lipossomas-LQM168; (D) Lipossomas-CdSe/CdS-LQM168 lipossomas.....	55
<b>Figura 25</b> - Voltamograma cíclico da LQM168, na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , a $100 \text{ mV s}^{-1}$ , em meio aprótico DMF/TBAP ( $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) vs. $\text{Ag AgCl Cl}^{-}(\text{sat.})$ ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), Eletrodo de trabalho: carbono vítreo.....	56
<b>Figura 26</b> - Mecanismo de oxirredução proposto para LQM168 em meio aprótico. ....	57
<b>Figura 27</b> - Voltamogramas cíclicos do comportamento eletroquímico da LQM168 ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em diferentes faixas de potenciais. Tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0; 20% de etanol PA; eletrodo de CV; $\nu = 0,10 \text{ V s}^{-1}$ . (a) Voltamograma cíclico da LQM168 de 0 a 1,0V. (b) Voltamograma cíclico da LQM168 de 0 a -1,0V. (c) Voltamograma cíclico da LQM168 de 0,3 a -0,3V. (d) Reversibilidade do sistema. ....	58
<b>Figura 28</b> - Mecanismo redox proposto para LQM168 em meio prótico. ....	59
<b>Figura 29</b> - Voltamogramas cíclicos da LQM168 ( $c = 4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em diferentes velocidades de varredura. Tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0; 20% de etanol PA (co-solvente); eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. ....	59
<b>Figura 30</b> - Análise da corrente de pico para a primeira onda de oxidação ( $I_{pa}$ ) da LQM168 em função da $\nu^{1/2}$ . ....	61
<b>Figura 31</b> - Análise da corrente de pico para a primeira onda de oxidação ( $I_{pa}$ ) da LQM168 em função da $\nu^{1/2}$ (A) De 20 a $100 \text{ mV s}^{-1}$ ; (B) De 200 a $1000 \text{ mV s}^{-1}$ .....	61
<b>Figura 32</b> - Análise da corrente de pico ( $I_{pa}$ ) para a primeira onda de oxidação para a LQM168 em função da $\nu / \text{Vs}^{-1}$ . ....	62
<b>Figura 33</b> - Análise da corrente de pico ( $I_{pa}$ ) para a primeira onda de oxidação para a LQM168 em função da $\nu / \text{Vs}^{-1}$ . ....	63

<b>Figura 34</b> - Gráfico de potencial de pico de primeira onda de oxidação em função do log v em meio prótico (Tampão fosfato pH: 7,0) para a LQM168. ....	64
<b>Figura 35</b> - Voltamogramas cíclicos para LQM168 ( $c = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) em meio aprótico DMF/TBAP ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) na presença de diferentes concentrações de oxigênio. Faixa de potencial= 0,6V a -0,3V; Eletrodo de carbono vítreo; $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ . ....	65
<b>Figura 36</b> - Voltamograma de Pulso Diferencial do ssDNA - (G) guanina e (A) adenina; tampão acetato pH= 4.5; Eletrodo de carbono vítreo; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	66
<b>Figura 37</b> - Voltamogramas de Pulso Diferencial do ssDNA na presença de diferentes concentrações de LQM168. Tampão acetato pH= 4.5; Eletrodo de carbono vítreo; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	66
<b>Figura 38</b> - Voltamogramas de pulso diferencial ssDNA:LQM168 em função do tempo. Tampão acetato pH = 4,5. [LQM 168]: $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}$ ; Eletrodo de carbono vítreo; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	67
<b>Figura 39</b> - Voltamogramas de pulso diferencial de dsDNA. Tampão acetato pH = 4,5; Eletrodo de carbono vítreo; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	68
<b>Figura 40</b> - Voltamogramas de pulso diferencial de dsDNA-LQM168 em diferentes concentrações. Tampão acetato pH = 4,5; Eletrodo de carbono vítreo; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	69
<b>Figura 41</b> - Voltamogramas de pulso diferencial dsDNA-LQM168 em função da variação do tempo. Tampão acetato pH = 4,5; Eletrodo de carbono vítreo; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	70
<b>Figura 42</b> - Voltamogramas de pulso diferencial do dsDNA sem oxidação das bases purínicas na presença de LQM168 ( $c = 4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em função da variação do tempo. Eletrodo de carbono vítreo; Tampão acetato pH = 4,5; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso ....	71
<b>Figura 43</b> - Imagem do biossensor de dsDNA na presença da LQM168 no início do experimento (A) e ao final do experimento. ....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Citotoxicidade da LQM168 em diferentes linhagens de célula de câncer humano. ....	20
<b>Tabela 2</b> - Citotoxicidade da LQM168 em diferentes linhagens celulares tumoral e não tumoral. ....	21
<b>Tabela 3</b> - Exemplos de fosfolídeos utilizados na preparação de lipossomas, suas temperaturas de transição de fase (T <sub>c</sub> ) e suas respectivas cargas. ....	24
<b>Tabela 4</b> - Classificação dos lipossomas de acordo com o seu tamanho e o número de bicamadas lipídicas. ....	25
<b>Tabela 5</b> - Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis, irreversíveis e quase reversíveis. ....	33
<b>Tabela 6</b> - Reagentes e solventes utilizados, seus respectivos fornecedores e grau de pureza. ....	37
<b>Tabela 7</b> - Parâmetros eletroquímicos encontrados para LQM168 em função do estudo de velocidade de varredura. <i>Epa</i> vs. Ag AgCl Cl <sup>-</sup> (sat.). ....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\nu$	Velocidade de varredura de potencial
A	Microampère
AFM	Microscopia de força atômica
CD	Quantum dot
CdSe/CdS	Seleneto de cádmio
DMF	N,N-Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice)
$E$	Potencial
$e^-$	Elétrons
$E_{1/2}$	Potencial de meia-onda
$E_p$	Potencial de pico
$E_{p_a}$	Potencial de pico anódico
$E_{p_c}$	Potencial de pico catódico
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
Fig.	Figura
FTIR-ATR	Espectrofotometria de infravermelho por Transformada de Fourier
GOV	Vesículas multilamelares gigantes
GUV	Vesículas unilamelares gigante
H <sub>2</sub> O	Água
HCT-116	Carcinoma de cólon
HL-60	Linhagem de célula leucêmica
$I$	Corrente
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
$I_{p_a}$	Corrente de pico anódica
$I_{p_c}$	Corrente de pico catódica
L-929	Fibroblasto de tecido subcutâneo
LIPO	Lipossomas
LOV	Vesículas multilamelares grandes
LQM 168	1-(Z)-etil-2-(2-(7-cloroquinolin-4-il)hidrazono)-4-metil-2,3-diidrotiazol-5-carboxilato
LUV	Vesículas unilamelares grandes

MLV	Vesículas multilamelares
MM	Massa molar
mV	Milivolts
mV/s	Millivolts por segundo
MVL	Lipossomas multivesiculares
N	Número de elétrons
PA	Pureza analítica
PC-3	Adenocarcinoma de próstata
pH	Potencial hidrogeniônico
RCV%	Redução da viabilidade celular
SF-295	Glioblastoma
SOV	Vesículas multilamelares pequenas
ssDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita simples
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
TBAP	Perclorato de tetrabutilamônio
T <sub>c</sub>	Temperatura de transição de fase
UV-Vis	Ultravioleta visível
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
$\Delta E$	Diferença de potencial

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2 LIPOSSOMAS COMO SISTEMA TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3 ELETROQUÍMICA</b> .....	<b>29</b>
1.3.1 Voltametria cíclica (VC) .....	31
1.3.2 Voltametria de Pulso Diferencial .....	33
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>35</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1 Reagentes e solventes</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2 Preparo de soluções</b> .....	<b>37</b>
<b>3.3 Síntese do nanocarreador</b> .....	<b>38</b>
3.3.1 Preparo dos lipossomas unilamelares catiônicos .....	38
3.3.2 Preparo dos lipossomas unilamelares antiônicos carregados com LQM168 e CdSe/CdS .....	39
<b>3.4 Caracterização DOS lipossomas conjugados com quantum dot e lqm168.</b> <b>40</b>	
3.4.1 Caracterização morfológica dos carreadores e conjugados por AFM .....	40
3.4.2 Caracterização físico-química dos carreadores e conjugados por UV-Vis .....	40
3.4.3 Caracterização físico-química dos carreadores e conjugados por FTIR-ATR .	40
<b>3.5 Estudos eletroquímicos</b> .....	<b>41</b>
3.5.1 Procedimento de limpeza do eletrodo de carbono vítreo .....	42
3.5.2 Perfil eletroquímico da LQM168 em meio aprótico.....	42
3.5.3 Perfil eletroquímico da LQM168 em meio prótico.....	42
3.5.4 Estudo de velocidade da LQM168 .....	43
3.5.5 Estudo de reatividade com oxigênio .....	43
3.5.6 Preparo e aplicação do biossensor de ssDNA .....	43
3.5.7 Preparo e aplicação do biossensor de dsDNA .....	45

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Estudo de caracterização dos lipossomas conjugados com quantum dot e lqm168.....</b>	<b>48</b>
4.1.1 Caracterização dos lipossomas conjugados por AFM .....	48
4.1.2 Caracterização dos lipossomas conjugados por UV-Vis.....	51
4.1.3 Caracterização dos lipossomas conjugados por FTIR .....	54
<b>4.2 Estudos eletroquímicos da lqm168 .....</b>	<b>56</b>
4.2.1 Comportamento eletroquímico da LQM168 em meio aprótico .....	56
4.2.2 Comportamento eletroquímico da LQM168 em meio prótico.....	57
4.2.3 Estudo de velocidade para LQM168 .....	59
4.2.4 Estudo em meio aprótico da LQM168 em presença de oxigênio por voltametria cíclica.....	64
4.2.5 Estudo de interação da LQM168 com ssDNA por voltametria de pulso diferencial .....	65
4.2.6 Estudo de interação da LQM168 com dsDNA por voltametria de pulso diferencial .....	68
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica investe intensamente em pesquisas com a finalidade de melhorar as características dos fármacos relacionadas a biodisponibilidade, na elaboração de formas farmacêuticas e vias de administração mais eficazes com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais, a toxicidade, garantir o efeito desejado e a segurança da quimioterapia para o paciente.

A produção de novos medicamentos atualmente é baseada na utilização de estratégias modernas capazes de planejar e desenvolver fármacos através do conhecimento das fisiopatologias das doenças, dos estudos das vias bioquímicas e da seleção dos alvos moleculares permitindo assim, o desenvolvimento de moléculas mais efetivas e seguras.

Uma nova estratégia de planejamento e desenvolvimento de fármacos que vem sendo bastante explorada é a hibridação molecular, a qual consiste na associação de dois grupos farmacofóricos em uma única molécula. A hibridação molecular permite a potencialização do efeito farmacológico, redução dos efeitos colaterais e diminuição da ingestão diária de medicamento pelo paciente, tornando a terapia medicamentosa mais cômoda e segura (CONTELLES et al., 2011; GEDIYA et al., 2009; TIETZE et al., 2003; VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

A hibridização molecular proveniente da associação de heterocíclicos como a quinolina e tiazolidina se demonstra uma alternativa interessante para o desenvolvimento de novos fármacos. Estes compostos heterocíclicos apresentam atividade farmacológica comprovada frente a vários tipos de patologias, e tem sido reportado como importantes agentes utilizados no desenvolvimento de novos derivados para a terapia do câncer (CHAVDA et al., 2010; KRAUSE et al., 2011; AFZAL et al., 2015; ASSATI et al., 2014).

No entanto, um grande problema associado a maioria dos fármacos e moléculas heterocíclicas está relacionado a baixa solubilidade e toxicidade dificultando as aplicações biológicas. Desta forma, a busca por metodologias que permitam o aumento biodisponibilidade desses compostos sem alterar a sua estrutura química vem sendo explorados através da associação a sistemas transportadores de fármacos (MACHADO, GNOATT, KLUPPEL, 2007).

Dentre os diversos transportadores de fármacos descritos na literatura, os lipossomas se destacam devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e não

imunogenicidade. Devido a sua natureza anfotérica, os lipossomas podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas em uma mesma vesícula, além de serem estruturas de fácil obtenção e de tamanho e composição controlável de acordo com a necessidade do fármaco e das características da patologia (BATISTA, DE CARVALHO, MAGALHÃES, 2007; SANTOS, CASTANHO, 2002).

Além disso, muitos estudos mostram a aplicação dos lipossomas em formulações multifuncionais e multicomponentes, onde essas estruturas podem ser associadas a agentes com direcionamento específico a fim de promover a liberação do(s) medicamento(s) no alvo de ação, e é nesse sentido que os quantum dots vem sendo estudados (CULLIS, ALLEN, 2013; TANG, 2018).

Os *quantum dots* ou pontos quânticos semicondutores fluorescentes são partículas de tamanho nanométrico amplamente utilizados para visualização e rastreamento de células vivas. A estabilidade e a luminosidade a longo prazo dos QDs, bem como a possibilidade de ligação de diferentes moléculas bioativas às suas camadas exteriores tornam-se candidatos perfeitos para o direcionamento e o fornecimento de imagens *in vitro* e *in vivo* (GENDELMAND et al, 2016).

Diante de toda problemática que envolve o câncer, seu tratamento e a resposta do paciente ao mesmo, torna-se evidente a necessidade de desenvolver pesquisas que busquem o melhoramento dos medicamentos já disponíveis e a possibilidade de trazer para o mercado novas moléculas que além de eficazes, possam ser mais específicas, usadas em menor quantidade e com pouco ou nenhum efeito colateral grave.

Nesse trabalho uma molécula inédita híbrida foi conjugada aos lipossomas e aos lipossomas-CdSe/CdS, a fim de avaliar o melhoramento da biodisponibilidade e estabilidade da LQM168 (a qual apresenta atividade antitumoral comprovada) utilizando técnicas microscópicas, espectroscópicas e eletroquímicas. Além disso, a associação dos quantum dots mágicos aos lipossomas permite a elaboração de um novo agente teranóstico, o qual pode futuramente se aplicado como agente teranóstico.

## 1.1 PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

A busca pelo desenvolvimento de novos fármacos capazes de minimizar sintomas e/ou promover a cura das patologias que acometem a saúde da população é uma realidade que apresenta seus primeiros registros desde o início da civilização, onde o homem, através dos recursos presentes na natureza como plantas, animais e minerais, preparavam suas formulações com a finalidade de aumentar o bem estar da população (CALIXTO, SIQUEIRA, 2008).

A partir do século XIX houve o início da busca pelos princípios ativos presentes nas plantas, o que ocasionou o surgimento de medicamentos com as características as quais conhecemos atualmente. Nessa época houve o isolamento de substâncias como morfina (1086), cafeína (1820), atropina (1831), codeína (1848), digoxina (1943) entre tantas outras, que são amplamente utilizadas até os dias atuais na farmacoterapia e como modelo para desenvolvimento de novas substâncias (CALIXTO, SIQUEIRA, 2008).

Os medicamentos que constituem a nossa farmacoterapia apresentam atividade em cerca de 500 alvos moleculares, os quais são utilizados na quimioterapia das doenças conhecidas atualmente. Porém, a maioria desses medicamentos apresentam baixa biodisponibilidade, baixa seletividade e toxicidade, podendo promover efeitos colaterais nocivos à saúde do indivíduo (CALIXTO, SIQUEIRA, 2008).

O avanço de diversas áreas da ciência como a química, física, biologia, matemática, computação, genética e áreas afins vem servindo de base para o planejamento de novos fármacos permitindo o desenvolvimento de estratégias inteligentes que possibilitam a elaboração de moléculas mais eficazes, seletivas e menos tóxicas a fim de prevenir e/ou promover a cura, e diante desse contexto é que a hibridação molecular vem se destacando (TIETZE et al., 2003; VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

A hibridação molecular é uma nova estratégia de planejamento e desenvolvimento de fármacos, a qual consiste na associação de dois grupos farmacofóricos (região da molécula responsável por ligar-se ao sítio de ação e exercer a atividade farmacológica) em uma única molécula a fim de potencializar os efeitos farmacológicos (TIETZE et al., 2003; VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

Estudos demonstram que a hibridação molecular apresenta diversas vantagens na farmacoterapia por promover um melhoramento da atividade farmacológica devido ao efeito sinérgico (ação da molécula sob o organismo atuando em diferentes mecanismos de ação, onde o efeito farmacológico é caracterizado pela soma de cada um dos agentes), reduz os efeitos colaterais, diminui a ingestão de medicamentos diários e promove a diminuição do índice de resistência a medicamentos, tornando assim a terapia medicamentosa mais cômoda para o paciente (CONTELLES et al., 2011; GEDIYA et al., 2009).

Muitos são os compostos que apresentam atividade farmacológica comprovada, porém os heterocíclicos são amplamente estudados por constituírem uma classe de grande importância para a vida vegetal e por serem moléculas essenciais para o metabolismo das plantas e dos organismos marinhos. Além disso, a maioria dos heterocíclicos apresentam atividade farmacológica comprovada como antiparasitária, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antiviral, antiprotozoária entre outras, o que tem despertado grande interesse de estudo desses compostos (BAWA et al., 2010; KUMAR et al., 2017).

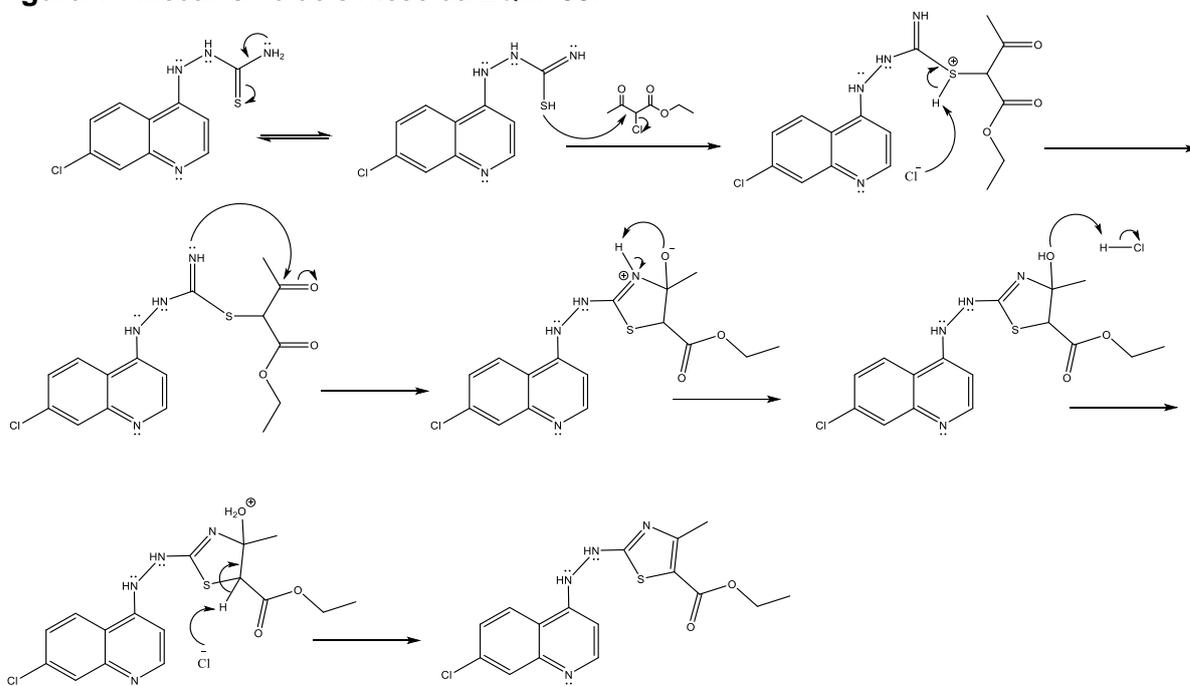
A literatura relata vários heterocíclicos com atividade farmacológica comprovada. Porém as quinolinas e tiazolidinas são heterocíclicos bastante estudados devido ao seu potencial farmacológico frente a vários tipos de patologia, e tem sido reportado como importantes agentes utilizados no desenvolvimento de novos derivados para a terapia do câncer (CHAVDA et al., 2010; KRAUSE et al., 2011; AFZAL et al., 2015; ASSATI et al., 2014).

As quinolinas podem atuar interrompendo a proliferação de células tumorais por diferentes mecanismos de ação como: indução de apoptose, inibição do crescimento celular, inibição da angiogênese, interrupção da migração celular, além de serem intercalantes de DNA, mecanismo este que vem sendo bastante explorado. Já a tiazolidina tem a sua atividade antitumoral justificada pela inibição da proliferação celular ocasionada pela interrupção da mitose, impedindo assim que o processo de divisão celular ocorra (CHAVDA et al., 2010; KRAUSE et al., 2011; AFZAL et al., 2015; ASSATI et al., 2014).

A 1-(Z) -etil-2- (2- (7-cloroquinolin-4-il) hidrazono) -4-metil-2,3-diidrotiazol-5-carboxilato a qual iremos nos referir como LQM168, é uma molécula híbrida constituída por um núcleo quinolínico associado a um núcleo tiazolidínico por uma hidrazina. Esse composto apresenta um aspecto sólido cristalino, de coloração

amarelo ouro, MM: 362,06 g mol<sup>-1</sup> e foi obtido a partir da ciclização da porção tioamida do intermediário (7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida, de acordo com a metodologia descrita por Santos-Júnior (2017) (Figura 1).

**Figura 1** - Mecanismo de síntese da LQM168.



**Fonte:** SANTOS-JÚNIOR, 2017.

Santos-Júnior (2017) avaliou a citotoxicidade da LQM168 frente às seguintes linhagens de células de câncer humano: HL-60 (leucêmica), PC-3 (adenocarcinoma de próstata) e SF-295 (glioblastoma), onde foi demonstrado uma redução da viabilidade celular (RVC%) acima de 90% para todas as linhagens de célula tumorais estudadas (Tabela 1).

**Tabela 1** - Citotoxicidade da LQM168 em diferentes linhagens de célula de câncer humano.

CÓDIGO	SF-295		HL-60		PC-3	
	RVC%	EPM	RVC%	EPM	RVC%	EPM
LQM168	97,3	0,7	93,2	0,5	98,8	0,2

**Fonte:** Adaptado de SANTOS-JÚNIOR, 2017.

Santos-Júnior (2017) também avaliou a LQM168 quanto suas respectivas CI<sub>50</sub> frente as linhagens celulares tumoral e não tumoral utilizando: HCT-116 (carcinoma

de cólon), PC3 (adenocarcinoma de próstata), SF-295 (glioblastoma), HL-60 (leucêmica) e L-929 (fibroblasto de tecido conectivo subcutâneo, origem murina). Os estudos demonstraram que a LQM168 apresenta um potencial citotóxico relevante frente a linhagem tumoral HL-60, com valor de  $CI_{50}$  de 2,4  $\mu$ M, sendo assim a mais potente de uma classe de moléculas semelhantes sintetizadas e avaliadas, frente a esta linhagem (Tabela 2).

**Tabela 2** - Citotoxicidade da LQM168 em diferentes linhagens celulares tumoral e não tumoral.

CÓDIGO	HCT-116	PC-3	HL-60	SF-295	L929
LQM168	14,99 (14,01-16,03)	20,7 (18,3-23,2)	2,41 (2,02-2,87)	>27,62	25,32 (21,21-30,21)
DOX	0,12 (0,09-0,17)	0,76 (0,59-0,93)	0,02 (0,01-0,02)	0,24 (0,20-0,27)	0,66 (0,49-0,83)

**Fonte:** Adaptado de SANTOS-JÚNIOR, 2017.

Atualmente centros de pesquisas recebem investimentos de grandes indústrias farmacêuticas para que possam desenvolver novas moléculas mais seletivas e seguras no combate ao câncer. Através desses estudos, a LQM168 foi selecionada a fim de avaliar melhor suas propriedades físico-químicas, seu mecanismo de ação e melhorar aspectos intrínsecos a sua estrutura como solubilidade e estabilidade devido ao seu potencial farmacológico frente a células leucêmicas.

## 1.2 LIPOSSOMAS COMO SISTEMA TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS

Ao longo da história, a utilização de muitos fármacos assim como o estudo de substâncias que apresentam potencial farmacológico foi drasticamente afetada devido a sua baixa biodisponibilidade. O tempo de permanência do agente terapêutico na circulação, a sua retenção ou degradação, a baixa solubilidade e os efeitos colaterais nocivos inerentes as doses elevadas, dificultam a utilização da concentração necessária para se obter os efeitos farmacológicos desejados (MACHADO, GNOATT, KLUPPEL, 2007; SANTOS, CASTANHO, 2002)

A busca por métodos que possam promover o aumento da biodisponibilidade de fármacos e de compostos com potencial farmacológico sem alterar a sua estrutura química é uma realidade que vem sendo explorada desde o século passado através do desenvolvimento de transportadores de fármacos. A associação de moléculas a

esses sistemas promove benefícios para o paciente por garantir a dose necessária do medicamento, a entrega direcionada, a diminuição das reações adversas e interações com outras substâncias (MACHADO, GNOATT, KLUPPEL, 2007).

Os primeiros registros sobre sistemas transportadores de fármacos ocorreram no início século XX quando Paul Ehrlich propôs seu modelo, o qual ficou conhecido por “Bala Mágica”. Nesse modelo, Ehrlich propõe que o fármaco se liga ao agente carreador, e este direcionará a molécula até o tecido alvo diminuindo, assim a ação do fármaco em tecidos não desejados, aumentando a sua eficiência e permitindo a diminuição da dose terapêutica (MACHADO, GNOATT, KLUPPEL, 2007; SANTOS, CASTANHO, 2002)

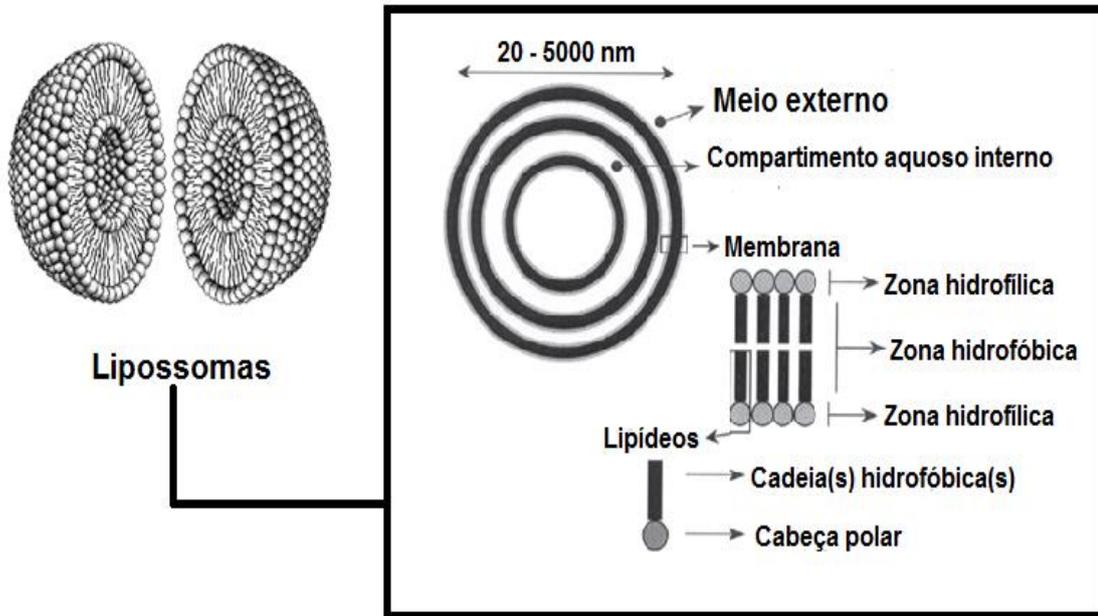
O primeiro sistema carreador de fármacos desenvolvido e que apresentou efetividade foi elaborado a base de vesículas de nylon e outros polímeros sintéticos; mas pouco tempo depois foi observado que esse sistema era inadequado, visto que eles eram produzidos a partir de material sintético que se acumulam no organismo. Essa descoberta promoveu uma enorme busca pelo desenvolvimento de transportadores de fármacos biocompatíveis (BATISTA, DE CARVALHO, MAGALHÃES, 2007; MACHADO, GNOATT, KLUPPEL, 2007; SANTOS, CASTANHO, 2002).

Em 1965, Alec Bangham e colaboradores desenvolveram um sistema de difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais, onde foi produzido e caracterizado vesículas formadas a partir de fosfolípidios. Três anos mais tarde essas estruturas foram denominadas de lipossomas e foram aplicadas como um modelo simples para estudo de membrana biológica se destacando por sua capacidade de se associar a enzimas, e em 1971, Gregory Gregoriadis propôs pela primeira vez o uso dessas vesículas lipídicas como sistemas transportadores de fármacos (MACHADO, GNOATT, KLUPPEL, 2007; SANTOS, CASTANHO, 2002; FRÉZARD, 2005).

Os lipossomas podem ser definidos como vesículas esféricas constituídas por substâncias naturais ou sintéticas de caráter anfotérico, organizadas em bicamadas concêntricas que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos. São sistemas versáteis e de grande variedade no que diz respeito a sua composição, estrutura e tamanho, e para facilitar a sua compreensão eles são classificados, de forma geral, em termos de constituição lipídica, permeabilidade/estabilidade, modo de preparo, número de lamelas e tamanho como podemos observar no esquema

apresentado na figura 2 (SANTOS, CASTANHO, 2002; MACHADO, GNOATT, KLUPPEL, 2007; SANTOS, CASTANHO, 2002).

**Figura 2** - Representação dos lipossomas e sua constituição.



**Fonte:** Adaptado de FRÉZARD, 2005 e MERTINS, 2008.

Quanto a sua composição, os lipossomas são constituídos por lipídeos da classe dos glicerofosfolipídeos cilíndricos (moléculas orgânicas que possuem duas longas cadeias de hidrocarbonetos ligados a uma extremidade contendo um grupo fosfato) que tendem a formar bicamadas estáveis em solução aquosa através de uma organização espontânea do tipo concha esférica. Essas estruturas podem apresentar carga negativa ou não apresentar carga a depender do lipídeo utilizado em sua constituição (BATISTA, DE CARVALHO, MAGALHÃES, 2007; MACHADO, GNOATT, KLUPPEL, 2007; SANTOS, CASTANHO, 2002; FRÉZARD, 2005; LASIC, 1998).

A permeabilidade e a estabilidade dos lipossomas estão diretamente relacionadas com a temperatura de transição de fase ( $T_c$ ) dos lipídeos que os constituem (Tabela 3). Quando formados por lipídeos de  $T_c$  menor que a temperatura do meio estudado, a membrana lipossômica irá apresentar uma maior permeabilidade (fase cristal-líquido) devido à grande liberdade de movimento das cadeias de hidrocarbonetos promovendo a diminuição da sua estabilidade; quando formados por lipídeos que apresentam  $T_c$  maior que a do meio estudado, a permeabilidade da membrana será diminuída (fase gel) devido a diminuição dos movimentos das cadeias de hidrocarbonetos, proporcionando uma maior estabilidade (BATISTA, DE

CARVALHO, MAGALHÃES, 2007; MACHADO, GNOATT, KLUPPEL, 2007; FRÉZARD, 2005; LASIC, 1998).

**Tabela 3** - Exemplos de fosfolipídeos utilizados na preparação de lipossomas, suas temperaturas de transição de fase (Tc) e suas respectivas cargas.

Fosfolipídios	Cadeia hidrofóbica de ácido graxo (R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> )	Nomenclatura e abreviatura	Tc (°C)	Carga
<b>Fosfatidilcolina (PC)</b> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) -CH-CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -(O)-	Dioleifosfadilcolina (DOPC)	<0	Anfótero
	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -C(O)-	Dimiristoilfosfadilcolina (DMPC)	23	Anfótero
	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -C(O)-	Dipalmitoilfosfadilcolina (DPPC)	42	Anfótero
	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -C(O)-	Diestaroilfosfadilcolina (DSPC)	55	Anfótero
<b>Fosfatidiletanolamina (PE)</b> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH- CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -(O)-	Dioleifosfatidiletanolamina (DOPE)	<0	Anfótero
	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -C(O)-	Diestaroilfosfatidiletanolamina (DSPE)	74	Anfótero
<b>Fosfatidilglicerol (PG)</b> CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -C(O)-	Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG)	13	Negativa
	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -C(O)-	Dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG)	35	Negativa
<b>Fosfatidilserina</b> CH <sub>2</sub> CHNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> COO <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -C(O)-	Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS)	79	Negativo
	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -C(O)-	Dimiristoilfosfatidilserina (DSPS)	79	Negativo

Fonte: Adaptado de Batista, 2007.

O método empregado na produção dos lipossomas irá influenciar diretamente no tipo de estrutura a ser obtida. Na preparação clássica, a qual continua sendo a mais difundida na literatura, os lipídeos são dissolvidos em solventes orgânicos, em seguida passam por um processo de evaporação rotativa promovendo a formação do filme lipídico, e por fim esse filme é hidratado sob agitação promovendo a auto-organização dos lipídeos em bicamadas concêntricas, os quais não apresentam uniformidade de tamanho sendo necessário a padronização dessas estruturas por meio de sonicação, extrusão, filtração, diálise entre outras técnicas (MERTINS, 2008)

Em relação ao tamanho, os lipossomas podem ser classificados como pequenos ou grandes. Já com relação a quantidade de bicamadas lipídicas, os

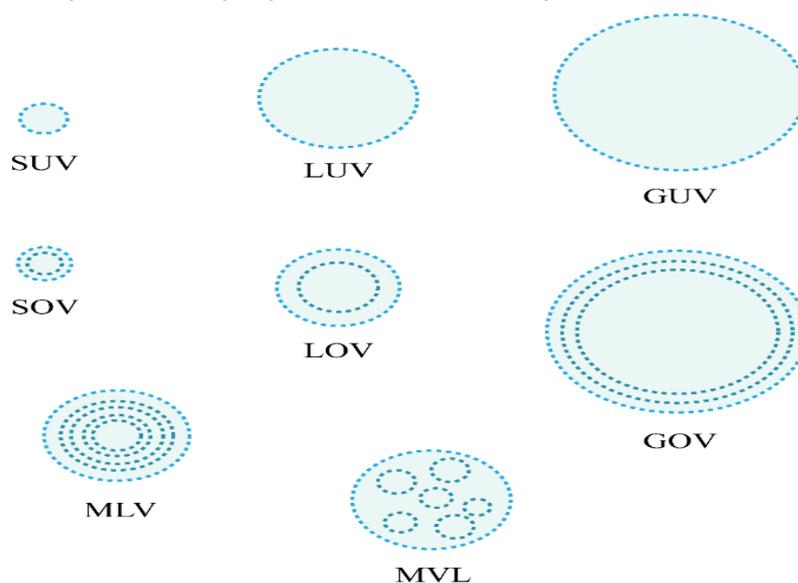
lipossomas podem ser classificados como unilamelares (quando apresentam apenas uma bicamada lipídica) ou multilamelares (quando apresentam mais de uma bicamada lipídica bicamada); na tabela 4 e na figura 3 podemos observar a classificação dos lipossomas e a sua representação respectivamente.

**Tabela 4** - Classificação dos lipossomas de acordo com o seu tamanho e o número de bicamadas lipídicas.

<b>Lipossomas</b>	<b>Características</b>	<b>Tamanho</b>
<b>Lipossomas unilamelares pequenos</b> (small unilamellar vesicles – SUVs)	Formada por uma única bicamada lipídica	De 20 a 80nm
<b>Lipossomas unilamelares grandes</b> (Large unilamellar vesicles – LUVs)	Formada por uma única bicamada lipídica	De 80nm a 1µm
<b>Lipossomas multilamelares</b> (multilamellar vesicles – MLVs)	Formada por várias bicamadas lipídicas de forma concêntrica	De 400nm a alguns micrômetros
<b>Lipossomas multivesiculares</b> (multivesicular liposome – MVLs)	Formada por várias bicamadas lipídicas de forma não concêntrica	De 400nm a alguns micrômetros
<b>Lipossomas unilamelares gigantes</b> (giant unilamellar vesicles – GUVs)	Formados por uma única bicamada lipídica.	De 1µm a dezenas de micrometros

Fonte: Adaptado de MERTINS, 2008.

**Figura 3** - Tipos de lipossomas que podem ser obtidos a partir do método clássico.



**Fonte:** Adaptado de SANTOS, CASTANHO, 2002.

Uma nova classificação dos lipossomas surgiu com a evolução da utilização dessas vesículas como sistemas transportadores de fármacos. Devido a necessidade de promover alterações em sua estrutura básica que permitisse uma maior interação com sistemas biológicos e uma maior aplicabilidade terapêutica, os lipossomas foram classificados em duas grandes áreas: os lipossomas convencionais e os não convencionais (BATISTA, DE CARVALHO, MAGALHÃES, 2007).

Os lipossomas convencionais ou clássicos são aqueles produzidos a partir de fosfolípidos e colesterol podendo ter um lípido de carga negativa, agindo como agente estabilizante, impedindo a agregação das vesículas por repulsão das cargas. Nas aplicações *in vivo*, os lipossomas convencionais são rapidamente removidos da circulação por serem reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear (BATISTA, DE CARVALHO, MAGALHÃES, 2007).

Na tentativa de driblar as limitações *in vivo* apresentadas pelos lipossomas convencionais e melhorar a sua aplicabilidade terapêutica, surgiram os lipossomas não convencionais. Dentro dessa classe estão contidos os lipossomas de longa duração, os lipossomas sítio específico e os lipossomas polimórficos (BATISTA, DE CARVALHO, MAGALHÃES, 2007; CASTANHO, 2002).

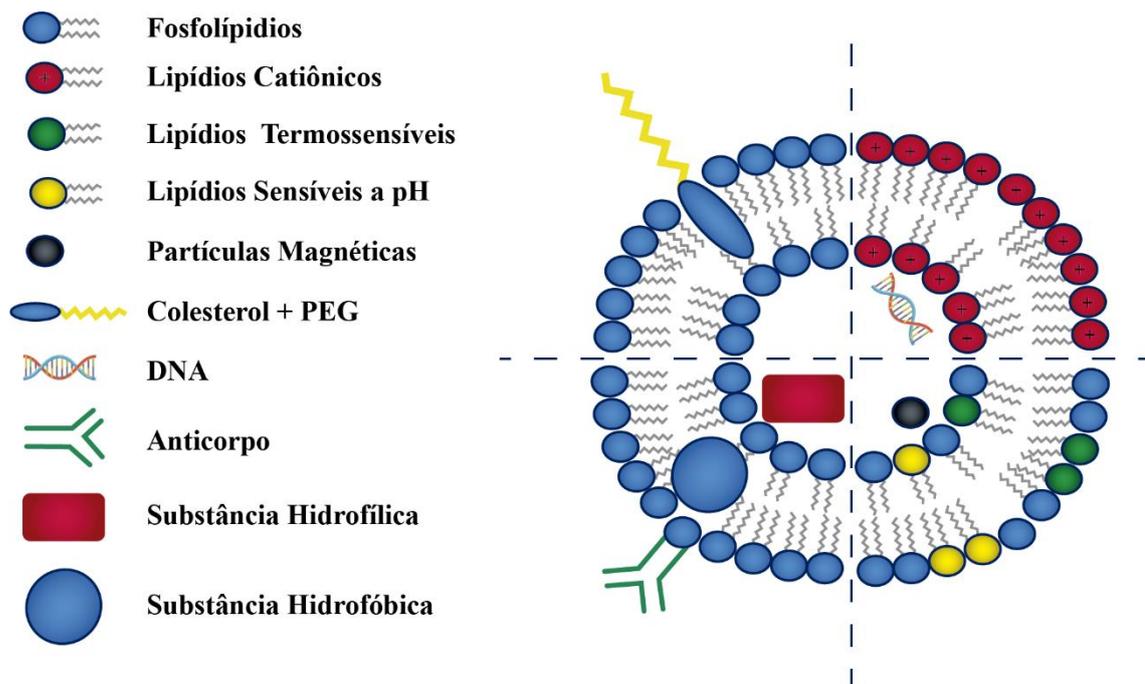
Lipossomas de longa duração também denominados de furtivos ou *stealth*, são aqueles que apresentam a sua superfície funcionalizada com moléculas hidrofílicas naturais como monossialogangliosídeo GM1 e fosfatidilinositol ou com polímeros hidrofílicos sintéticos especificamente os polietilenoglicóis (PEG). Esse recobrimento

superficial previne os lipossomas do reconhecimento fagocitário mononuclear, permitindo assim, um maior tempo de circulação (BATISTA, DE CARVALHO, MAGALHÃES, 2007; NEEDHAM et al., 1992; SAGRISTÁ et al., 2000; TORCHILIN, 2005).

Lipossomas de sítio específicos foram desenvolvidos com a finalidade de aumentar a seletividade e a quantidade de fármaco liberado no local de ação através do acoplamento de ligantes em sua superfície que promovem o direcionamento para células alvo. Dentro dessa classe estão contidos os imunolipossomas (lipossomas funcionalizados com imunoglobulinas), lipossomas como carreadores de proteínas e peptídeos (lipossomas que apresentam sua superfície funcionalizada com enzimas, hormônios, citocinas e peptídeos) e os virossomas (lipossomas que apresentam a sua superfície funcionalizada com hemaglutinina, utilizados para potencializar o efeito de vacinas) (KERSTEN, CROMMELIN, 2003).

Os lipossomas polimórficos são aqueles que se tornam reativos devido a mudanças estruturais ocasionada por uma alteração de pH, temperatura ou carga eletrostática; fazem parte dessa classe os lipossomas sensíveis ao pH, os lipossomas termo sensíveis e os lipossomas catiônicos (figura 4) (DERYCKE, WITTE, 2004; CARVALHO JR et al., 2007).

**Figura 4** - Representação esquemática dos lipossomas convencionais e não convencionais.



Fonte: Adaptado de TANG, 2018.

Desde a descoberta dos lipossomas muitos estudos estão sendo realizados a fim de melhorar, cada vez mais, a sua aplicabilidade. Os lipossomas são estruturas utilizadas nas disciplinas de ciências fundamentais como modelo de membranas, nos estudos de química e física de lipídeos avaliando a influência da composição lipídica em sua deformabilidade e nos estudos de ciências aplicadas principalmente como transportadores de fármacos.

O interesse dos grandes centros científicos e das grandes indústrias farmacêuticas em utilizar lipossomas como sistemas transportadores de fármacos está relacionado a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e não imunogênicidade. Devido a sua natureza anfotérica, os lipossomas podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas em uma mesma estrutura sendo as substâncias polares inseridas no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana (BATISTA, DE CARVALHO, MAGALHÃES, 2007; SANTOS, CASTANHO, 2002).

A literatura relata vários estudos onde os lipossomas são utilizados como sistemas transportadores de fármacos em diferentes classes de quimioterápicos. Na terapia do câncer, essas estruturas são utilizadas devido a possibilidade de direcionamento do fármaco ao local de ação; no desenvolvimento de vacinas, a liberação controlada e específica em células alvo diminui a exposição do paciente aos patógenos; na terapia gênica o grande interesse está na capacidade dos lipossomas em se associar em material genético e transferi-lo para o interior das células; na terapia infecciosa e parasitária o grande destaque dos lipossomas se dá por sua capacidade de promover a liberação controlada minimizando os efeitos colaterais dessas classes de medicamentos (SANTOS, CASTANHO, 2002; CULLIS, ALLEN, 2013; TANG, 2018).

Muitos estudos mostram a aplicação dos lipossomas em formulações multifuncionais e multicompetentes. Nessa categoria, as nanopartículas lipídicas podem ser associadas a agentes com direcionamento específico do local, biomarcadores, recursos de imagem, apresentar resposta a gatilhos interno ou externo a fim de promover uma liberação do(s) medicamento(s) de forma mais efetiva, porém a medida que aumentamos a complexidade das nanopartículas lipídicas, os gastos de produção são aumentados e são necessários o uso de técnicas eficazes e pessoas qualificadas na área a fim de garantir a qualidade e segurança do medicamento (CULLIS, ALLEN, 2013; TANG, 2018).

Nos dias atuais, muitos medicamentos disponíveis para o tratamento do câncer e de outras patologias apresentam-se na forma lipossomal. Os primeiros medicamentos lipossomais disponibilizados no mercado foram o DIPRIVAN(propofol – anestésico) -1986, AMBISOME(anfotericina B – infecção fúngica e leishmaniose) – 1990, DOXIL(doxorrubicina – antitumoral ) – 1995, DAUNOXOME(daunoxorrubicina – antitumoral) – 1996, DEPOCYT (citosina – linfomatosa) – 1999, MYOCET (doxorubicina – antitumoral) – 2000, VISUDYNE (verteporfina – degeneração) – 2000, DEPODUR(morfina – dor pós cirúrgica) – 2004, MARQIBO(vincristina – leucemia) – 2012 (CULLIS, ALLEN, 2013; TANG, 2018).

Dentro do contexto apresentado, podemos observar a importância dos lipossomas como sistemas transportadores de fármacos, o quanto eles contribuíram e vem contribuindo para o avanço do desenvolvimento de novos medicamentos, produtos farmacêuticos e como base para as pesquisas científicas; porém muitos estudos necessitam ser realizados a fim de torna-los carreadores mais eficazes e seguros.

### **1.3 ELETROQUÍMICA**

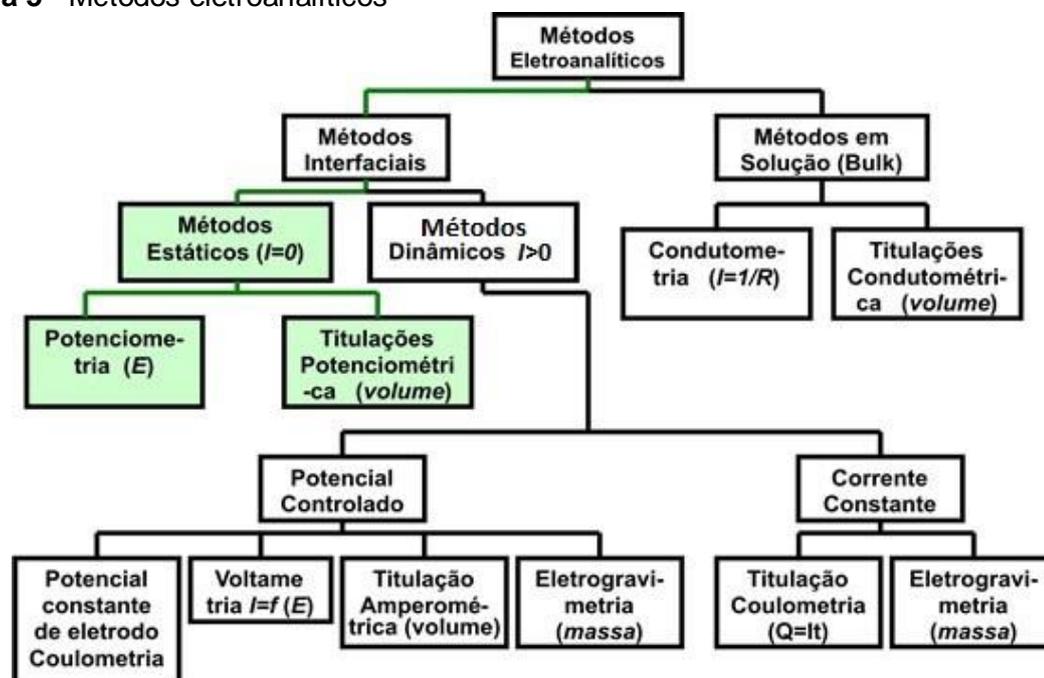
Muitas reações químicas que ocorrem em meio biológico e são essenciais para a vida envolvem os processos de transferência de elétrons. As enzimas que catalisam reações de oxirredução, a cadeia de transporte de elétrons em mitocôndrias e as neurotransmissões são alguns exemplos de processos biológicos dessa natureza; além disso, estudar os processos de transferência elétrons são importantes para o desenvolvimento das áreas químico-farmacêutica, farmacológica e toxicológica por permitir a compreensão dos fenômenos de oxirredução que estão relacionados com os principais mecanismos de metabolismo celular desenvolvidos no meio biológico ( DE MOURA, 2008; DA SILVA, 2018).

Podemos definir a eletroquímica como a área da química responsável por estudar os fenômenos associados a transferência de elétrons de forma homogênea (em solução) ou heterogênea (superfície do eletrodo), permitindo avaliar a reatividade de compostos orgânicos, inorgânico e organometálicos, sínteses, corrosão, tecnologia industrial, investigações em nanoescala, processos biológicos relevantes, entre outras aplicações (BRETT e BRETT, 1996; SILVA, 2017).

Os métodos eletroquímicos utilizam as propriedades elétricas para mensurar o analito a partir de fenômenos onde a espécie eletroativa interage fisicamente e/ou quimicamente com os demais componentes do meio, ou mesmo com as interfaces. Essas interações podem ser observadas através do emprego de perturbações controladas ao sistema, como por exemplo, a aplicação de uma diferença de potencial, e as medidas conhecidas por sinais eletroquímicos podem ser relacionadas com parâmetros intrínsecos da espécie estudada (PACHECO et al., 2013; SKOOG, 2009; ALEIXO, 2003).

Os métodos eletroanalíticos se dividem em métodos interfaciais e não interfaciais. Os métodos interfaciais podem ser definidos como o fenômeno eletroquímico que ocorre entre a superfície do eletrodo e a superfície da solução, eles podem ser classificados como dinâmico onde a cela eletroquímica é operada com aplicação de corrente e estático quando a cela eletroquímica é operada sem aplicação de corrente. Já os métodos não interfaciais são definidos como o fenômeno eletroquímico que ocorre em solução (Figura 5) (SKOOG, 2009).

**Figura 5** - Métodos eletroanalíticos



Fonte: SKOOG, 2009.

Dentre os métodos eletroanalíticos podemos destacar a voltametria, um método interfacial e estático. Os estudos voltamétricos podem nos fornecer informações qualitativas e quantitativas de uma espécie, e essas informações são

geradas através do registro de curva corrente x potencial durante a realização das análises.

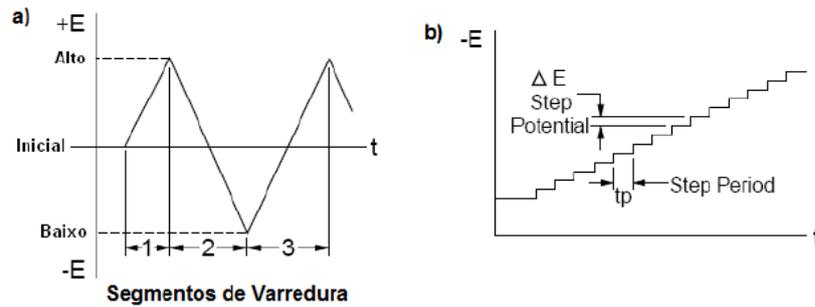
Os métodos eletroquímicos oferecem vantagens relevantes sobre os métodos convencionais por apresentar um baixo custo de instrumentação, baixo consumo de reagentes e conseqüentemente baixa produção de resíduos, fornece informações pertinentes a estrutura-atividade da espécie química, fácil controle de variáveis entre outros. Além disso, o avanço da tecnologia vem proporcionando sistemas eletroquímicos mais versáteis, sensíveis e a possibilidade de miniaturização e portabilidade facilitando assim, o seu uso e aumentando a sua adesão em diferentes áreas. (DE MOURA, 2008; BRITO, 2011; PACHECO, et al., 2013).

### 1.3.1 Voltametria cíclica (VC)

Dentre os métodos eletroanalíticos existentes, a voltametria cíclica é amplamente utilizada por fornecer informações rápidas a nível qualitativo/quantitativo dos processos de transferência de elétrons envolvidos. Através dessa técnica é possível obter dados sobre a termodinâmica do processo redox, da cinética de reações heterogêneas de oxirredução, sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos, além de nos possibilitar a investigação da reatividade química das espécies eletrogeradas e auxiliar na elucidação do mecanismo da substância analisada. (BRETT e BRETT 1996; BARD e FAULKNER, 2001; BRITO, 2011).

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica de varredura reversa de potencial ( $E$ ), onde o potencial aplicado ao eletrodo é submetido à variação numa velocidade conhecida e constante; a varredura do sistema vai de um potencial inicial a um potencial final e ao atingir o potencial final desejado a varredura é revertida ao valor inicial na mesma velocidade (figura 6), podendo gerar como resposta a essa perturbação um par de picos catódico e anódico representados em um voltamograma (SKOOG, 2009; BRETT e BRETT 1996; BARD e FAULKNER, 2001).

**Figura 6** - Aplicação de potencial para voltametria cíclica. (A) Potencial com varredura linear; (B) potencial com varredura em escada.

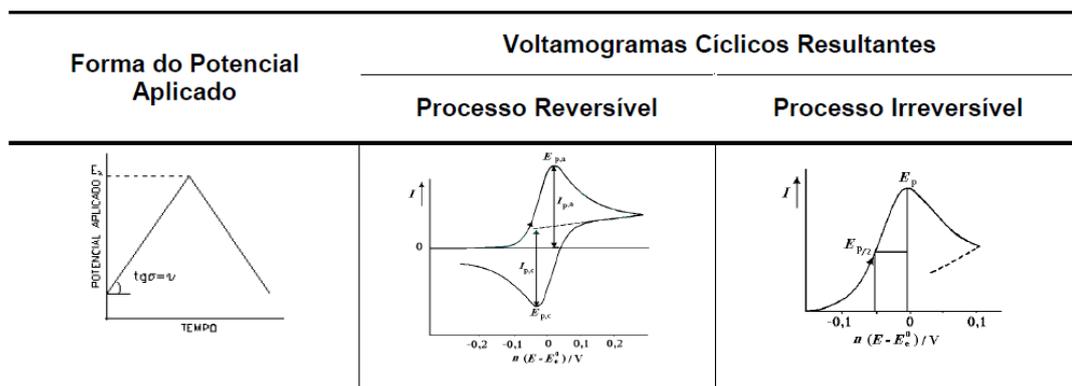


Fonte: BOLT, 1997.

A voltametria cíclica nos permite observar os processos eletródicos através das informações obtidas como potenciais de pico catódico e anódico ( $E_{pc}$  e  $E_{pa}$ ), as correntes de pico catódico e anódico ( $I_{pc}$  e  $I_{pa}$ ) e os potenciais de meia onda ( $E_{1/2}$ ); também é possível determinar as reações que ocorrem no eletrodo avaliando os processos de transferência de massa do analito que pode ser difusional quando o processo de transferência de elétrons ocorre da solução para a superfície do eletrodo, e a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo (SKOOG, 2009; BRETT e BRETT 1996; BARD e FAULKNER, 2001).

A dependência do potencial e da corrente com a variação da velocidade de varredura, baseados em testes diagnósticos, permite obter informações importantes como reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência eletrônica, a ocorrência de reações químicas acopladas, adsorção e fenômenos catalíticos, além de caracterizar o fenômeno que controla a corrente de pico (Figura 7) (GREEF et al., 1985; SKOOG, 2009)

**Figura 7** - Representação esquemática do potencial aplicado e dos processos resultantes de voltametria cíclica.



Fonte: BOLT, 1997.

Os testes diagnósticos utilizados para caracterizar os processos descritos por voltametria cíclica, nos permite avaliar em uma análise qualitativa o perfil da onda obtida. Para processos reversíveis observamos a presença de um par de picos catódicos e anódicos de mesma altura com potenciais de picos separados por uma distância de  $59/n$  mV ( $n$ = número de elétrons), caso as espécies oxidadas e reduzidas sejam estáveis. Em contrapartida, um processo irreversível pode ser caracterizado pela evidencia da completa ausência do pico reverso apesar de não ser o único critério; na tabela 5 podemos observar com mais detalhes as leis que regem a classificação desses sistemas (GREEF et al., 1985; SKOOG, 2009)

**Tabela 5** - Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis, irreversíveis e quase reversíveis.

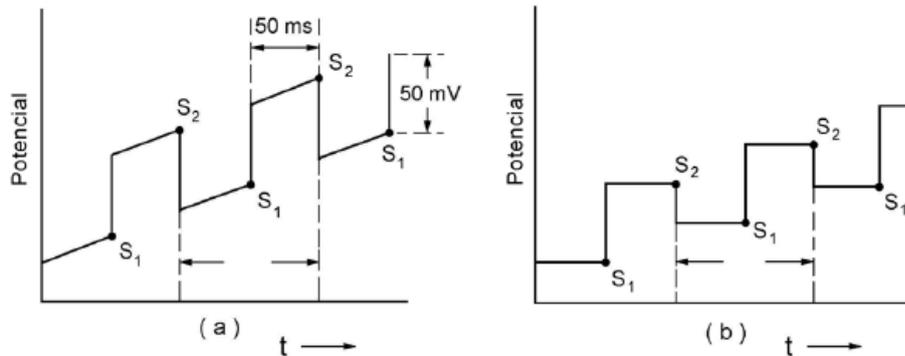
REVERSÍVEL	IRREVERSÍVEL	QUASE REVERSÍVEL
1. $\Delta E_p (E_{p_a} - E_{p_c}) = 59/n$ (mV)	1. Ausência do pico reverso	1. $I_p$ aumenta com o aumento da $v$
2. $ E_p - E_{p/2}  = 59/n$ (mV)	2. $ E_p - E_{p/2}  = 48 \text{ an mV}$	2. $ I_{p_a} - I_{p_c}  = 1$ se $\alpha = 0,5$
3. $ I_{p_a} - I_{p_c}  = 1$	3. $E_{p_c}$ desloca $-30 / \text{an mV}$	3. $\Delta E_p = 58 / n$ mV e aumenta com $v$
4. $E_p$ é independente da $v$	4. $I_{p_c} \propto v^{1/2}$	4. $E_{p_c}$ desloca negativamente c/ o aumento da $v$
5. $I_p \propto v^{1/2}$		

**Fonte:** Adaptado de DE MOURA, 2008.

### 1.3.2 Voltametria de Pulso Diferencial

A voltametria de pulso diferencial é uma técnica eletroquímica usada em medidas a nível de traço de espécies orgânicas e inorgânicas onde o degrau de potencial é a base desse tipo de voltametria. Nessas análises são aplicados ao eletrodo de trabalho pulsos de amplitude fixa sobrepostos a uma rampa de potencial crescente, sendo que a forma e os sinais de excitação gerados dependem do tipo de aparelho utilizado. Nos equipamentos analógicos os pulsos são sobrepostos a uma rampa linear (Figura 8A), já nos equipamentos digitais, pulsos são sobrepostos a uma rampa em degraus (Figura 8B) (WANG, 2000; SKOOG, 2009; BRITO, 2011).

**Figura 8** - Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em VPD. Instrumentos analógicos (a), instrumentos digitais (b).



Fonte: ALEIXO, 2001.

Nesse sistema a corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (S1) e outra ao final da aplicação do pulso (S2); a primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda e a diferença das correntes é plotada em função do potencial aplicado e o voltamograma resultante consiste de picos de corrente de forma gaussiana cujas áreas são diretamente proporcionais à concentração do analito (BRETT e BRETT, 1996).

Nos estudos e voltametria de pulso diferencial são realizadas duas leituras de correntes e a diferença entre elas promove a correção da corrente capacitiva gerada no sistema. Essa correção das correntes nos permite obter limites de detecção na ordem de  $1 \times 10^{-8}$ , tornando a técnica muito sensível (BRETT e BRETT, 1996).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar os lipossomas catiônico e lipossomas-CdSe/CdS conjugados com LQM168.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

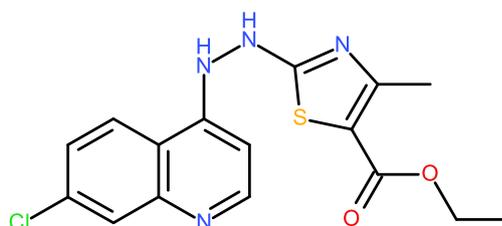
- Realizar a síntese dos lipossomas catiônicos carregados passivamente com CdSe/CdS e LQM168;
- Caracterizar morfológicamente os carreadores estudados e os complexos formados;
- Caracterizar físico-quimicamente os carreadores estudados e os complexos formados;
- Avaliar a estabilidade dos complexos;
- Estudar o comportamento eletroquímico da LQM168 em meio aprótico e prótico e avaliar os parâmetros obtidos a fim de elucidar o seu mecanismo redox,
- Avaliar a capacidade da LQM168 de gerar ERO's;
- Estudar a interação da LQM168 com ssDNA e dsDNA.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E SOLVENTES

A 1-(Z)-etil-2-(2-(7-cloroquinolin-4-il)hidrazono)-4-metil-2,3-diidrotiazol-5-carboxilato (LQM 168), apresentada na figura 9, é uma molécula híbrida que apresenta os núcleos quinolina e tiazolidina com atividade antitumoral comprovada (SANTOS-JUNIOR, 2017). Foi sintetizada pelo grupo de pesquisa de química medicinal da Universidade Federal de Alagoas e gentilmente cedida pelo Professor Doutor Thiago de Mendonça Aquino do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL.

**Figura 9** - Estrutura química da LQM 168.



**Fonte:** Autora, 2020.

O kit lipídico liofilizado utilizado na formação dos lipossomas unilamelares apresenta em sua constituição: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina–63 mmol g<sup>-1</sup> (fosfolípido catiônico), colesterol–9 mmol g<sup>-1</sup>, Estearilamina–18 mmol g<sup>-1</sup>. Foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

O ácido desoxirribonucleico de fita dupla (*dsDNA*) altamente polimerizado do tipo I, obtido a partir do timo do bezerro (*calf thymus*), com as seguintes especificações: 6,2% de Na<sup>+</sup> e 13% (v/v) de H<sub>2</sub>O, foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

O quantum dots mágico de seleneto de cádmio (CdSe/CdS), são nanopartículas (2nm a 10nm) que podem ser utilizados para visualização e rastreamento de células vivas devido a sua luminosidade e estabilidade a longo prazo. Foram sintetizados pelo Laboratório de novos materiais nanoestruturados (SILVA et al., 2013) e gentilmente cedido pela Professora Doutora Anielle Christine Almeida Silva do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas.

Todos os reagentes utilizados no preparo das soluções desse estudo foram de grau analítico e estão apresentados na tabela 6 com suas respectivas procedência e grau de pureza.

**Tabela 6** - Reagentes e solventes utilizados, seus respectivos fornecedores e grau de pureza.

<b>Reagente</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>% Pureza</b>
<b>Acetato de sódio (NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)</b>	Êxodo científica (SP-Brasil)	99 -101%
<b>Ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH)</b>	Dinâmica contemporânea LTDA (SP-Brasil)	99,7%
<b>Ácido clorídrico (HCl)</b>	Dinâmica contemporânea LTDA (SP-Brasil)	99,8%
<b>Álcool etílico (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)</b>	Dinâmica contemporânea LTDA (SP-Brasil)	99,5%
<b>Álcool metílico (CH<sub>3</sub>OH)</b>	Dinâmica contemporânea LTDA (SP-Brasil)	99,8%
<b>Cloreto de potássio (KCl)</b>	Labsynth LTDA (SP-Brasil)	99%
<b>Clorofórmio (CH<sub>3</sub>Cl)</b>	Quemis (SP-Brasil)	99,8%
<b>Ferricianeto de potássio (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>])</b>	Vertec química fina LTDA (RJ-Brasil)	99%
<b>Ferrocianeto de potássio (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>])</b>	Êxodo científica (SP-Brasil)	98,5 – 102,0%
<b>Fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)	≥99,0%
<b>Fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</b>	Cromato produtos químicos LTDA (SP-Brasil)	98%
<b>Hidróxido de sódio (NaOH)</b>	Vertec química fina LTDA (RJ-Brasil)	99%
<b>N,N-dimetilformamida (DMF)</b>	Acros (SP-Brasil)	99%
<b>Perclorato de tetrabutilamônio (TBAP)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)	99%

Fonte: Autora, 2020.

### 3.2 PREPARO DE SOLUÇÕES

Para a realização dos estudos eletroquímicos e espectroscópicos foi necessário o uso de algumas soluções e sistemas tampões.

A sonda eletroquímica utilizada na averiguação da superfície eletroativa do eletrodo de trabalho, foi preparada a partir da mistura de ferricianeto de potássio– K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>3</sub>] a 1,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, ferrocianeto de potássio– K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] a 1,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> e cloreto de potássio– KCl a 0,1 mol L<sup>-1</sup> em água ultrapura (18 MΩ cm).

As soluções-estoques da LQM 168 foram preparadas na concentração de  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em álcool etílico PA (99,5%). Todas as soluções da LQM168 foram protegidas da luz e obtidas uma hora antes de iniciar os experimentos.

O tampão fosfato utilizado nos estudos eletroquímicos em meio prótico foi preparado utilizando do fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) na concentração de  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ; a solução foi preparada em água ultrapura ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ). O sistema tampão obteve pH 7,0 e força iônica de 0,222. O valor de pH da solução foi determinado utilizando um pH-metro modelo Quimis Q400A.

O tampão acetato utilizado nos estudos eletroquímicos de interação da LQM 168 com DNA foi preparado utilizando ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) e acetado de sódio ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ) na concentração  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ; a solução foi preparada em água ultrapura ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) fervida. O sistema tampão obteve pH 4,5 e força iônica de 0,100. O valor de pH da solução foi determinado utilizando um pH-metro modelo Quimis Q400A.

As soluções de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) e hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) utilizadas no processo de desnaturação do DNA, foram preparadas na concentração de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  em água ultrapura ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) fervida.

Os reagentes utilizados na realização desse trabalho foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas em água ultrapura ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc em condições ambientes ( $25^\circ\text{C}$  e 1 atm).

### **3.3 SÍNTESE DO NANOCARREADOR**

#### **3.3.1 Preparo dos lipossomas unilamelares catiônicos**

Os lipossomas unilamelares catiônicos foram preparados de acordo com o método de hidratação do filme lipídico descrito por ANDRADE et al., 2004 com algumas adaptações.

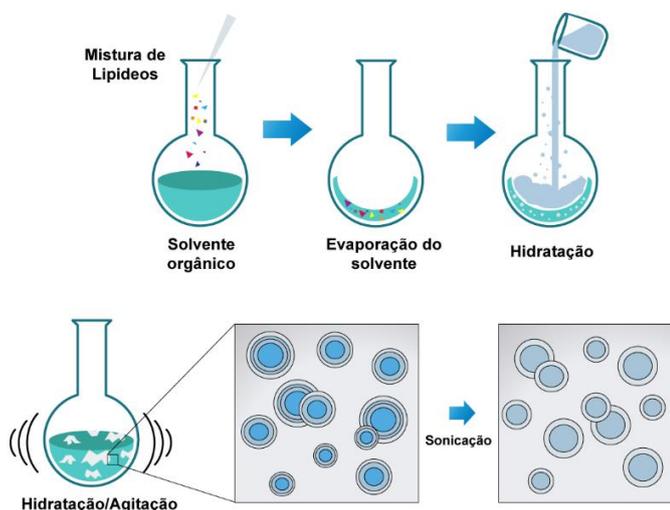
Inicialmente foi pesado 0,5mg da mistura de lipídeos (kit de lipossomas: mistura de lipídeos para a preparação de lipossomas da Sigma-Aldrich®); esses constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio: metanol (3:1 v/v), sob agitação manual e, em seguida, permaneceu em repouso por 30 minutos. Os solventes orgânicos foram removidos utilizando um evaporador rotativo do tipo rotavapor R-215; o sistema foi mantido a temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , com rotação na faixa de 100-200rpm e o vácuo entre 660 a 460mmHg com o intuito de evitar perdas dos lipídeos com uma evaporação brusca. Essa etapa foi mantida por aproximadamente

30 minutos (até a evaporação completa dos solventes) resultando em um filme lipídico.

O filme lipídico formado permaneceu durante 24h a vácuo em um dessecador para remover quaisquer vestígios dos solventes. Após esse período, o filme lipídico foi hidratado com 10mL de água ultrapura (18MΩ cm) fervida (pH:6,0) e foi mantido por 24h em um dessecador a alto vácuo, a fim de promover a formação de vesículas multilamelares.

A suspensão lipossomal foi submetida ao processo de sonicação por sonda ultrassônica em um Fisher Scientific Sonic dimembrator modelo 100 por 75 segundos em 5 ciclos de 15 segundos para a obtenção de vesículas unilamelares (Figura 10).

**Figura 10** - Método de preparação dos lipossomas.



**Fonte:** Adaptado de Avanti Polar Lipids, 2017.

### 3.3.2 Preparo dos lipossomas unilamelares cationicos carregados com LQM168 e CdSe/CdS

Os conjugados LIPO:LQM168, LIPO:CdSe/CdS e LIPO: CdSe/CdS:LQM168 foram preparados de acordo com o método descrito na sessão 3.3.1.

A LQM168 e os CdSe/CdS foram incorporados aos lipossomas de forma passiva, ou seja, o carregamento ocorreu durante o processo de formação das vesículas. Na primeira etapa do processo foram usados 0,5 mg da mistura de lipídeos, e 1,0 mg da LQM168 e 1,0 mg de CdSe/CdS; as substâncias foram solubilizadas em uma mistura de clorofórmio: metanol (3:1 v/v), sob agitação manual. Todo o processo de preparo das vesículas ocorreu como descrito anteriormente.

### **3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONJUGADOS COM QUANTUM DOT E LQM168**

Os lipossomas sintetizados foram caracterizados quanto a sua morfologia pela técnica de microscopia de força atômica (AFM) e as interações químicas foram avaliadas através de técnicas físico-químicas de UV-Vis e FTIR-ATR.

#### **3.4.1 Caracterização morfológica dos carreadores e conjugados por AFM**

As análises morfológicas dos carreadores e complexos de inclusão obtidas nesse estudo foram realizadas em parceria com a UFMG utilizando um microscópio de força atômica do tipo Cypher ES Asylum Research pelo modo de leitura não contato. As amostras em suspensão foram depositadas em uma plataforma de mica e secas sob vácuo.

#### **3.4.2 Caracterização físico-química dos carreadores e conjugados por UV-Vis**

Os espectros na região do UV-Vis para a LQM168, CdSe/CdS, Lipossomas e os complexos de inclusão LIPO:LQM168, LIPO:CdSe/CdS, LIPO:CdSe/CdS:LQM168, foram obtidos em um espectrofotômetro UV-Vis HP 8453 (G1103A) da Agilent®, no modo de varredura com comprimento de onda de 200 a 800 nm. utilizando uma cubeta de quartzo com capacidade para 3 mL e com caminho óptico de 1 cm. O software utilizado no tratamento dos dados foi o Origin 8.0.

Todas as amostras analisadas foram diluídas na proporção de 1:2 (v/v) em água ultrapura fervida.

#### **3.4.3 Caracterização físico-química dos carreadores e conjugados por FTIR-ATR**

Os espectros na região do infravermelho LQM168, CdSe/CdS, Lipossomas e os complexos de inclusão LIPO:LQM168, LIPO:CdSe/CdS, LIPO:CdSe/CdS:LQM168, foram obtidos em transmitância, à temperatura ambiente em uma região espectral entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  utilizando o espectrofotômetro de infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), IRPrestige (SHIMADZU, 02239), com o uso do acessório ATR. O software utilizado no tratamento dos dados foi o essencial FTIR.

### 3.5 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT (AUT73222) da Metrohm Autolab® em um sistema constituído por três eletrodos. Como eletrodo de trabalho utilizou-se o eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro 1,6 mm), como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina espiralado e como eletrodo de referência foi utilizado o sistema Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup> (saturado) da BAS (Figura 11). Os métodos eletroquímicos selecionados para esses estudos foram a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD). O sistema foi protegido da luz a fim de evitar a degradação da LQM168, as medidas foram realizadas à temperatura de  $25 \pm 1$  °C, e os gráficos processados foram tratados utilizando o programa Origin 8.0.

**Figura 11** - Sistema utilizado nos estudos eletroquímicos.



**Fonte:** Adaptado de NASCIMENTO, 2019.

Para os estudos em meio aprótico foi utilizado como eletrólito suporte uma solução de *N,N*-dimetilformamida (DMF) e perclorato de tetrabutilamônio (TBAP 0,1 mol L<sup>-1</sup>); Para os estudos em meio prótico foram utilizados como eletrólito suporte tampão fosfato (pH: 7,0) e nos estudos eletroquímicos de interação com DNA foi utilizado tampão acetato (pH: 4,5); em ambos os sistemas, foi utilizado 20% de álcool etílico como co-solvente a fim de melhorar a solubilidade da amostra no meio.

### 3.5.1 Procedimento de limpeza do eletrodo de carbono vítreo

Inicialmente o eletrodo de carbono vítreo foi submetido a um pré-tratamento da sua superfície. Esse procedimento foi realizado em duas etapas: uma mecânica e uma química.

Na etapa mecânica a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi polida em suspensão de alumina ( $0,3\mu\text{m}$ ) com auxílio de uma lixa até que esta apresentasse um aspecto espelhado. Após a etapa de polimento, o eletrodo foi lavado com água purificada e submetido ao ultrassom durante 30 segundos, onde a superfície do eletrodo permaneceu imersa em etanol PA, auxiliando na remoção das partículas residuais aderidas à superfície do eletrodo.

A área eletroativa do eletrodo de trabalho foi avaliada através da etapa química em um sistema eletroquímico constituído por 3 eletrodos (como já foi descrito anteriormente), utilizando como sonda eletroquímica uma solução de ferri/ferrocianeto de potássio, e as varreduras do sistema foram realizadas na faixa de potencial de 0,7 a -0,3V. A diferença de potencial ( $\Delta E$ ) dos picos anódico e catódico foram avaliadas e as áreas eletroativas considerados aptas para a realização dos estudos foram aquelas onde a  $\Delta E$  permaneceu entre 73-78V.

### 3.5.2 Perfil eletroquímico da LQM168 em meio aprótico

Os estudos eletroquímicos em meio aprótico foram realizados pela técnica de voltametria cíclica (VC). O sistema foi desaerado com gás nitrogênio, os voltamogramas foram registrados na faixa de potencial de 0,6 a -0,4V e a concentração da LQM168 permaneceu fixa ( $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) no meio.

### 3.5.3 Perfil eletroquímico da LQM168 em meio prótico

Os estudos eletroquímicos em meio prótico foram realizados pela técnica de voltametria cíclica (VC), os voltamogramas foram registrados na faixa de potencial de -1,0 a 1,0V e o sistema foi desaerado com gás nitrogênio para as análises realizadas na faixa de redução (de 0 a -1V). A concentração da LQM168 permaneceu fixa ( $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) no meio.

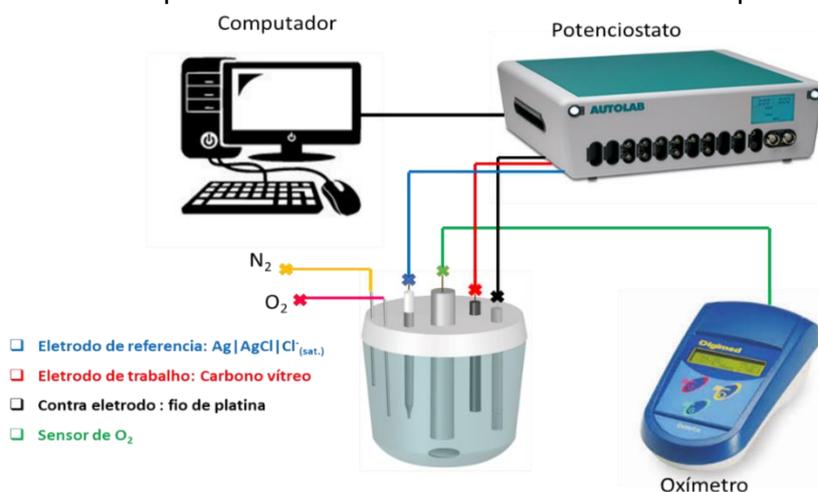
### 3.5.4 Estudo de velocidade da LQM168

O estudo de velocidade foi realizado com o objetivo de investigar o processo eletródico ocorrido a partir da avaliação de parâmetros como potenciais e correntes dos picos estudados. A análise foi realizada em meio prótico pela técnica de VC, os voltamogramas foram registrados na faixa de potencial de -0,3 a 0,3V, a concentração da LQM168 permaneceu fixa ( $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) no meio e a velocidade do sistema variou de 20 a  $1000 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 3.5.5 Estudo de reatividade com oxigênio

O Estudo para avaliar a reatividade da LQM168 frente ao oxigênio foi realizado em meio aprótico na ausência e presença de oxigênio. A concentração da LQM168 no meio permaneceu fixa ( $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ), o sistema foi desaerado com gás nitrogênio e a faixa de potencial utilizada para registrar os voltamogramas foi de 0,3 a -0,4V. A adição de oxigênio ao meio foi controlada e monitorada através de um oxímetro - Digimed DM-4 (Figura 12).

**Figura 12** - Sistema eletroquímico utilizado no estudo da LQM 168 em presença de oxigênio.



**Fonte:** Autora, 2020.

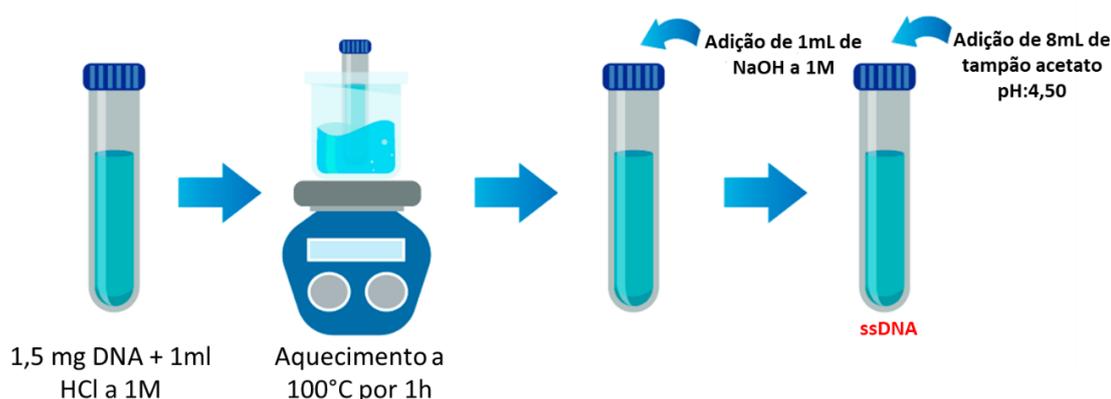
### 3.5.6 Preparo e aplicação do biossensor de ssDNA

#### 3.5.6.1 Preparo do biossensor de ssDNA

Para a obtenção do ssDNA a partir do dsDNA do timo de *calf thymus* foi realizado o seguinte procedimento descrito por DE VASCONCELLOS et al., 2016.

Inicialmente foi pesado 1,5 mg de *ds*DNA em um tubo falcon e foi adicionado 1,0mL de HCl à 1,0mol L<sup>-1</sup>; esse sistema permaneceu em banho maria a 100°C por 1h com a finalidade de promover a desnaturação efetiva da fita dupla de DNA. Após essa etapa, foi adicionado ao sistema 1,0mL de NaOH a 1,0mol L<sup>-1</sup> para neutralizar o meio. A solução obtida foi transferida para um balão volumétrico de 10mL e o volume foi ajustado até o menisco com tampão acetato pH 4,5; como podemos observar na Figura 13.

**Figura 13** - Método de preparo do ssDNA.



**Fonte:** Autora, 2020.

### 3.5.6.2 Estudo eletroquímico de interação da LQM168 com ssDNA

Os estudos eletroquímicos de interação da LQM168 com ssDNA foram realizados através da técnica de VPD. O eletrólito de suporte utilizado foi o tampão acetato (pH 4,5) contendo o DNA. A LQM168 foi avaliada no sistema em função da variação da concentração e do tempo.

Nas análises em função da concentração, a LQM168 variou de  $1,0 \times 10^{-6}$  a  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, e para cada concentração estudada foi esperado um tempo de interação de 10min entre o analito e o ssDNA. Após esse tempo, os voltamogramas foram registrados na faixa de potencial de 0 a 1,4V.

As análises em função do tempo de interação entre a LQM168 e o ssDNA foram avaliadas de 0 a 480 minutos; a LQM168 permaneceu em uma concentração fixa no meio ( $4,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) e os voltamogramas foram registrados na faixa de potencial de 0 a 1,4V.

### 3.5.7 Preparo e aplicação do biossensor de *dsDNA*

O gel de *dsDNA* do timo de *calf thymus* utilizado na produção do biossensor de *dsDNA*, a produção do biossensor e os estudos eletroquímicos foram realizados de acordo com o método descrito por DE ABREU et al., 2008.

#### 3.6.7.1 Preparo do gel de *dsDNA*

Em um eppendorff foi pesado 15 mg do *dsDNA* do timo de *calf thymus* e foi adicionado 2,0mL de tampão acetato pH 4,5. O sistema foi armazenado em baixas temperaturas (2 a 8°C) por 48h para que o *dsDNA* fosse dissolvido por completo sem danos a sua estrutura.

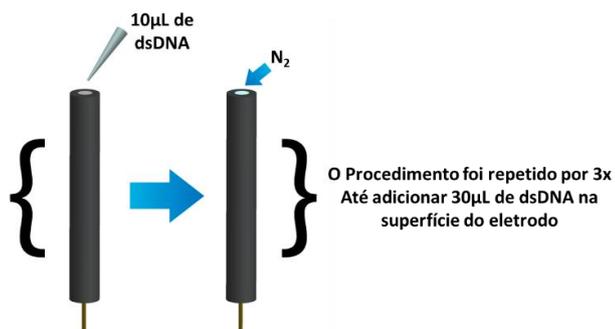
#### 3.6.7.2 Condicionamento da superfície do eletrodo de carbono vítreo (CV)

Para a produção do biossensor eletroquímico de *dsDNA*, a superfície do eletrodo de trabalho teve que passar por um pré-tratamento de sua área eletroativa antes de ser modificado com o gel. Inicialmente o eletrodo passou pelos processos de limpeza mecânico e químico como já foi descrito na sessão 3.4.1; em seguida, foi realizado o procedimento de condicionamento da área eletroativa, onde foram geradas cargas positivas favorecendo a adesão do gel de *dsDNA* devido as interações eletrostáticas que ocorrem com as cargas negativas presentes nos grupos fosfatos do DNA. Esse processo ocorreu através da realização de dez varreduras com condicionamento de 120s por VPD nos potenciais de 0,0 a 1,4 V,  $v = 5,0 \text{ mV s}^{-1}$  e amplitude de 0,05 V.

#### 3.6.7.3 Construção do biossensor de DNA

O biossensor foi construído adicionando 10 $\mu$ L do gel de *dsDNA* sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo pré-tratada. Após a deposição do gel, este foi seco sob fluxo de gás nitrogênio (N<sub>2</sub>). Esse processo foi repetido três vezes totalizando uma deposição de 30 $\mu$ L do gel a superfície do eletrodo (Figura 14).

**Figura 14** - Construção do biossensor de DNA

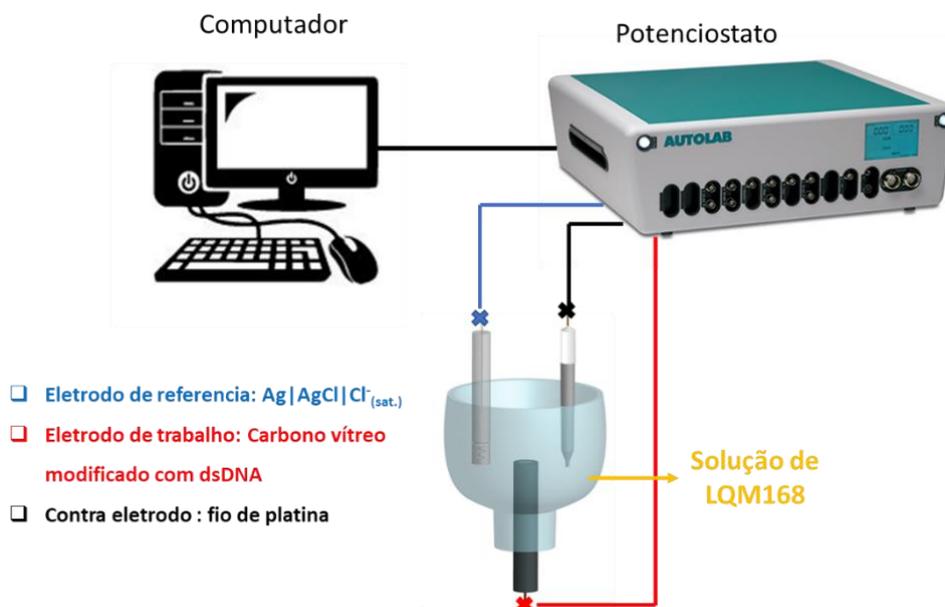


Fonte: Autora, 2020.

#### 3.6.7.4 Aplicação do biossensor de DNA

Os estudos eletroquímicos de interação da LQM168 com *dsDNA* foram realizados pela técnica de VPD onde o biossensor foi analisado em função da variação da concentração da LQM168, em função do tempo e em função do tempo sem aplicação da faixa de potencial de oxidação das bases guanina e adenina, utilizando um sistema semelhante ao apresentado na figura 15.

**Figura 15** - Sistema utilizado nos estudos eletroquímicos do biossensor de *dsDNA*



Fonte: Autora, 2020.

No estudo de interação do *dsDNA* em função da variação da concentração da LQM168, a concentração da amostra variou de  $1,0 \times 10^{-6}$  a  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L. Para cada

concentração o tempo de interação foi de 15min sem agitação do sistema e os voltamogramas foram registrados na faixa de potencial de 0 a 1,4V.

Nos estudos de interação do *dsDNA* em função do tempo, a concentração da amostra foi de  $4,0 \times 10^{-6}$  mol L e o tempo de interação avaliado variou de 0 a 180min. Durante todo o experimento o sistema não foi agitado e os voltamogramas foram registrados na faixa de potencial de 0 a 1,4V.

Para o estudo realizado de interação da LQM168 com *dsDNA* sem oxidação das bases guanina e adenina em função do tempo, foi realizado com um único biossensor o qual permaneceu em contato com a LQM168 na concentração de  $4,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Os voltamogramas foram registrados no intervalo de tempo entre 0 a 720 min; durante todo o estudo, o biossensor permaneceu em contato com a solução e os voltamogramas foram registrados na faixa de potencial de 0 a 0,6V.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

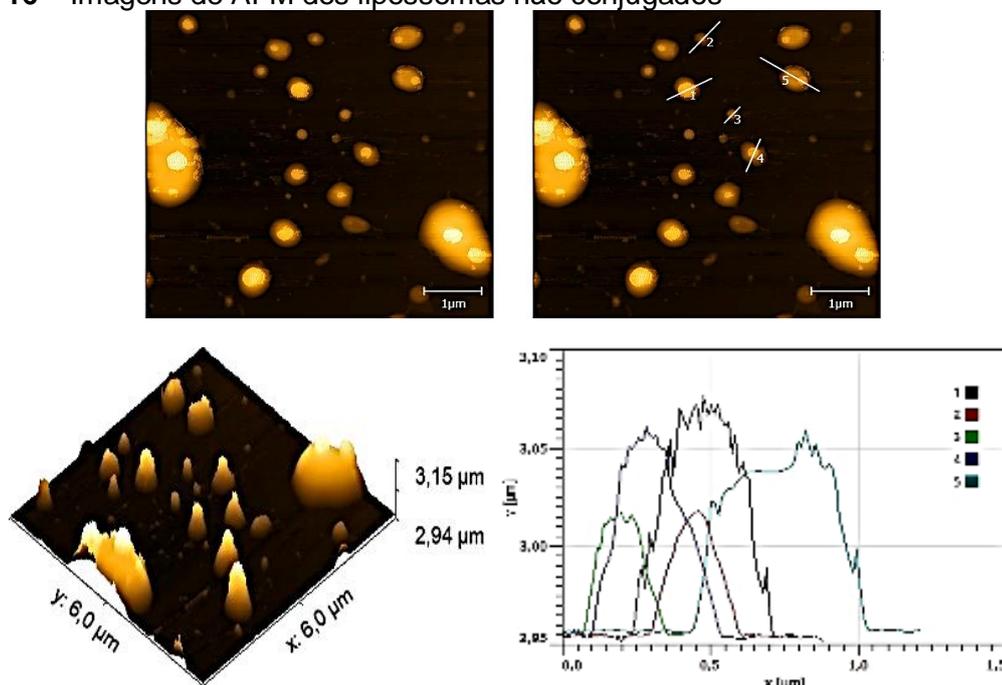
### 4.1 ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONJUGADOS COM QUANTUM DOT E LQM168

#### 4.1.1 Caracterização dos lipossomas conjugados por AFM

Os lipossomas sintetizados e conjugados a LQM168 e aos quantum dots mágicos de CdSe/CdS foram caracterizados morfologicamente utilizando a técnica de microscopia de força atômica.

Nas imagens topográficas obtidas para os lipossomas não conjugados é possível observar uma não uniformidade no tamanho das vesículas variando entre 10 $\mu$ M a 1000 $\mu$ M aproximadamente. Além disso, foi observado uma aglomeração dessas estruturas, a qual é observada pela variação de forma e presença de rugosidade nas vesículas (Figura 16).

**Figura 16** – Imagens de AFM dos lipossomas não conjugados



Fonte: Autora, 2020.

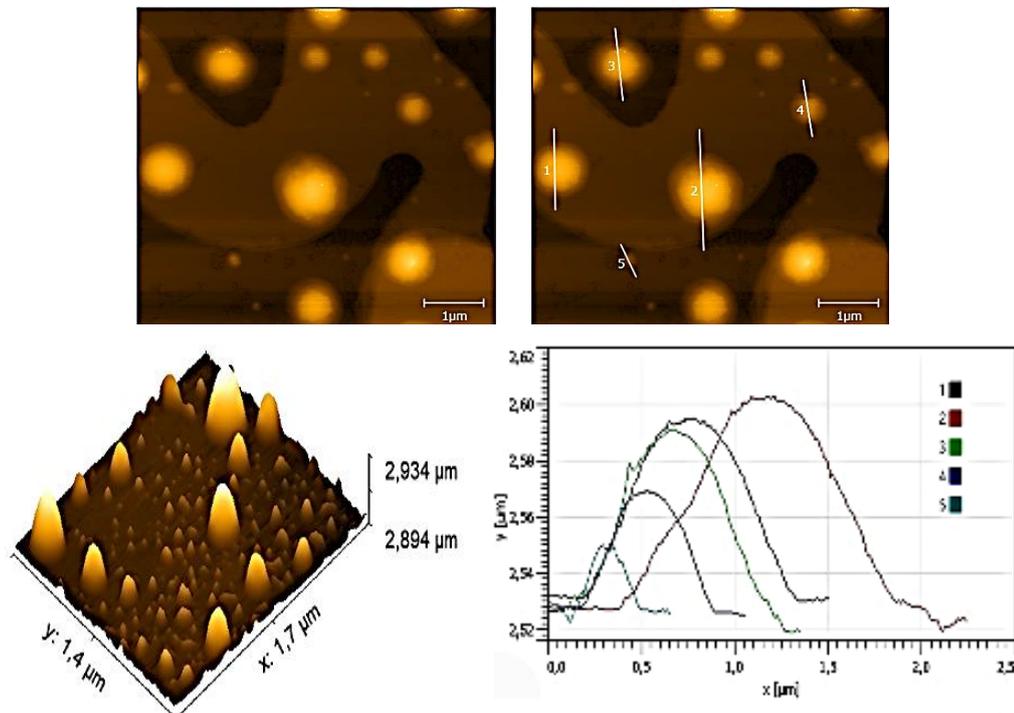
As variações de tamanho dos lipossomas podem ser justificadas pela não efetividade do processo utilizado na redução/padronização das vesículas. O processo de sonicação foi realizado utilizando um ultrassom o qual emite frequência de ondas

de menor intensidade em comparação a um sonificador. Esse fator pode ter prejudicado a conversão das vesículas multilamelares em unilamelares pequenas.

Outro fator que pode justificar a falta de padronização do tamanho das vesículas é a sua instabilidade. Os lipossomas mesmo apresentando carga superficial positiva, o que promove uma repulsão eletrostática dessas estruturas, pode ter sido insuficiente para permitir uma diminuição da movimentação das partículas no sistema, permitindo assim a sua aglomeração (TAI et al, 2018; RUOZI et al, 2007; BERNARDI, 2015).

Na figura 17, é possível observar as imagens topográficas para os lipossomas conjugados com CdSe/CdS, onde as vesículas se encontram com tamanho entre  $10\mu\text{M}$  a  $1000\mu\text{M}$  aproximadamente, apresentando uma maior uniformidade das esferas, diminuição da rugosidade, diminuição da polidispersividade e um aumento do tamanho das vesículas quando comparados aos lipossomas não conjugados.

**Figura 17** – Imagens de AFM dos lipossomas conjugados com CdSe/CdS.



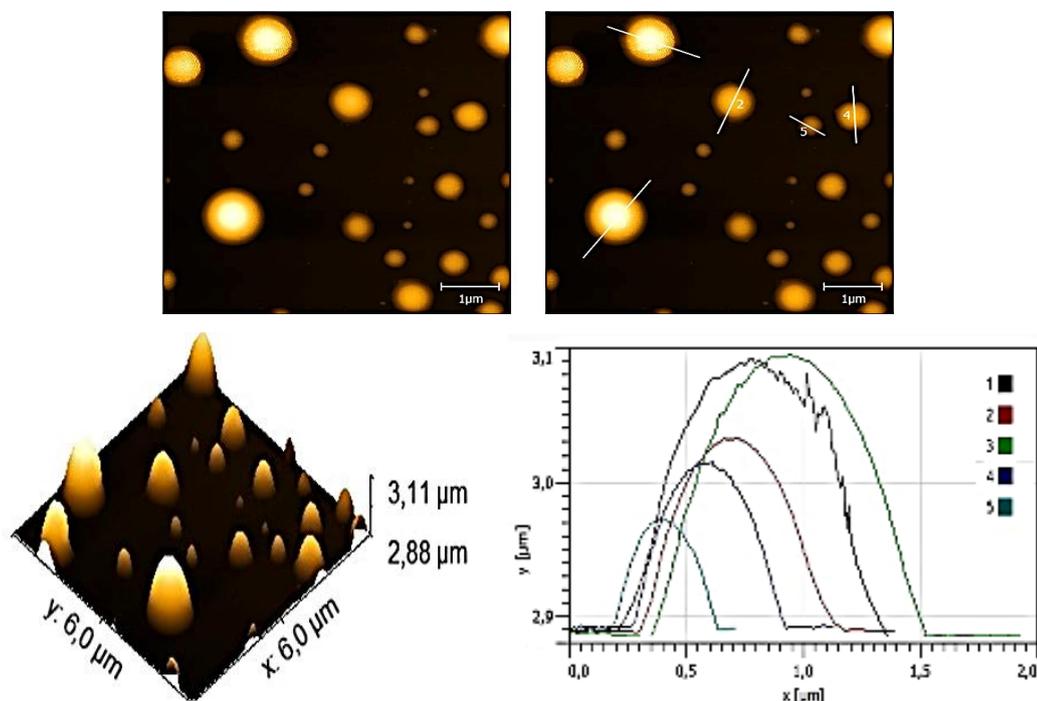
**Fonte:** Autora, 2020.

Comparando os resultados obtidos com estudos presentes na literatura, podemos considerar que o aumento do tamanho dos lipossomas está diretamente associado a incorporação do quantum dots mágico de CdSe/CdS a essas estruturas. Já a diminuição da polidispersividade pode estar relacionado a um possível aumento de estabilidade do conjugado formado, porém outros estudos deverão ser realizados

a fim de averiguar efetivamente o que promoveu o aumento da uniformidade dessas estruturas (PLENAGL et al, 2019).

Na figura 18 é possível observar as imagens topográficas para os lipossomas conjugados aos CdSe/CdS e a LQM168, onde as vesículas lipossomais apresentam-se com tamanhos entre  $10\mu\text{M}$  a  $1000\mu\text{M}$ , apresentando um maior tamanho das vesículas, menor polidispersividade e menor rugosidade quando comparados ao estudo realizado apenas para os lipossomas e os lipossomas conjugados apenas com CdSe/CdS.

**Figura 18** – Imagens de AFM dos lipossomas conjugados com CdSe/CdS e LQM168.



Fonte: Autor, 2020.

Os resultados obtidos para os lipossomas conjugados com CdSe/CdS e a LQM168 estão de acordo com estudos já descritos na literatura, onde o aumento das vesículas é proveniente da incorporação das substâncias às vesículas. Já a diminuição da polidispersividade e rugosidade pode estar associado ao aumento da estabilidade dos lipossomas associados aos CdSe/CdS e a LQM168. Porém mais estudos devem ser realizados a fim de evidenciar o real fator que está promovendo o aumento da estabilidade (PLENAGL et al, 2019).

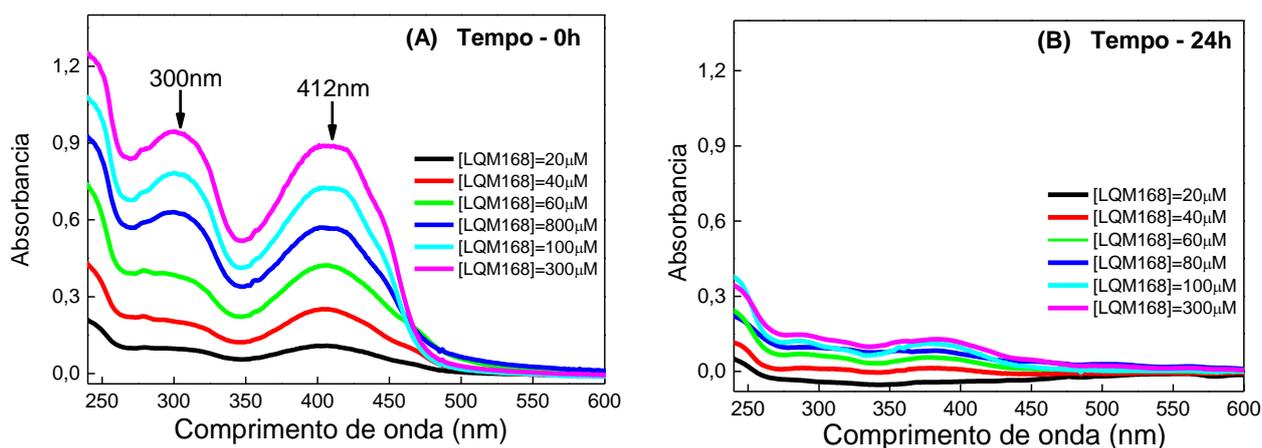
#### 4.1.2 Caracterização dos lipossomas conjugados por UV-Vis

Os métodos espectroscópicos são bastante descritos na literatura como ferramentas úteis para comprovar a associação entre substâncias e carreadores de diferentes naturezas, além de proporcionar a realização de estudos como cinética de liberação, avaliação da estabilidade dos complexos assim com a sua quantificação (DA SILVA, 2018; DA SILVA, 2017).

Inicialmente a LQM168 foi avaliada por UV-Vis a fim de determinar o seu comportamento espectroscópico em meio aquoso. Na figura 19a é possível observar os espectros da molécula no tempo 0, o qual apresenta uma banda de absorção no comprimento de onda de 300nm e outra banda de absorção em 412nm as quais aumentaram de intensidade com o aumento da concentração da molécula estudada.

Após 24h em exposição a luz artificial, as mesmas amostras foram novamente analisadas (Figura 19b) e foi observada uma diminuição significativa das duas bandas de absorção; esse comportamento pode ser explicado pela instabilidade da molécula em meio aquoso devido a sua baixa solubilidade e/ou pela sua fotodegradação observado durante os experimentos.

**Figura 19** - Espectro de absorção de UV-Vis a LQM168 em diferentes concentrações – (A) LQM168 no tempo 0h; (B) LQM168 após 24h.

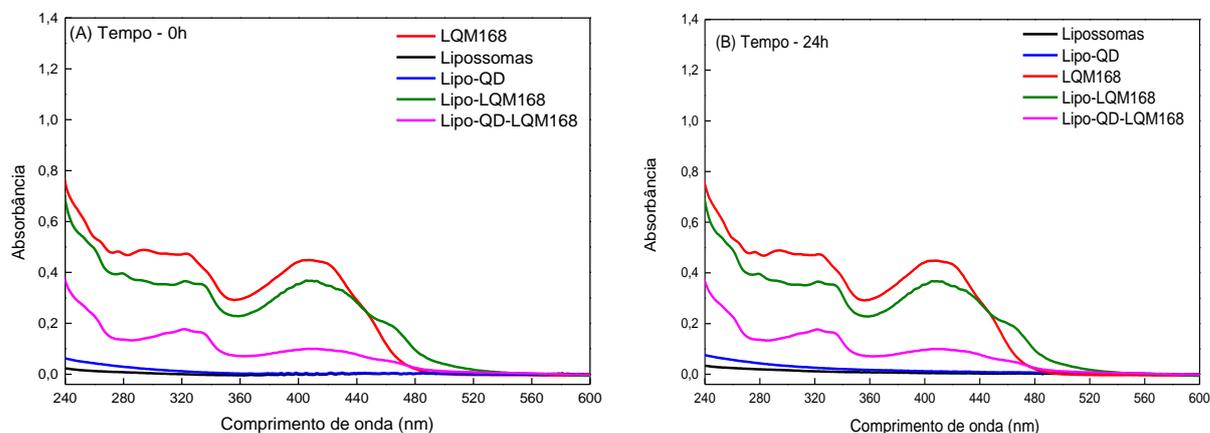


**Fonte:** Autora, 2020.

A partir do comportamento apresentado pela LQM168 no estudo anterior, foi realizado a associação da molécula aos lipossomas catiônicos e aos lipossomas catiônicos funcionalizados com CdSe/CdS, a fim de melhorar a sua estabilidade em meio aquoso. Nos resultados apresentados, é possível avaliar o aumento da

estabilidade da LQM168 após a associação aos carreadores, pela permanência do comportamento espectroscópico no tempo 0 e após 24h. (Figura 20).

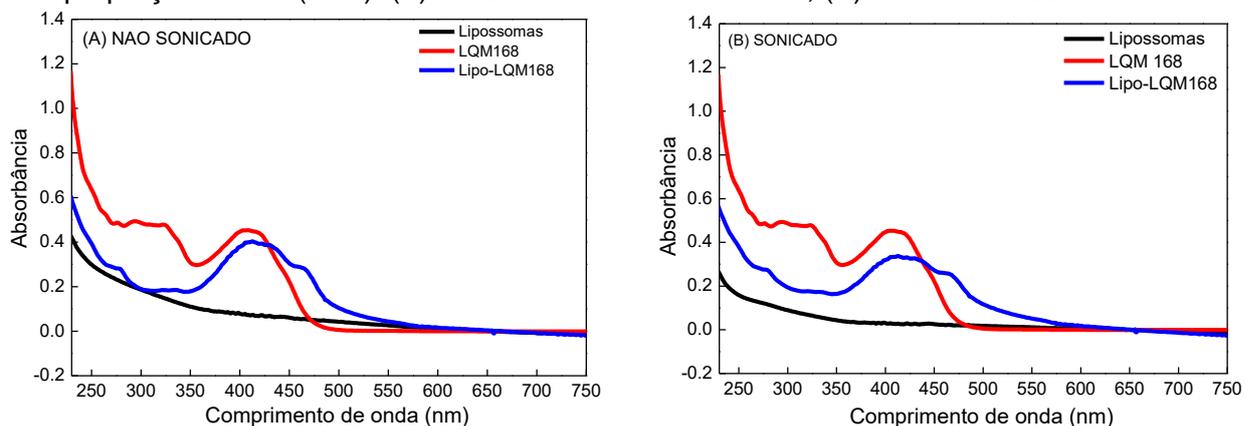
**Figura 20** - Espectro de absorção de UV-Vis dos conjugados – (A) LIPO:LQM168 e LIPO:QD:LQM168 no tempo 0h; (B) LIPO:LQM168 e LIPO:QD:LQM168 após 24h.



Fonte: Autora, 2020.

A partir do comportamento espectroscópico da LQM168, foi possível avaliar a sua conjugação aos lipossomas, através das mudanças observadas referente as bandas de absorção da molécula. No conjugado LIPO:LQM168 antes e depois do processo de sonicação é possível observar uma interação entre as estruturas pela supressão da banda em 300nm, pelo deslocamento batocrômico e hipocrômico da banda em 412nm, além do surgimento de uma pequena banda em 460nm. Além disso é possível observar que não há mudanças significativas nos espectros dos conjugados antes e após o processo de sonicação, como é possível observar na figura 21.

**Figura 21** - Espectro de UV-Vis para a formação do complexo LIPO:LQM168 em meio aquoso na proporção de 1:2 (m/m). (A) LIPO:LQM168 não sonicado; (B) LIPO:LQM168 sonicado.

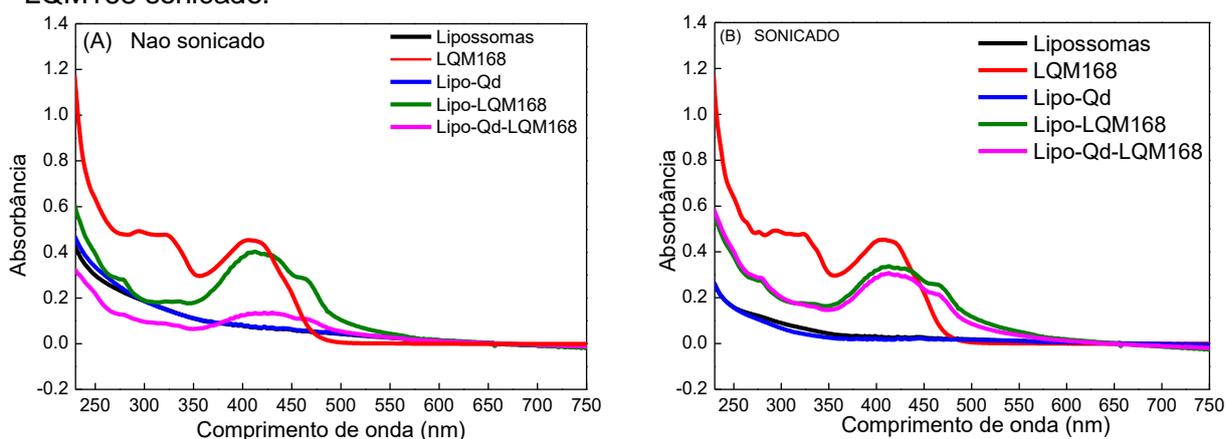


**Fonte:** Autora, 2020.

A literatura relata que os núcleos quinolínicos apresentam transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  por ser um heterocíclico aromático; essas transições apresentam picos máximos de absorção entre 263 e 330nm (CORREIA et al., 2015). Através dessas informações é possível associar a supressão da banda em 300nm a uma interação do núcleo quinolínico com a bicamada lipídica dos lipossomas catiônicos devido à alta apolaridade observada nessa estrutura. Além disso, a literatura relata que a presença de uma nova banda, em estudos dessa natureza, é característica da presença de mais de uma espécie absorvente no meio; com isso podemos associar a presença dessa nova banda em 460nm com a formação do conjugado LIPO:LQM168 (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRIL, 1994; CORREIA et al, 2015).

No conjugado LIPO:QD:LQM168 antes de submeter ao processo de sonicação é possível observar a supressão da banda em 300nm e um deslocamento batocrômico e hipocrômico bem acentuado da banda em 412nm, além do surgimento de uma pequena banda em 460nm (Figura 22a). No complexo LIPO:QD:LQM168 após o processo de sonicação observamos as mesmas alterações, porém o deslocamento hipocrômico referente a banda em 412nm é bem semelhante ao do complexo na ausência de quantum dot (Figura 22b).

**Figura 22** - Espectro de UV-Vis para a formação do complexo LIPO:QD:LQM168 em meio aquoso na proporção de 1:2 (m/m). (A) LIPO:QD:LQM168 não sonicado; (B) LIPO:QD:LQM168 sonicado.



**Fonte:** Autora, 2020.

O deslocamento hipocrômico em 412nm bem acentuado observado no complexo não sonicado pode ser explicado pela adsorção dos quantum dots na superfície dos lipossomas, permitindo que a porção da molécula não ancorada na

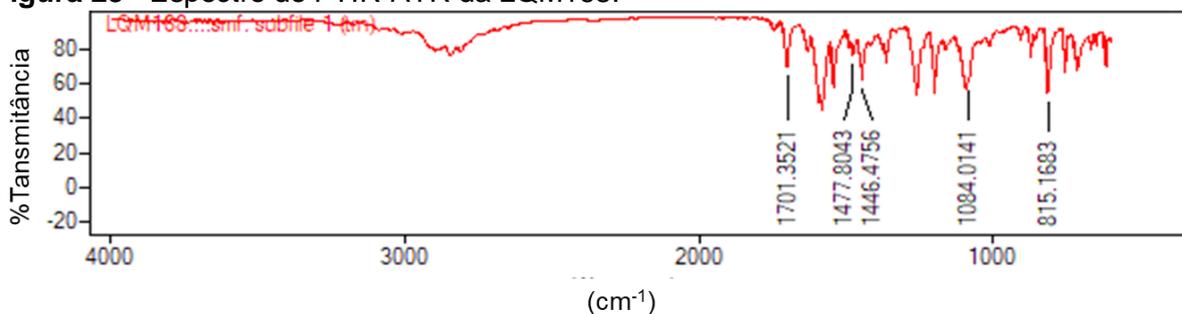
bicamada lipídica interaja com os quantum dots. Esse comportamento não é observado no complexo sonicado, uma vez que, o processo de sonicação favorece o acúmulo dos quantum no núcleo dos lipossomas (CORREIA et al., 2015).

#### 4.1.3 Caracterização dos lipossomas conjugados por FTIR

Os estudos de FTIR nos permitiu obter informações referentes as possíveis interações da LQM168 com os lipossomas e lipossomas associados ao CdSe/CdS, a partir da avaliação das deformações rotacionais e vibracionais referentes as ligações químicas da LQM168 (SKOOG, 2009).

Santos-Júnior (2017), em seus estudos de caracterização da LQM168, demonstrou por FTIR que a molécula apresentou as seguintes bandas de absorção: em  $796\text{cm}^{-1}$  a  $818\text{cm}^{-1}$  referente a um estiramento de ligação C (aromático) – Cl; em  $1446\text{cm}^{-1}$  referente a um estiramento do substituinte metil na posição 4 do anel; em  $1477\text{cm}^{-1}$  são bandas características da presença de grupos  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$ ; em  $1701\text{cm}^{-1}$  referente a um estiramento da carbonila éster (Figura 23) (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRIL, 1994 CORREIA et al, 2015).

**Figura 23** - Espectro de FTIR-ATR da LQM168.



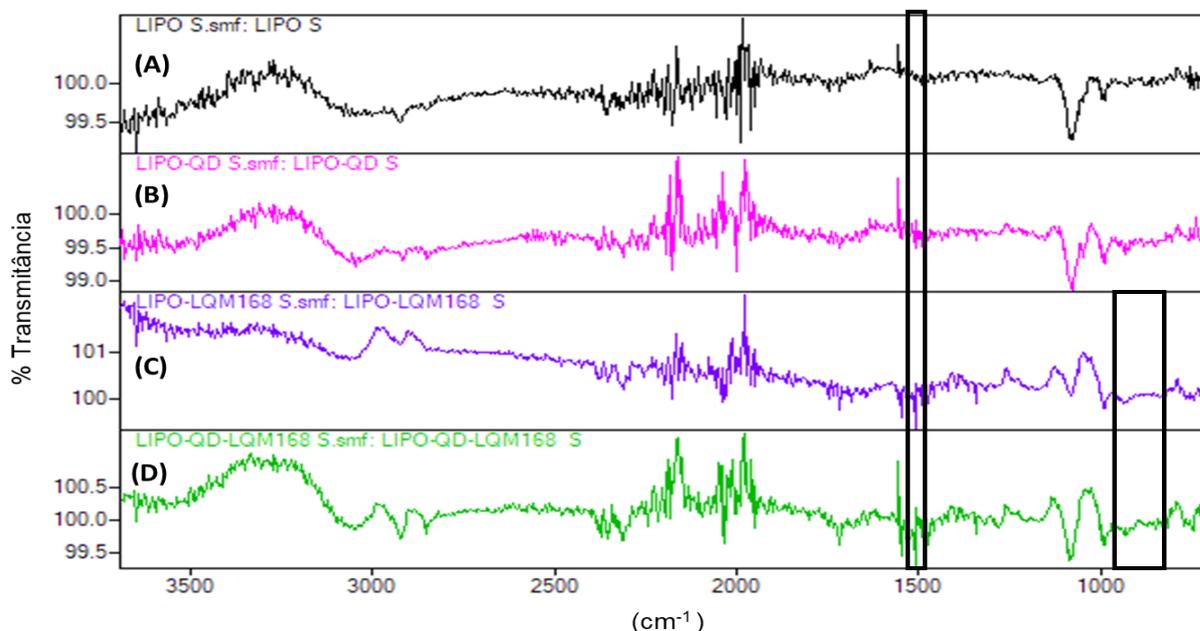
**Fonte:** Autora, 2020.

Através do espectro obtido, foi possível avaliar uma interação entre a LQM168 com os lipossomas e os lipossomas conjugados CdSe/CdS pelo suprimento da banda em  $815\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento de ligação C – Cl presente no núcleo quinolínico, indicando uma possível interação desse núcleo com a bicamada lipídica dos lipossomas ( TAYARAN, SEVERCAN, 2007)

A permanência da banda em  $1446\text{cm}^{-1}$  apresentando um pequeno deslocamento, caracteriza um estiramento do substituinte metil na posição 4 indicando assim, que a LQM168 pode está ancorada nos lipossomas uma vez que, bandas que caracterizam a região mais apolar da molécula foram suprimidas e bandas referentes

a região da molécula com capacidade de realizar pontes de hidrogênio permaneceram (Figura 24) ( TAYARAN, SEVERCAN, 2007)

**Figura 24** - Espectro de FTIR-ATR para (A) Lipossomas não conjugados; (B) lipossomas-CdSe/CdS; (C) Lipossomas-LQM168; (D) Lipossomas-CdSe/CdS-LQM168 lipossomas.



**Fonte:** Autora, 2020.

Através desse estudo foi possível observar que os espectros referentes aos lipossomas unilamelares catiônicos e aos lipossomas unilamelares catiônicos funcionalizados com quantum dots não apresentam mudanças em seus espectros. Esse comportamento pode ser explicado pelos resultados observados nos estudos de UV-Vis, onde é demonstrado que após o processo de sonicação essas nanopartículas ficam aprisionadas no núcleo dos lipossomas.

Avaliando os espectros referentes aos complexos LIPO:LQM168 e LIPO:QD:LQM168 é possível observar uma semelhança de comportamento sem mudanças referentes as bandas observadas no estudo anterior. A banda em 815 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento de ligação C – Cl presente no núcleo quinolínico permaneceu suprimida e a banda em 1446 cm<sup>-1</sup> caracterizando um estiramento do substituinte metil na posição 4 continuou aparente, demonstrando assim um possível ancoramento da LQM168 na bicamada lipídica dos lipossomas.

Esses estudos deverão ser repetidos com o complexo liofilizado a fim de aumentar a sensibilidade da resposta obtida. Os sinais de baixa intensidade assim como as vibrações presentes em todos os espectros pode ser justificados pela baixa

concentração do complexo na suspensão analisada e pela presença de uma grande quantidade de água nas amostras respectivamente.

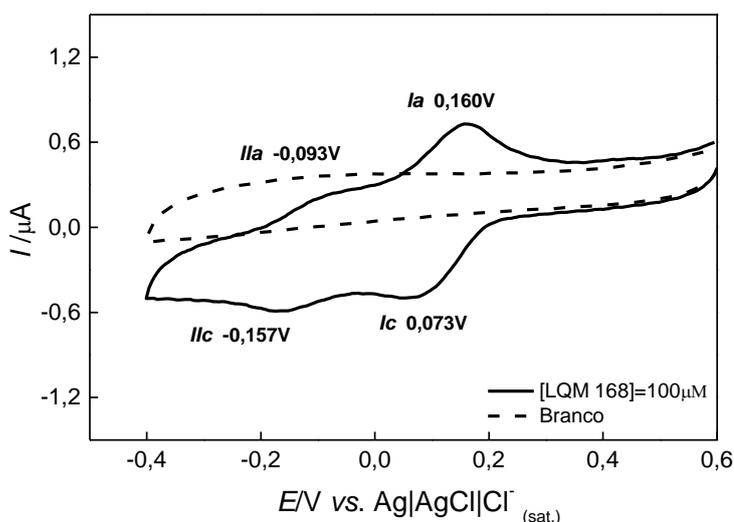
## 4.2 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DA LQM168

### 4.2.1 Comportamento eletroquímico da LQM168 em meio aprótico

Através do estudo eletroquímico da LQM168 por voltametria cíclica em meio aprótico foi possível avaliar os processos de transferências de elétrons, permitindo compreender os fenômenos de oxirredução que podem estar envolvidos nas atividades farmacológicas e toxicológicas da molécula, os quais podem estar relacionados com os mecanismos de metabolismo celular desenvolvido em meio biológico (SKOOG, 2009; BRITO, 2011; DA SILVA, 2014; PACHECO, et al 2013).

O perfil eletroquímico da LQM168 por voltametria cíclica (VC), em meio aprótico (DMF/TBAP,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), na concentração de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , apresentou duas ondas de redução ( $I_c$  em  $0,073\text{V}$  e  $II_c$  em  $-0,157\text{V}$ ) e duas ondas de oxidação ( $I_a$  em  $0,160\text{V}$  e  $II_a$  em  $-0,093\text{V}$ ) de pequena intensidade de corrente, relativas à transferência de um elétron cada como é possível observar na figura 25.

**Figura 25** - Voltamograma cíclico da LQM168, na concentração de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , em meio aprótico DMF/TBAP ( $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) vs.  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-_{(\text{sat.})}$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), Eletrodo de trabalho: carbono vítreo.

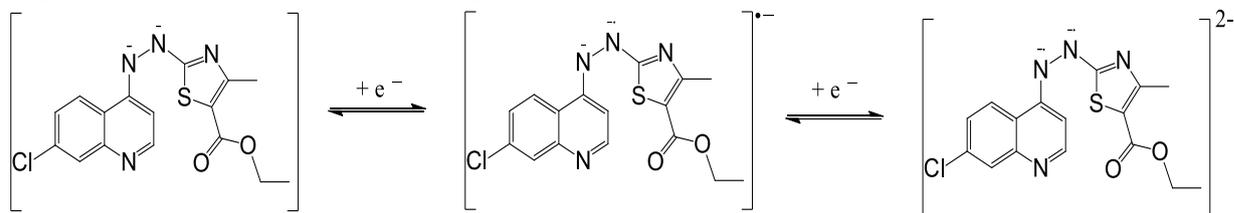


**Fonte:** Autora, 2020.

A presença dos dois picos anódicos está relacionado à desprotonação da hidrazina, formando o grupo azo (sua forma oxidada), fenômeno esse que pode ser

explicado pelo mecanismo redox azo-hidrazo. O grupo azo em meio aprótico sofre dois processos de redução de um elétron cada de forma reversível, como é possível observar no mecanismo proposto na figura 26 para a LQM168 (HAMMERICH 2015).

**Figura 26** - Mecanismo de oxirredução proposto para LQM168 em meio aprótico.

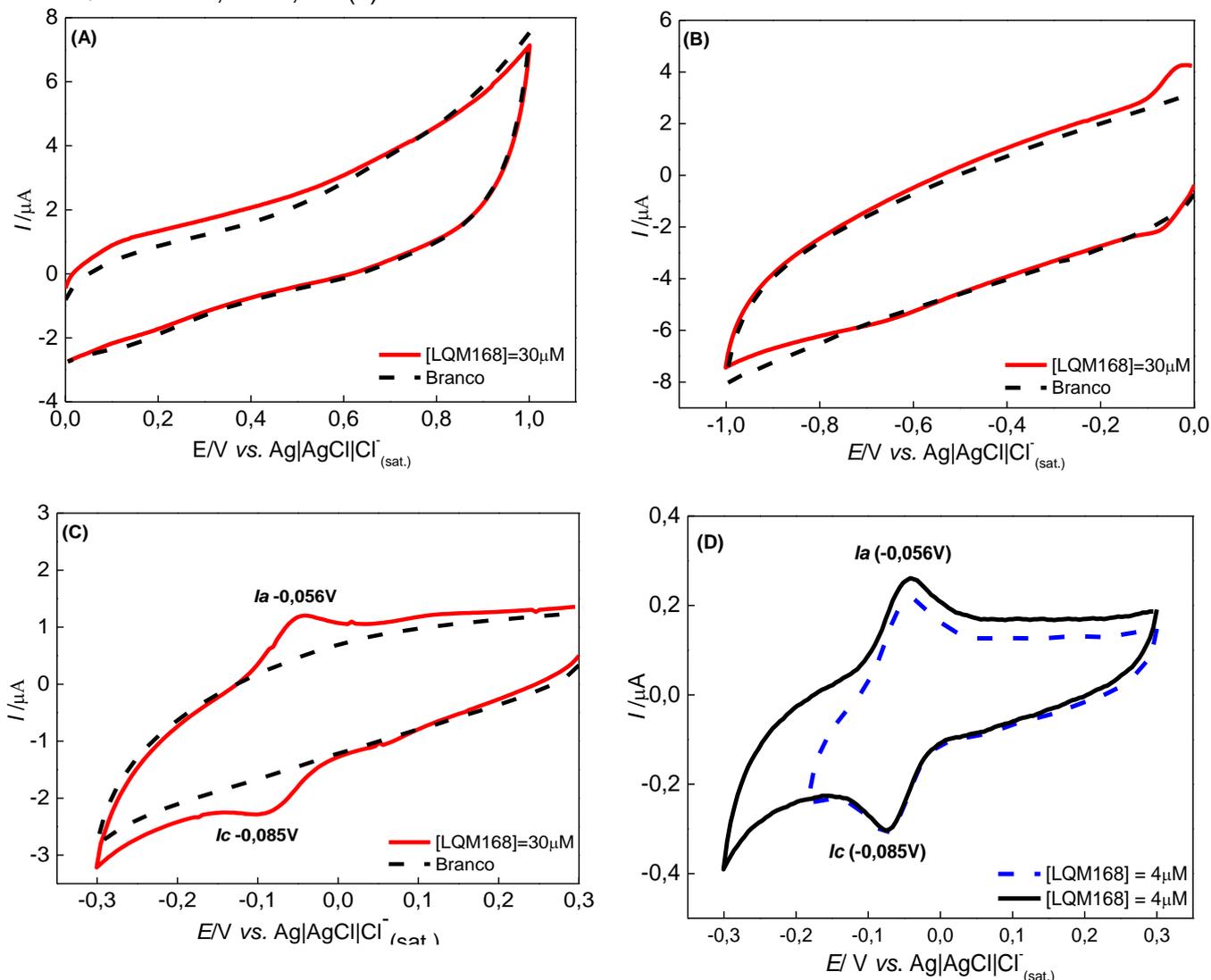


**Fonte:** Autora, 2020.

#### 4.2.2 Comportamento eletroquímico da LQM168 em meio prótico

Os estudos eletroquímicos para a LQM168 por voltametria cíclica em meio prótico foram realizados na faixa de potencial de 1,0V a -1,0V. Como a molécula apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, optamos por trabalhar inicialmente com a concentração de  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando 20% (v/v) de etanol como co-solvente para garantir a sua completa solubilização no meio. O perfil voltamétrico obtido apresentou um par redox *I<sub>c</sub>/I<sub>a</sub>* envolvendo  $2\text{H}^+ / 2\text{e}^-$  referente à formação da sua espécie oxidada (azo) e o reestabelecimento de sua forma reduzida (hidrazo) como podemos observar na Figura 27.

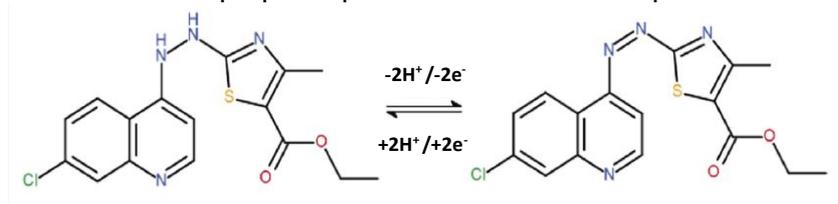
**Figura 27** - Voltamogramas cíclicos do comportamento eletroquímico da LQM168 ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e  $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em diferentes faixas de potenciais. Tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0; 20% de etanol PA; eletrodo de CV;  $\nu = 0,10 \text{ V s}^{-1}$ . (a) Voltamograma cíclico da LQM168 de 0 a 1,0V. (b) Voltamograma cíclico da LQM168 de 0 a -1,0V. (c) Voltamograma cíclico da LQM168 de 0,3 a -0,3V. (d) Reversibilidade do sistema.



**Fonte:** Autora, 2020.

A LQM168 apresenta em sua estrutura química um núcleo quinolínico associado a um grupo tiazolidínico por uma hidrazina. Avaliando a sua estrutura química e comparando com a literatura, Hammerich (2015) e Patai (1997) em seus estudos mostram que o grupo azo ( $\text{R-N=N-R}$ ) em meio aquoso sofre uma redução bioeletroquímica envolvendo  $2\text{H}^+$  e  $2\text{e}^-$  de forma reversível formando hidrazina ( $\text{R-NH-NH-R}$ ), como podemos observar no mecanismo reacional, representado pela Figura 28.

**Figura 28** - Mecanismo redox proposto para LQM168 em meio prótico.



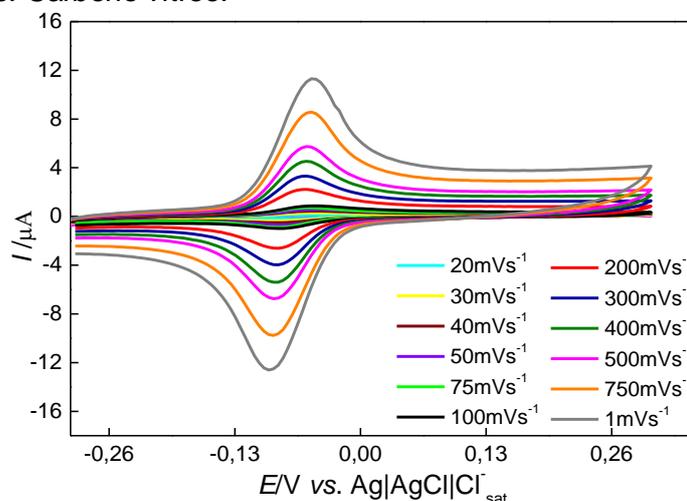
Fonte: Autora, 2020.

#### 4.2.3 Estudo de velocidade para LQM168

Os estudos eletroquímicos permitem realizar testes diagnósticos a fim de obter informações de grande relevância como: reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência eletrônica, ocorrência de reações químicas acopladas, adsorção, fenômenos catalíticos entre outros. Através da análise de parâmetros importantes, como potenciais de picos catódico e anódicos ( $E_{pc}$  e  $E_{pa}$ ), correntes de pico catódico e anódico ( $I_{pc}$  e  $I_{pa}$ ), potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ), é possível analisar os processos eletródicos ocorrido (GREEF et al., 1985; DE MOURA, 2008; SOUTHAMPTON, 2001).

O estudo de velocidade para a LQM168 foi realizado a fim de avaliar o seu comportamento eletroquímico e o processo de transporte de massa. Os voltamogramas cíclicos obtidos para a molécula em meio prótico estão demonstrados na figura 29.

**Figura 29** - Voltamogramas cíclicos da LQM168 ( $c = 4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em diferentes velocidades de varredura. Tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0; 20% de etanol PA (co-solvente); eletrodo de trabalho: Carbono vítreo.



Fonte: Autora, 2020.

Através desse estudo foi possível observar que os potenciais de pico anódico e catódico não foram alterados com o aumento de velocidade de varredura aplicado ao sistema estudado. Segundo SKOOG (2009) para que sistemas eletroquímicos sejam classificados como reversíveis um dos parâmetros que deve ser atendidos é que o potencial de pico ( $E_p$ ) seja independente da velocidade.

A partir dos voltamogramas gerados em função da variação da velocidade de varredura foi possível obter alguns parâmetros importantes, os quais estão apresentados na tabela 7.

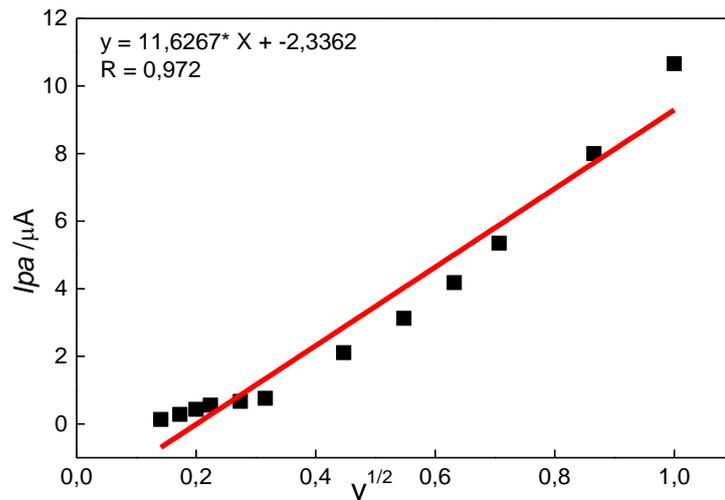
**Tabela 7** - Parâmetros eletroquímicos encontrados para LQM168 em função do estudo de velocidade de varredura.  $E_{pa}$  vs.  $Ag|AgCl|Cl^-$  (sat.).

$\nu$ ( $V s^{-1}$ )	$\nu^{1/2}$ ( $V s^{-1/2}$ )	$\log \nu$	+ $E_{pa}$ (V)	$I_{pa}$ (A)	$I_{pa}$ ( $\mu A$ )	$I_{pa} / I_{pc}$
<b>0,020</b>	0,141	-1,699	-0,041	$1,300 \times 10^{-7}$	0,130	-0,956
<b>0,030</b>	0,173	-1,523	-0,051	$2,810 \times 10^{-7}$	0,281	-1,011
<b>0,040</b>	0,200	-1,398	-0,046	$4,328 \times 10^{-7}$	0,433	-1,031
<b>0,050</b>	0,224	-1,301	-0,046	$5,522 \times 10^{-7}$	0,552	-0,882
<b>0,075</b>	0,274	-1,125	-0,056	$6,692 \times 10^{-7}$	0,669	-1,034
<b>0,100</b>	0,316	-1,000	-0,051	$7,859 \times 10^{-7}$	0,756	-0,920
<b>0,200</b>	0,447	-0,699	-0,056	$2,106 \times 10^{-6}$	2,106	-0,884
<b>0,300</b>	0,548	-0,523	-0,056	$3,121 \times 10^{-6}$	3,121	-0,844
<b>0,400</b>	0,632	-0,398	-0,056	$4,181 \times 10^{-6}$	4,181	-0,825
<b>0,500</b>	0,707	-0,301	-0,056	$5,348 \times 10^{-6}$	5,348	-0,837
<b>0,750</b>	0,866	-0,125	-0,051	$8,001 \times 10^{-6}$	8,001	-0,864
<b>1,000</b>	1,000	0,000	-0,051	$1,066 \times 10^{-5}$	10,660	-0,895

Fonte: Autora, 2020.

Para uma reação reversível, a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (SKOOG, 2009). A partir dessa informação foi construída uma curva  $I_{pa}$  vs.  $\nu^{1/2}$  para a LQM168, onde foi observado um comportamento linear para a molécula em baixas (20 a 100  $mV s^{-1}$ ) e em altas velocidades (200 a 1000  $mV s^{-1}$ ) de varredura (Figura 30).

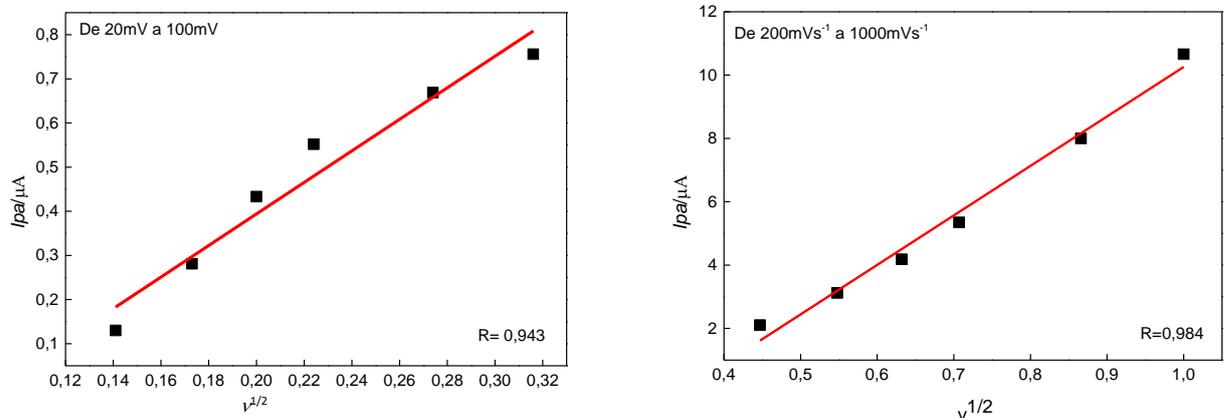
**Figura 30** - Análise da corrente de pico para a primeira onda de oxidação ( $i_{pa}$ ) da LQM168 em função da  $v^{1/2}$ .



Fonte: Autora, 2020.

A fim de avaliar melhor o comportamento da LQM168 apresentado no estudo anterior, duas curvas de  $i_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$  foram construídas, a primeira avaliando o processo de 20 a 100  $mV s^{-1}$  e a segunda de 200 a 1000  $mV s^{-1}$  como é possível observar na figura 31.

**Figura 31** - Análise da corrente de pico para a primeira onda de oxidação ( $i_{pa}$ ) da LQM168 em função da  $v^{1/2}$  (A) De 20 a 100  $mV s^{-1}$ ; (B) De 200 a 1000  $mV s^{-1}$



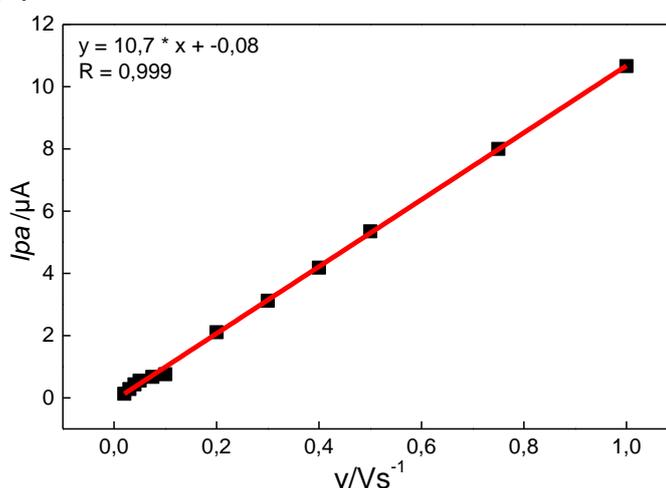
Fonte: Autora, 2020.

Avaliando a  $i_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$  da LQM168 em baixas velocidades foi possível observar um comportamento não linear da corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que o transporte de massa da solução para a superfície do eletrodo é de natureza adsortiva. Para valores de velocidades acima de 100mV podemos observar um comportamento linear da corrente em função da raiz quadrada da velocidade, indicando que o processo de transporte de massa é de natureza difusional (COSTA, 2011; DE MOURA, 2008).

Esse comportamento pode ser explicado, pois em baixas velocidades as espécies eletrogeradas permanecem mais tempo interagindo com a superfície do eletrodo, o que pode dificultar o processo de transferência de massa. Contudo, os resultados apresentados indicam que o processo de transporte de massa da solução para a superfície do eletrodo é de natureza adsortiva em baixas velocidades e difusional em altas velocidades (COSTA, 2011; DE MOURA, 2008).

Para sistemas reversíveis, a corrente de pico varia linearmente com a velocidade de varredura (SKOOG, 2009). Através da construção do gráfico  $i_{pa}$  vs.  $v/Vs^{-1}$  foi possível observar o aumento da corrente no sistema estudado para a LQM168 (Figura 32)

**Figura 32** - Análise da corrente de pico ( $i_{pa}$ ) para a primeira onda de oxidação para a LQM168 em função da  $v/Vs^{-1}$ .

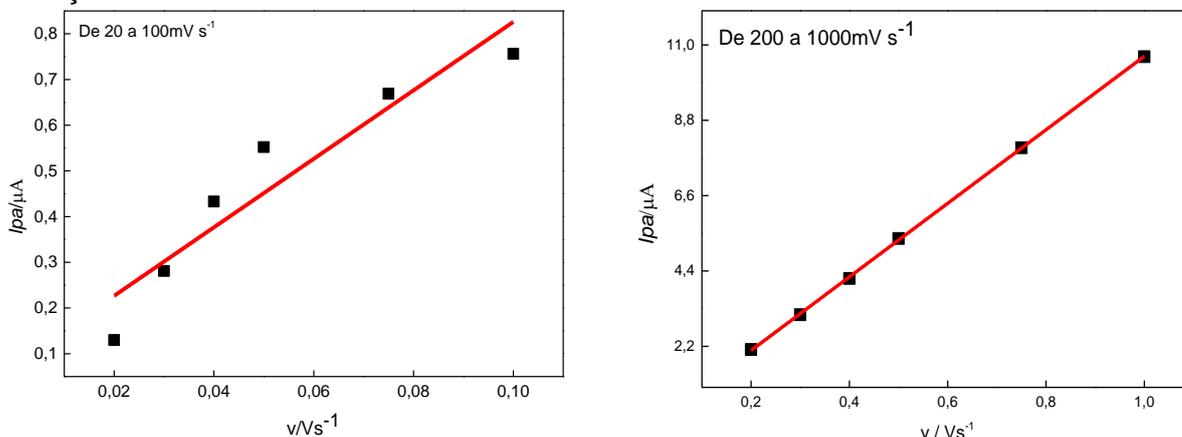


**Fonte:** Autora, 2020.

Avaliando o comportamento apresentado no gráfico anterior, foi possível construir duas curvas, a primeira de 20 a 100mVs<sup>-1</sup> e a segunda de 200 a 1000mV s<sup>-1</sup> a fim de observar melhor o comportamento da LQM168. Em ambos os casos, o gráfico  $i_{pa}$  vs.  $v/Vs^{-1}$  apresentam um comportamento linear, porém de 20 a 100mVs<sup>-1</sup>

é observado uma menor linearidade do processo quando comparado ao comportamento da molécula de 200 a  $1000\text{mVs}^{-1}$ . (Figura 33).

**Figura 33** - Análise da corrente de pico ( $i_{pa}$ ) para a primeira onda de oxidação para a LQM168 em função da  $v / \text{Vs}^{-1}$ .



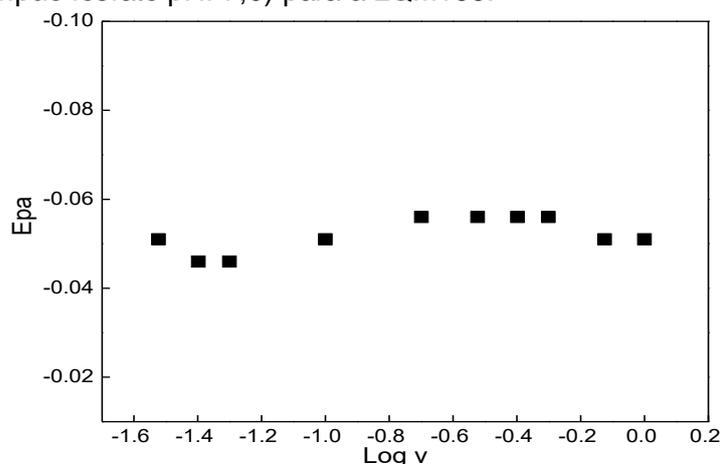
**Fonte:** Autora, 2020.

Esse comportamento de transferência de massa pode ser explicado, pois em baixas velocidades, a transferência de elétrons ocorre de forma lenta promovendo assim, um tempo maior de interação do analito com a superfície do eletrodo de trabalho, podendo ocasionar uma diminuição (bloqueio) da área eletroativa desta plataforma (FERREIRA, 2013). Esse comportamento explica a diminuição da linearidade da LQM168 em baixas velocidades.

Após cada varredura realizada em baixas velocidades ( $20$  a  $100\text{ mV s}^{-1}$ ), a superfície eletródica foi avaliada por uma sonda eletroquímica e apresentou uma  $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$  superior a  $100\text{mV}$ , demonstrando uma diminuição da área eletroativa devido à passivação da superfície eletródica após o processo de transferência eletrônica da LQM168. O comportamento descrito anteriormente não foi observado nos estudos realizados em velocidades acima de  $100\text{mV s}^{-1}$ , onde o perfil do voltamétrico da superfície do eletrodo de trabalho avaliado por sonda eletroquímica permaneceu constante após as análises da LQM168.

A análise da variação do potencial de oxidação em função do log da velocidade de varredura, juntamente com a presença do pico reverso indicam que o processo é de natureza reversível, pois o  $E_{pa}$  não varia em função da velocidade de varredura, como podemos observar na figura 24 (COSTA, 2011; DE MOURA, 2008).

**Figura 34** - Gráfico de potencial de pico de primeira onda de oxidação em função do log v em meio prótico (Tampão fosfato pH: 7,0) para a LQM168.



**Fonte:** Autora, 2020.

Através desses resultados, podemos inferir que a LQM168 apresenta o processo de transferência de massa de natureza difusional e que seu comportamento eletroquímico é de natureza reversível por atender os parâmetros pré-estabelecidos presentes na literatura.

#### 4.2.4 Estudo em meio aprótico da LQM168 em presença de oxigênio por voltametria cíclica

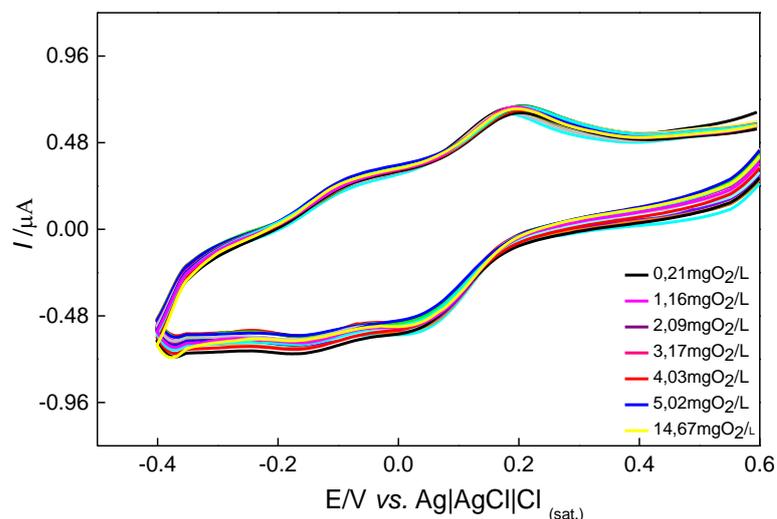
Estudos que avaliam a capacidade de moléculas promoverem a geração de ERO's é de suma importância a fim de avaliar possíveis danos a nível celular. Os estudos eletroquímicos é um dos melhores modelos para simular o processo de peroxidação lipídica em membranas celulares ocasionado por espécies reativas de oxigênio (SILVA, 2017).

Estudos presentes na literatura mostram que a adição de oxigênio em sistemas capazes de gerar espécies reativas de oxigênio promovem mudanças notáveis no perfil voltamétrico como o surgimento de novos sinais eletroquímicos, deslocamento de potencial e alteração na intensidade das correntes (FERREIRA, 2013; SILVA, 2017).

Para que uma molécula seja capaz de gerar ERO's, o oxigênio presente no meio deve ser reduzido pela molécula a fim de ser gerada as espécies radicalares. Esse processo de transferência de elétrons promove mudanças no perfil voltamétrico da molécula (FERREIRA, 2013; SILVA, 2017). Nos estudos realizados com a LQM168 em presença de oxigênio, não foi observada mudanças significativas em seu perfil

voltamétrico, podendo inferir que a LQM168 não gera espécies reativas de oxigênio (Figura 35).

**Figura 35** - Voltamogramas cíclicos para LQM168 ( $c = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) em meio aprótico DMF/TBAP ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) na presença de diferentes concentrações de oxigênio. Faixa de potencial= 0,6V a -0,3V; Eletrodo de carbono vítreo;  $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ .



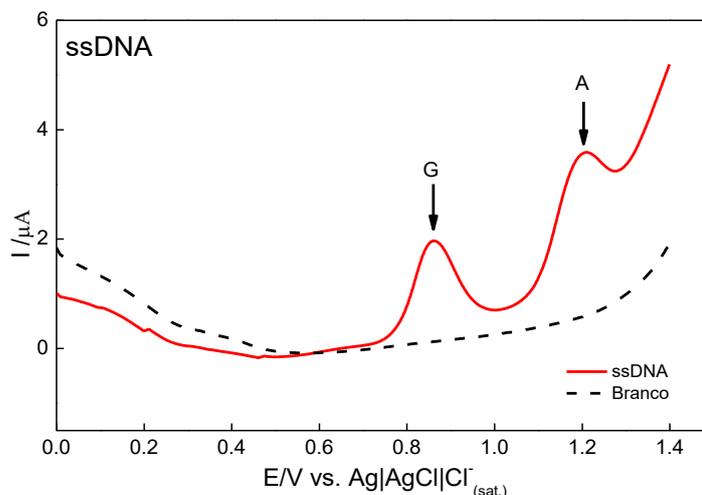
**Fonte:** Autora, 2020.

#### 4.2.5 Estudo de interação da LQM168 com ssDNA por voltametria de pulso diferencial

A LQM168 é uma molécula híbrida a qual apresenta um núcleo quinolínico associado a um núcleo tiazolidínico por uma hidrazina e, como já foi abordado anteriormente, os dois heterocíclicos que constituem essa molécula apresentam atividade antitumoral descrita na literatura. A quinolina, por sua vez, pode ter sua atividade antitumoral justificada por vários mecanismos, um deles é a capacidade de agir como um agente intercalante de DNA (CHAVDA et al., 2010; KRAUSE et al., 2011; AFZAL et al., 2015; ASSATI et al., 2014).

O ssDNA em solução foi avaliado na ausência e na presença da LQM168 por VPD. Inicialmente foi analisada a oxidação das bases guanina e adenina em meio ácido (tampão acetato pH: 4,5), onde foi observado sinais intensos e bem definidos nos potenciais de +0,9V, referente a oxidação da guanina, e em +1,2V, referente a oxidação da adenina como demonstrado na figura 25 (DA SILVA, 2018; FERREIRA, 2013; COSTA, 2011).

**Figura 36** - Voltamograma de Pulso Diferencial do ssDNA - (G) guanina e (A) adenina; tampão acetato pH= 4.5; Eletrodo de carbono vítreo; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

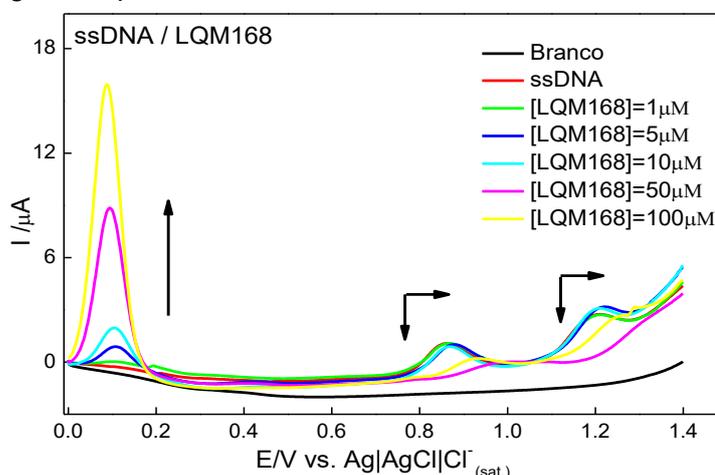


Fonte: Autora,2020.

Avaliando o comportamento eletroquímico do ssDNA na presença de LQM168, foi possível observar o aparecimento de um pico anódico no potencial de +0,085V, o qual apresentou um aumento da intensidade de corrente à medida que a concentração da amostra aumentou no sistema. A presença desse novo sinal foi correlacionada ao processo de oxidação da LQM168 (Figura 37).

Com o aumento da concentração da molécula no sistema também foi possível observar uma diminuição da intensidade de corrente dos sinais de oxidação das bases guanina e adenina, assim como o deslocamento dos potenciais de oxidação das bases para valores mais positivos (Figura 37).

**Figura 37** - Voltamogramas de Pulso Diferencial do ssDNA na presença de diferentes concentrações de LQM168. Tampão acetato pH= 4.5; Eletrodo de carbono vítreo; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

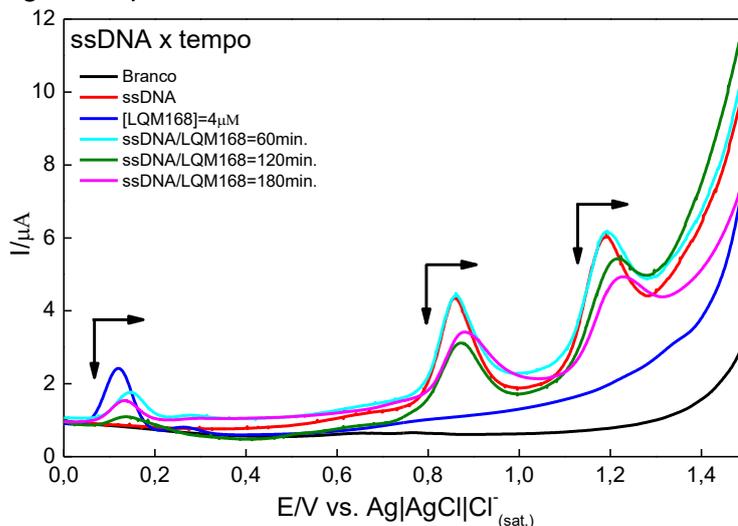


**Fonte:** Autora, 2020.

Esse estudo demonstrou maiores alterações nos sinais referentes ao comportamento eletroquímico da guanina e adenina em concentrações acima de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Como forma de avaliar melhor o comportamento observado, o tempo de interação entre o ssDNA e a LQM168 foi avaliado.

Para entender a influência do tempo no sistema analisado, a concentração da LQM168 permaneceu fixa ( $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e o tempo de interação foi avaliado durante um período de 180 minutos. No voltamograma apresentado na figura 38, é possível observar uma diminuição do sinal referente a oxidação da LQM168 e um discreto deslocamento do seu potencial para valores mais positivos; também foi observado uma diminuição da intensidade de corrente assim como um deslocamento dos potenciais de oxidação das bases guanina e adenina para valores mais positivos.

**Figura 38** - Voltamogramas de pulso diferencial ssDNA:LQM168 em função do tempo. Tampão acetato pH = 4,5. [LQM 168]:  $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}$ ; Eletrodo de carbono vítreo; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Fonte:** Autora, 2020.

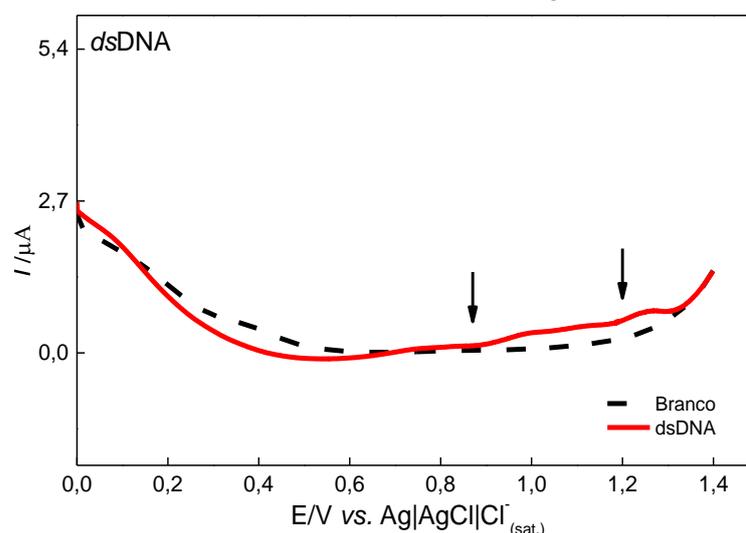
Podemos explicar a diminuição da intensidade de corrente do ssDNA pela diminuição da disponibilidade das bases purínicas passíveis de oxidação, uma vez que, a LQM168 ao interagir com a guanina e adenina através de interações eletrostáticas tornando-as menos disponíveis. Essas interações modificam a estrutura das bases e da molécula estudada, tendo como consequência o deslocamento do potencial para valores positivos, mostrando que o processo de oxidação das bases e da LQM 168 está sendo dificultado devido a interação ssDNA-LQM168 (COSTA, 2011; SILVA, 2018; KAMEL et al 2008).

#### 4.2.6 Estudo de interação da LQM168 com *dsDNA* por voltametria de pulso diferencial

A fim de investigar o comportamento da LQM168 frente a dupla hélice de DNA, os estudos foram realizados utilizando um biossensor de DNA através da técnica de voltametria de pulso diferencial.

Inicialmente avaliamos o comportamento eletroquímico do biossensor na ausência da LQM168 em uma varredura anódica de 0 a +1,4V. No voltamograma obtido foi possível observar a ausência de sinais de oxidação nos potenciais de +0,9V e +1,2V referentes a oxidação da guanina e adenina, respectivamente, como podemos observar na figura 39.

**Figura 39** - Voltamogramas de pulso diferencial de *dsDNA*. Tampão acetato pH = 4,5; Eletrodo de carbono vítreo; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms;  $v = 50\text{mV s}^{-1}$ .



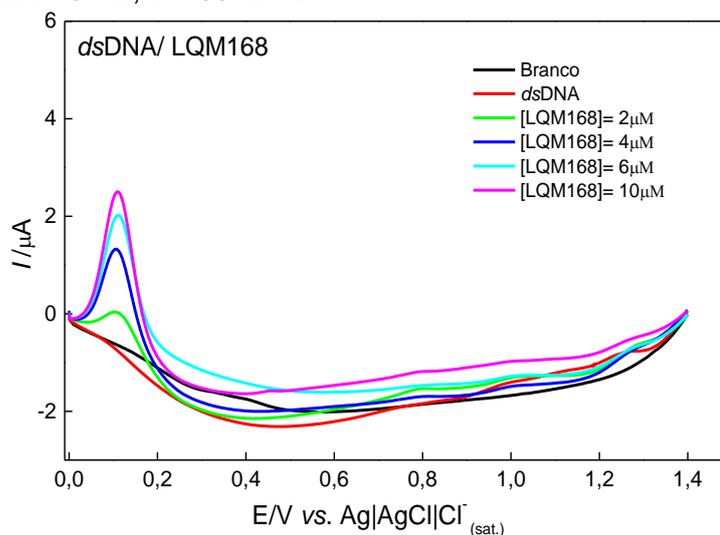
**Fonte:** Autora, 2020.

Avaliando o comportamento eletroquímico do biossensor em presença da LQM168, este foi posto em contato com as soluções das amostras (em diferentes concentrações) por um tempo de 10 minutos de interação; ao realizar as varreduras, os voltamogramas obtidos apresentam um sinal de oxidação no potencial de +0,0885V com aumento de intensidade da corrente à medida que a concentração da LQM168 aumentava no meio, e não foi observado o deslocamento do potencial confirmando o processo de oxidação da molécula estudada.

Os estudos eletroquímicos de interação da LQM168 com *dsDNA* não demonstraram sinais de oxidação nos potenciais de +0,9V e +1,2V referente a oxidação das bases purínicas. O perfil eletroquímico observado foi semelhante a varredura na ausência da LQM168 como podemos observar na figura 40,

demonstrando que a LQM168, não promoveu danos a estrutura de dupla hélice do DNA (quebra das ligações covalentes) impossibilitando a oxidação das bases purínicas.

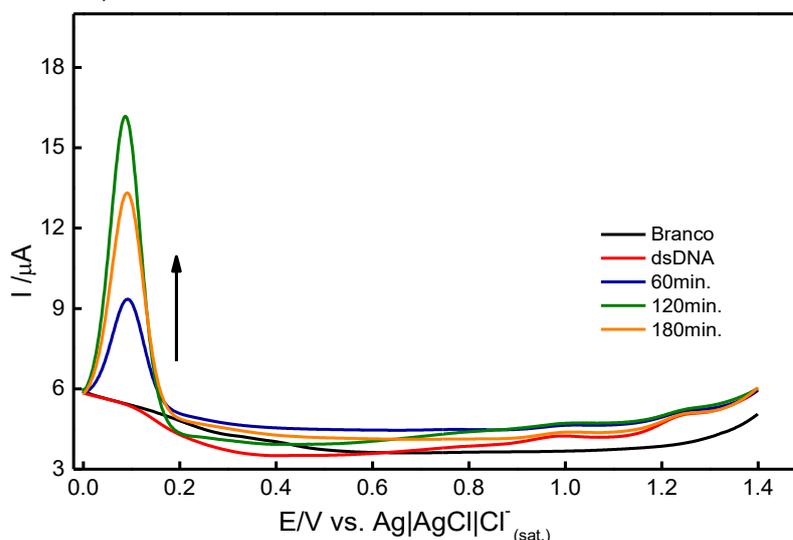
**Figura 40** - Voltamogramas de pulso diferencial de dsDNA-LQM168 em diferentes concentrações. Tampão acetato pH = 4,5; Eletrodo de carbono vítreo; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Fonte:** Autora, 2020.

A fim de avaliar melhor os resultados obtidos, fixamos a concentração da LQM168 ( $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e avaliamos o comportamento do sistema durante 180 minutos. Os voltamogramas obtidos permaneceram com um comportamento semelhante a varredura na ausência de LQM168 nos potenciais referente a oxidação das bases purínicas (guanina e adenina) e demonstraram um sinal anódico em  $+0,0885 \text{ V}$  com o aumento de intensidade de corrente em função do tempo (Figura 41).

**Figura 41** - Voltamogramas de pulso diferencial dsDNA-LQM168 em função da variação do tempo. Tampão acetato pH = 4,5; Eletrodo de carbono vítreo; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso 70 ms;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



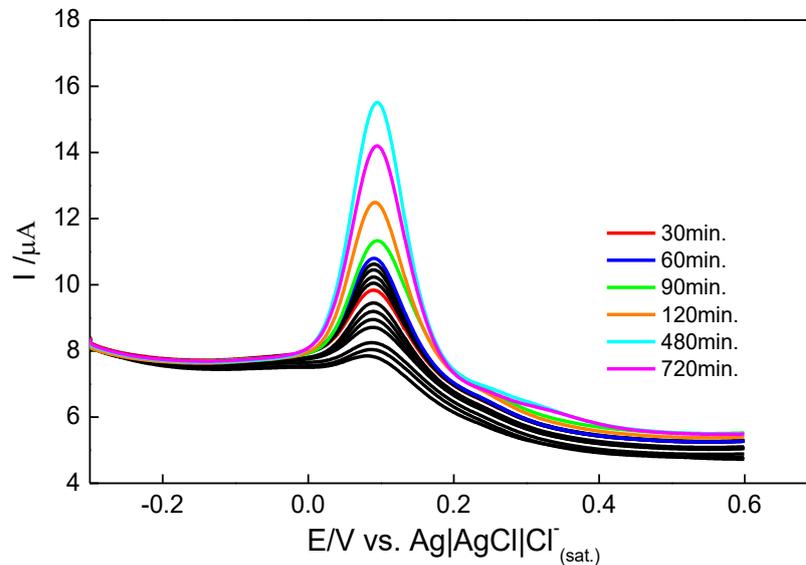
**Fonte:** Autora, 2020.

O aumento do sinal referente a oxidação da LQM168 pode ser justificado pelo aumento da sua concentração na superfície do eletrodo. Com o aumento do tempo de interação entre a molécula e a dupla hélice de DNA, o aumento da corrente é ocasionado devido a uma maior quantidade de molécula na superfície do biossensor passível de sofrer oxidação quando o potencial é aplicado.

Como a concentração da amostra nesse estudo não sofreu variação, o aumento da corrente pode ser justificado pelo aumento da concentração da LQM168 no dsDNA em função do tempo. A LQM168 pode estar sendo intercalada na fita dupla de DNA de forma não covalente, pois não foi observado picos anódicos referentes as bases purínicas (indicativo da abertura da dupla hélice pela quebra das ligações covalentes). (PAULA, 2006; SANTOS-JUNIOR, 2017; SILVA, 2018).

Analisando o comportamento observado anteriormente, um biossensor de dsDNA foi construído e avaliado na faixa de potencial de 0 a +0,6V. Os voltamogramas obtidos apresentaram um comportamento semelhante ao estudo anterior, onde foi possível observar um pico anódico referente a oxidação da LQM168 com aumento da intensidade da corrente em função do tempo de interação, provando, mais uma vez, que a LQM168 apresenta afinidade pelo dsDNA, e que pode estar interagido com a dupla hélice de DNA por intercalação não covalente (Figura 42).

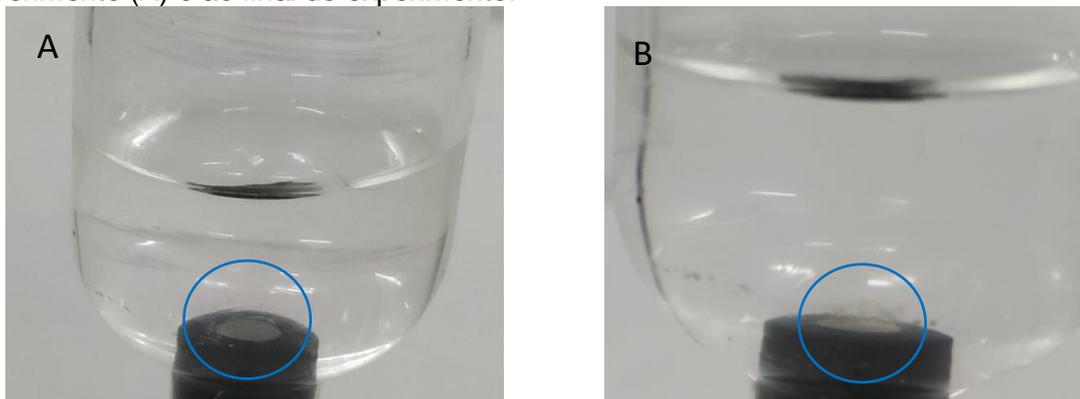
**Figura 42** - Voltamogramas de pulso diferencial do dsDNA sem oxidação das bases purínicas na presença de LQM168 ( $c = 4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em função da variação do tempo. Eletrodo de carbono vítreo; Tampão acetato pH = 4,5; Amplitude de pulso 50 mV; largura de pulso



**Fonte:** Autora,2020.

Ao terminar o estudo foi possível observar que a solução do sistema analisado no início do experimento apresentava uma coloração amarelo claro translúcido e ao fim do estudo estava incolor; o mesmo aconteceu com o gel de dsDNA que no início do experimento apresentava um aspecto translúcido e ao final do experimento apresentou uma coloração amarelo claro, confirmando que a LQM168 tem afinidade pela estrutura da dupla hélice de DNA (Figura 43).

**Figura 43** - Imagem do biossensor de dsDNA na presença da LQM168 no início do experimento (A) e ao final do experimento.



**Fonte:** Autora,2020.

## 5 CONCLUSÃO

Através das análises de AFM, foi possível observar a conjugação dos quantum dots mágicos e da LQM168 aos lipossomas pelo aumento do tamanho das vesículas, diminuição da polidispersividade e rugosidade das vesículas. Foi possível observar também que a conjugação da LQM168 e dos CdSe/CdS possivelmente aumentam a estabilidade dos lipossomas quando comparado aos lipossomas não conjugados.

A caracterização dos complexos de inclusão da LQM168:LIPO não sonificado e sonificado por UV-Vis, demonstrou que uma interação está ocorrendo entre as estruturas analisadas pelo suprimento da banda em 300nm (referente ao núcleo quinolínico), pelo deslocamento batocrômico e hipocrômico da banda em 412nm e pelo surgimento de uma banda em 460nm (característico da presença de uma nova espécie no meio).

Os complexos LIPO:QD:LQM168 também foram caracterizados por UV-Vis e demonstraram uma interação pelo suprimento da banda em 300nm (referente ao núcleo quinolínico), pelo deslocamento batocrômico e hipocrômico da banda em 412nm e pelo surgimento de uma banda em 460nm o que caracteriza a presença de uma nova espécie no meio. Nesse estudo também foi possível observar que o processo de sonicação favorece o acúmulo dos quantum dots na parte interna do lipossomas, pois os espectros apresentados mostram que o lipossomas não sonificado apresenta um deslocamento hipocrômico bastante intenso quando comparado ao complexo sonificado, o que indica uma interação dos quantum dots adsorvidos na superfície dos lipossomas com a região da molécula não ancorada na bicamada lipídica.

Os espectros de FTIR foram realizados apenas para os complexos LIPO:LQM168 E LIPO:QD:LQM168 sonificados onde foi possível observar o suprimento da banda  $815\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação C-Cl e a presença da banda em  $1446\text{ cm}^{-1}$  caracterizando um estiramento do substituinte metil na posição 4 do anel. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por UV-Vis indicando a formação do complexo de inclusão e que possivelmente a LQM168 está ancorada na bicamada lipídica.

Através dos estudos eletroquímicos utilizando a técnica de voltametria cíclica (VC) para a LQM168 em meio aprótico e prótico, foi possível avaliar o processo de transferência de elétrons, o qual é de natureza bieletrônica (envolve  $2H^+$  e  $2e^-$ ).

Foi possível propor os mecanismos redox em meio aprótico e prótico para a LQM168 pelas informações obtidas nos voltamogramas de VC e comparando esses resultados com a literatura específica.

Os estudos diagnósticos realizados demonstraram que o processo de transferência de massa da LQM168 para a superfície do eletrodo é de natureza difusional, e o sistema foi classificado como reversível por atender os parâmetros estabelecidos na literatura.

Os estudos de reatividade com oxigênio foram realizados e demonstraram que a LQM168 não promoveu a redução do oxigênio presente no sistema estudado, não promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Portanto a LQM168 não é capaz de promover estresse oxidativo.

Nos estudos de interação com ssDNA, foi possível observar que a LQM168 interage com as bases purínicas. pela diminuição da intensidade dos sinais de oxidação das bases guanina e adenina e pelo deslocamento dos seus potenciais para valores mais positivos. Foi possível observar também que esse comportamento é dependente da concentração e do tempo de interação.

O comportamento da LQM168 frente a fita dupla de DNA foi observado utilizando um biossensor eletroquímico de dsDNA pela técnica de VPD, onde as análises foram realizadas em diferentes concentrações da amostra e tempo de interação. Em nenhum dos sistemas analisados a LQM168 promoveu a abertura do DNA (quebra das ligações covalentes das bases purínicas comprovado pela não exposição das bases guanina e adenina).

Utilizando o biossensor de DNA pela técnica de VPD foi possível observar que a LQM168 apresenta uma afinidade pelo dsDNA devido ao aumento da intensidade de corrente, o qual foi observado nos estudos de variação de tempo. Comparando os resultados obtidos com a literatura, a LQM168 apresenta um comportamento característico de agente intercalante de DNA.

## 6 PERSPECTIVAS

Obter os complexos de inclusão liofilizados a fim de melhorar os resultados de caracterização por FTIR e realizar outros estudos de caracterização como: TG, MEV e MET

Realizar os estudos de caracterização dos complexos por potencial zeta e índice de polidispersividade, a fim de avaliar a carga superficial e o tamanho dos lipossomas respectivamente.

Avaliar a estabilidade dos complexos por UV-VIS em diferentes condições de armazenamento.

Avaliar a formação dos conjugados por eletroquímica utilizando a técnica de VPD.

Calcular a taxa de encapsulamento utilizando a espectroscopia de UV-Vis.

Concluir os estudos de dinâmica molecular.

## REFERÊNCIAS

- AFZAL, O. et al; A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 871–910, 2015.
- ALEIXO, L.M. **Voltametria: Conceitos e técnicas**. Chemkeys. Disponível em <<http://chemkeys.com/br/wpcontent/themes/chemkeysbr/article1.php?u=dm9sdGFtZXRYaWEtY29uY2VpdG9zLWUtdGVjbmljYXM=>>>. 2003. Acesso em 14 de Agosto de 2019.
- ANDRADE, C.A.S. et al; Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectinencapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435–445, 2004.
- ASSATI, V.; MAHAPATRA, D. K.; BHATI, S. K. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 814-833, 2014.
- AVANTI POLAR LIPIDS. Disponível em <<https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>>>. Acesso em 3 de março 2019.
- BARD, A. J. et al. **Electrochemical methods - Fundamentals and Applications**. 2<sup>a</sup> ed. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.: John Wiley & Sons, INC, 2001.
- BATISTA, M. C.; DE CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES. N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.2, p 168-179, 2007.
- BAWA, S., et al; Structural modifications of quinoline based antimalarial agents: recent developments. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 2, p.4-71, 2010.
- BERNARDI, D. S. **Influência da iontoforese na imunização transcutânea utilizando lipossomas e nanopartículas metálicas**. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2015, 60p.
- BOLT, A. W.; *Currente separaions*, 1997, 16(1), 23.
- BRETT, A. M. C. F. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Almedina Coimbra, 1996.
- BRITO, C. L. **Antichagásicos Potenciais: Síntese e estudo do comportamento voltamétrico de bioisósteros do Nitrofural**. Dissertação de mestrado, São Paulo, 2011, 114 p.
- CALIXTO, J. B.; JARBAS, M. S.; Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta médica da Bahia**, v 78, p 98 – 106, 2008.
- CARVALHO Jr, A. D. et al. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. **Life Sciences**, v. 80, ed 7, p. 659-664, 2007.

CHAVDA, S. et al; A novel achiral seco cyclopropylpyrido [e]indolone (CPyl) analog of CC-1065 and the duocarmycins: synthesis, DNA interactions, in vivo anticancer and anti-parasitic evaluation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry.**, v.18, ed 14, p.5016-5024, 2010.

CONTELLES, J.M., SORIANO, E. The medicinal chemistry of hybrid-based drugs targeting multiple sites of action. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, v.11, p.2714-2715, 2011.

COSTA, C. de O. **Estudo bioeletroquímico de quinonas.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2011, 191p.

CULLIS, P. R.; ALLEN, T. M. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 36-48, 2013.

DA SILVA, E. G. **Estudo da interação de carreadores com compostos naturais bioativos, via espectroscopia e eletroquímica: avaliação e desenvolvimento de plataformas contendo sistemas de nanocarreadores híbridos, conjugados com pontos quânticos de CdSe/CdS.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2018, 183p.

DA SILVA, E. G. **Estudo da reatividade ao DNA de derivados ferrocênicos, utilizando técnicas eletroquímicas e espectroscópicas.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Alagoas, 2014, 31p.

DA SILVA, M, P, G.; **Estudos eletroquímicos de interação de nitroderivado 2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[ $\beta$ ]tiofeno-3-carbonitrila com  $\beta$ -ciclodextrina e PAMAM 3ª geração.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Alagoas, 2017. 85p

DE ABREU, F. C. et al. The Application of DNA-Biosensors and Differential Scanning Calorimetry to the Study of the DNA-Binding Agent Berenil. **Sensors**, v. 8, p. 1519-1538, 2008.

DE MOURA, A. B. F.; **Atividade antitumoral de nitroquinonas derivada da nor- $\beta$ -lapachona. Contribuição da farmacoeletroquímica na pesquisa do mecanismo de ação de novos fármacos.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2008, 189p.

DE VASCONCELLOS, M. C. et al. Electrochemical, spectroscopic and pharmacological approaches toward the understanding of biflorin DNA damage effects. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 765, p 168-178, 2016.

DERYCKE, A. S. L.; WITTE, P. A. M. Liposome for photodynamic therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 17-30, 2004.

FERREIRA, F. D. R. et al. Electrochemical investigations into host-guest interactions of a natural antioxidant compound with  $\beta$ -cyclodextrin. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 2, p 797-803, 2010.

FERREIRA, F. R. **Emprego de técnicas avançadas em estudo bioeletroquímicos de substâncias de interesse biológico.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2013, 151p.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química nova**, v.28, n.3, p.511-518, 2005.

GEDIYA, L.K., NJAR, V.C.O. Promise and challenges in drug discovery and development of hybrid anticancer drugs. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v.4, p.1099-1111, 2009.

GENDELMAN, H; E. et al. Nanoneuromedicines for Degenerative, Inflammatory, and Infectious Nervous System Diseases. **Nanomedicine**, v 11, p 751-767, 2016.

GREEF, R. et al; **Instrumental methods in electrochemistry**, John & Sons: New York, Ellis Horwood limited, 1985.

HAMMERICHE, O., SPEISER, B. **Organic electrochemistry: Revised and Expanded.** Ed. 6<sup>a</sup>, EUA, p.1138-1139, 2016.

KAMEL, A. H. et al; **Biossensores and bioelectronics**, 2008, 24, 591.

KERSTEN, G. F. A.; CROMMELIN, D. J. A. Liposomes and ISCOMs. **Vaccine**, v. 21, ed 14, p. 915-920, 2003.

KRAUSE, F.R. et al; In vitro anticancer activity and evaluation of DNA duplex binding affinity of phenyl-substituted indoloquinolines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.21, n 8, p.2380-2383, 2011.

KUMAR, R. et al; Synthesis, characterization and antitumor activity of 2-methyl-9-substituted acridines. **Arabian Journal of Chemistry**, v 10, n 1, p 956-963, 2017.

LASIC, D. D.; Novel applications of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v. 16,n 7, p 307-321, 1998

MACHADO, L. C.; GNOATT, S. A.; KLUPPEL, M. L. W. Lipossomas aplicados em farmacologia: uma revisão de literatura. **Estud. Biol**, v.29, n.67, p. 215-224, 2007.

MERTINS, O.; **Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana.** Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008, 206p.

NASCIMENTO, S. S.; **Desenvolvimento de método eletroquímico para análise de carbamato de etila em cachaças comerciais.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Alagoas, 2011, 42p.

NEEDHAM, D.; MACINTOSH, T. J.; LASIC, D. D. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1108, n 8, p 40-48, 1992.

PACHECO, W. F. et al. Voltamétrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Virtual Química**, v.5, n.4, p. 516-537, 2013.

PATAI, S.; **The Chemistry of the Hydrazo, azo and azoxy groups**. Ed 2<sup>a</sup>, Bookman, p 630-635, 1997

PAULA, F. S. **Estudo bioeletroquímico de compostos eletroativos. Relação estrutura-eletroatividade e utilização de biossensor de DNA no estudo de agentes intercalante e alquilantes de DNA**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2006, 151p.

PLENAGL, N. et al; Hypericin inclusion complexes encapsulated in liposomes for antimicrobial photodynamic therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, V 570, 2019.

RUOZI, B. et al; Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. **Talanta**, v 73, p 12-22, 2007.

SAGRISTÁ, M. L.; MORA, M.; MADARIAGA, M. A. Surface modified liposomes by coating with charged hydrophilic molecules. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 5, p. 19-33, 2000.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: A bala mágica acertou? **Química nova**, v. 26, n. 6b, p. 1181-1185, 2002.

SANTOS-JUNIOR, P. F. S. **Síntese e avaliação biológica de arilidrazoimidazóis, arilidrazopirimidínicos e quinolin-4-hidraotiazolidinas sobre amastigotas de *Leishmania chagasi* e potencial antitumoral**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Alagoas, 2017, 195p.

SILVA, A. C. A. et al. Modified phonon confinement model and its application to CdSe/CdS core-shell magic-sized quantum dots synthesized in aqueous solution by a new route. **Journal of Physical Chemistry**, v. 117, n. 4, p. 1904–1914, 2013.

SILVA, T. L.; **Contribuições da eletroquímica molecular para a química medicinal: O caso das quinonas híbridas calcogenadas e halogenadas**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Alagoas, 2017, 123p.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T. C; **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 5<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan, RJ, 1994.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, A. R. **Princípios de análise instrumental**. Ed. 6<sup>a</sup>, Bookman, p. 400–402, 2009.

SOUTHAMPTON ELECTROCHEMISTRY GROUP. **Instrumental Methods in Electrochemistry**. Edited by Southampton Electrochemistry Group. 2001.

TAI, K. et al. The effect of sterol derivatives on properties of soybean and egg yolk lecithin liposomes: Stability, structure and membrane characteristics. **Food Research International**, v 109, p 24-34, 2018.

TOYRAN, N.; SEVERCAN, F.; Interaction between vitamin D<sub>2</sub> and magnesium in liposomes: Differential scanning calorimetry and FTIR spectroscopy studies. **Journal of Molecular Structure**, v 839, p 19-27, 2007.

TANG, M.; HE, k. Safety of novel liposomal drugs for cancer treatment: Advances and prospects, **Chemico-Biological Interactions**, v. 295, p. 13-19, 2018.

TIETZE, L.F., BELL, H.P., Chandrasekhar, S. Natural product hybrids os new leads for drug Discovery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, p.3996-4028,2003.

TORCHILIN, V.P. Drug targeting. **European Jornal of Pharmaceutical Sciences**, p.s81-s91, 2000.

VIEGAS-JUNIOR, C., DANUELLO, A., DA SILVA, et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1829-1852, 2007.

WANG, J.; Nucleic acid research, 2000, 28, 16, 3011.

WHEATE, N.J., BRODIE, C.R., COLLINS, J.G., KEMP, S., ALDRICH-WRIGHT, J.R. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis, **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry** v.7, p.627-648, 2007.