

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS COM CARREADOR
(SINTÉTICO E NATURAL) DE FÁRMACOS**

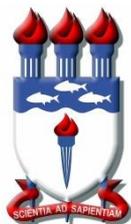
JOÃO CÉSAR NASCIMENTO SANTOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

JOÃO CÉSAR NASCIMENTO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS COM CARREADOR
(SINTÉTICO E NATURAL) DE FÁRMACOS**

Maceió – AL
2022

JOÃO CÉSAR NASCIMENTO SANTOS

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS COM CARREADOR
(SINTÉTICO E NATURAL) DE FÁRMACOS

Tese de doutorado apresentado ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiane Caxico Galdino.

Maceió – AL
2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

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

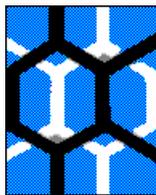
S237a Santos, João César Nascimento.
Avaliação da interação de compostos bioativos com carreador (sintético e natural) de fármacos / João César Nascimento Santos. – 2022.
132 f. : il., graf., tabs. color.

Orientadora: Fabiane Caxico Galdino.
Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 123-132.

1. Compostos fitoquímicos - Interação. 2. β -lapachona. 3. 6CN10. 4. LQM10. 5. Óxido de índio dopado com estanho. 6. Poliamidoamina. 3ª geração. 7. Soroalbumona bovina. I. Título.

CDU: 66.087: 615.2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando João César Nascimento Santos intitulada: “AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS COM CARREADOR (SINTÉTICO E NATURAL) DE FÁRMACOS”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 31 de janeiro de 2022, às 14h, por meio de videoconferência.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
(PPGQB/IQB/UFAL) - Orientadora

Prof. Dr. Diogenes Meneses dos Santos
(PPGQB/UFAL)

Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas
(IFAL)

Prof. Dr. Luciano Aparecido M. Grillo
Coordenador PPGCF / UFAL
SIAPE 1653550
Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
Coordenador do PPGCF/UFAL

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
(ICF/UFAL)

João César Nascimento Santos
(Doutorando)

A minha mãe, Luciene Nascimento, pela completa entrega física e emocional que me propiciou este momento.

AGRADECIMENTOS

Ao autor e consumidor da minha fé, Jesus Cristo, o qual me abarca dia após dia com o dom da vida acrescido de toda proteção, conforto e amor. Todas as coisas provêm dEle, mesmo a ciência a qual perseguimos constantemente.

Personagens marcantes nesta trajetória, como não poderiam deixar de ser, se encontram em meu núcleo familiar. Minha mãe, Luciene Nascimento, estabilidade necessária em momentos de revés. Com voz pacífica e confortante me dizia: “você conseguirá!”. Talvez a palavra mais óbvia possível, mas ouvi-la tornou-se fundamental revigorando os pensamentos perturbados por uma semana de experimentos fracassados.

Como de costume, meu pai, José João, mesmo sem entender bem o que se passa com esse “tal de doutorado”, seu apoio sempre foi incondicional. Meu muito obrigado!

Mais próximo de mim, com perguntas de praxe “foi estudar ou morar na UFAL?”, minha irmã, Nina, meus sinceros agradecimentos por manter a ordem em casa e por ser meu “coringa” para situações adversas. Uma incentivadora necessária, muitas das vezes quando já me sentia angustiado.

Dentre as pontes, uma das principais foi a que se iniciou com a Professora Ana Maria Queijeiro, que num momento delicado, me direcionou, com sábias palavras, as portas do Laboratório LEMAN para finalmente encontrar minha atual orientadora, Professora Fabiane Caxico. A esta, meus agradecimentos pela confiança, pela motivação e pelo compromisso firmado neste trabalho de doutorado. Não conquistaria esta graduação sem tanto apoio de minha orientadora. A senhora fez muita diferença em todo esse tempo! És um exemplo!

Tenho muito a agradecer aos meus colegas e amigos do laboratório LEMAN. Foram fundamentais nas dúvidas que insurgem no pesquisador que passou toda a vida trabalhando com técnicas espectroscópicas e que se deparou com algo não tão simples, a eletroquímica. Desses, em especial, agradeço a Samaysa por ter iniciado comigo os experimentos. Paciência e responsabilidade são pontos fortes dela. Marylia e Carol que sempre estiveram por perto nas horas necessárias. Marylia, minha maior fonte de consulta eletroquímica, sempre solícita e proativa. Ajudou-me demais! Elvis que me ajudou a fazer os cortes nas placas de ITO e sempre no auxílio com figuras, equipamentos, o quer fosse preciso. Admirável! Ao João Aliciado pela sua solicitude. Manu por auxiliar nos experimentos de impedância e ao Hygão que me acompanhou na técnica de FTIR.

Além destes, a dupla da orgânica, Jorge e Pato tiveram toda paciência para montar os sistemas de reação para meu projeto. Ao professor Johnathan, pela participação na banca e também pelos vários dias de esforços realizados para obtenção de imagens no MEV. A professora Adriana Ribeiro, por toda a ajuda nos cortes de ITO, fornecimento de materiais diversos e por essa rica oportunidade de ser uma das avaliadoras. Ainda com os ITO's, meus agradecimentos a Andreza Katherinne por todo auxílio prestado. Ao professor Diógenes, pelas conversas e experiências transmitidas, pelo esforço em está presente na qualificação e pelo otimismo característico. Nos estudos de AFM, ao professor Samuel e a Elayne, ambos do IF.

Além destes, aqueles que indiretamente me ajudaram bastante neste vai e vem de ônibus de Matriz de Camaragibe: Madson, Kika, Lorena, Marcos Vinícius, Aline Priscila, Tiago.

Ao PPGQB, programa este que me possibilitou desenvolver meu projeto com o financiamento da CAPES.

***“Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém.”
Rm 11.36***

RESUMO

Estima-se que cerca de 70% de novas moléculas possuam baixa solubilidade em meio aquoso o que pode provocar uma baixa biodisponibilidade a até mesmo a não utilização, em meio biológico. De forma a contornar este problema, esses compostos podem ser associados a macromoléculas formando um complexo droga-hóspede onde múltiplas interações podem estar envolvidas. Neste trabalho, foi avaliado a interação de potenciais fármacos, β -lapachona (β LP), 6CN10 (2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[β]tiofeno-3-carbonitrila) e LQM10 (2-[(3,5-di-tert-butil-4-hidroxifenil)metileno]hidrazinacarboximidamida), com PAMAMG3 (poliamidoamina de 3^o geração) e com BSA (albumina do soro bovino). No primeiro trabalho, utilizou-se eletrodo ITO modificado. O novo eletrodo construído sob ITO, foi planejado eletrodepositando nanopartículas de ouro (NPAu), cisteamina e PAMAMG3, resultando em ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3. Este sistema foi caracterizado por espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia de força atômica (AFM), Voltametria Cíclica (VC), Voltametria de Pulso diferencial (VPD) e espectroscopia de impedância eletroquímica (ESI). Posteriormente, por VPD em pH 7,4, foi possível avaliar a interação do dendrímero de PAMAMG3, veículo sintético de transporte de fármacos com as moléculas em estudo. Foi visto que há encapsulação das substâncias pelo dendrímeros e foi possível determinar a constante de interação do complexo β LP-PAMAMG3 e LQM10-PAMAMG3, sendo $1,42 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ e $3,33 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$. Por UV-Vis as constantes foram $2,00 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ e $2,50 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ para os complexos β LP-PAMAMG3 e 6CN10-PAMAMG3. No segundo trabalho, considerando que a albumina do soro humano (HSA) é a principal transportadora de fármacos dentro do organismo, realizamos o estudo de interação de BSA, com os fármacos mencionados, utilizando fluorescência molecular e UV-Vis em pH 7,4. Por fluorescência foi possível determinar que todos os complexos são formados por *quenching* estático com formação de um complexo não fluorescente. O valor de K_b foi de $4,10 \times 10^3$, $1,69 \times 10^3$ e $3,31 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ para os sistemas BSA- β LP, BSA-6CN10 e BSA-LQM10, respectivamente, o que revela maior afinidade da proteína pelo LQM10. De acordo com os parâmetros termodinâmicos, forças eletrostáticas governam as interações de β LP e LQM10 com a proteína. Já o nitrocomposto, majoritariamente, interage por forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio. A fluorescência tridimensional mostrou que há mudanças conformacionais na proteína a partir da interação com as moléculas. Sendo a maior mudança

com adição de LQM10. Mostrando que quanto maior o valor de K_b maior mudanças na estrutura proteica.

Palavras-Chaves: Interação. β -lapachona. 6CN10. LQM10. ITO. PAMAMG3.BSA.

ABSTRACT

About 70% of new synthetic molecules have low solubility in aqueous media, which can impair their bioavailability or even their use. In order to get around this problem, these compounds can be associated with macromolecules forming a drug-guest complex where multiple interactions can be involved. The present work evaluated the interaction of potential drugs, β -lapachone (β LP), 6CN10 (2-[(4-nitrophenyl)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-4H-benzo[β]thiophene-3-carbonitrile) and LQM10 (2-[(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)methylene]hydrazinecarboximidamide), with PAMAMG3 (3rd generation polyamidoamine) and with BSA (bovine serum albumin). At first, a modified ITO electrode was used. The new electrode, built under ITO, was planned by electrodepositing gold nanoparticles (NPAu), cysteamine and PAMAMG3, resulting in ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3. This system was characterized by visible ultraviolet spectroscopy (UV-Vis), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), atomic force microscopy (AFM), Cyclic Voltammetry (VC), Differential pulse (VPD) and electrochemical impedance spectroscopy (ESI). Subsequently, by using VPD at pH 7.4, it was possible to evaluate the interaction of the PAMAMG3 dendrimer, a synthetic drug transport vehicle with the molecules under study. It was observed that there is encapsulation of substances by the dendrimer and it was possible to determine the interaction constant of the β LP-PAMAMG3 and LQM10-PAMAMG3 complex, being $1.42 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ and $3.33 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$. By UV-Vis the constants were $2.00 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ and $2.50 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ for the β LP-PAMAMG3 and 6CN10-PAMAMG3 complexes. Considering that human serum albumin (HSA) is the main drug carrier within the body, a study was carried out on the interaction of these molecules with BSA, using molecular fluorescence and UV-Vis at pH 7.4. All complexes are formed by static quenching with formation of a non-fluorescent complex. The K_b value was 4.10×10^3 , 1.69×10^3 and $3.31 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ for the BSA- β LP, BSA-6CN10 and BSA-LQM10 systems, respectively, which reveals greater affinity for protein by LQM10. According to thermodynamic parameters, electrostatic forces govern the interactions of β LP and LQM10 with the protein. The nitrocompound, on the other hand, mostly interacts by Van der Waals forces and hydrogen bonds. Three-dimensional fluorescence showed that there are conformational changes in the protein from interaction with the molecules. The biggest change is with the addition of LQM10. Showing that the greater the value of K_b , the greater the changes in the protein structure.

Keywords: Interaction. β -lapachone. 6CN10. LQM10. ITO. PAMAMG3.BSA.

Figura 25 - a) Diagrama Nyquist para as modificações no eletrodo ITO; b) Ampliação do diagrama para os sistemas ITO/NPAu/Cis e ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3. Inset: circuito equivalente.....	67
Figura 26 - Molécula de cisteamina em pH 7,40 com seus respectivos pKa's ligada a nanopartículas de ouro.....	68
Figura 27 - Diagrama Nyquist para a caracterização do sistema a) eletrodo de ouro/cis; b) eletrodo de ouro/cis/glucose oxidase; c-f) eletrodo de ouro/ cis/glucose oxidase/quitosana em diferentes espessuras de ouro.	69
Figura 28 - Voltametria Cíclica das modificações utilizando a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	71
Figura 29 - Perfil voltamétrico das modificações na a) redução e b) oxidação; c) imagem ampliada da região positiva.	72
Figura 30 - VPD das interações de a) β -lapachona; b) 6CN10 e c) LQM10 com PAMAMG3.	74
Figura 31 - Curva analítica gerada através de valores de concentração e corrente de VPD de a) β LP-PAMAMG3; b) LQM10-PAMAMG3.	76
Figura 32 - UV-Vis das interações de a) β -lapachona; b) 6CN10 e c) LQM10 com PAMAMG3.....	78
Figura 34 – Estrutura da albumina do soro Bovino (BSA).	100
Figura 35 - Processo energético de emissão de Fluorescência.....	101
Figura 36 - Espectros de absorção dos sistemas a) BSA (3 μ M), β LP (12 μ M), da mistura BSA+ β LP e a diferença dos espectros (BSA+ β LP) – β LP; b) BSA (3 μ M), 6CN10 (12 μ M), da mistura BSA+ 6CN10 e a diferença dos espectros (BSA+ 6CN10) – 6CN10; c) BSA (3 μ M), LQM10 (12 μ M), da mistura BSA+ LQM10 e a diferença dos espectros (BSA+ LQM10) – LQM10. Na faixa de 250 a 365 nm. Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM) a 27°C.	108
Figura 37 - Espectro de fluorescência e cálculos de K_{sv} e K_b de BSA (2 μ M) com adição de incrementos de a) β LP; b) 6CN10 e c) LQM10. Condições pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM).	111
Figura 38 - Curva de Van't Hoff para a interação a) BSA- β LP; b) BSA- 6CN10 e c) BSA- β LP.	114
Figura 39 - Fluorescência sincronizada para o resíduos de tirosina ($\Delta\lambda= 15$ nm) e triptofano ($\Delta\lambda= 60$ nm) na interação a) BSA-6CN10 e b) BSA-LQM10 com adição de incrementos do ligante (0-36 μ M).	116

Figura 40 - Espectro de fluorescência tridimensional para BSA 2 μ M (a). Adição de b) β LP (50 μ M); c) 6CN10 (50 μ M) e d) LQM10 (50 μ M). Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM) a 27°C. 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gerações de PAMAM e suas propriedades.....	32
Tabela 2 - Classificação das Quinonas e sua atividade.	34
Tabela 3 - Estrutura de derivados de nitrocompostos e respectivo agente etiológico.....	39
Tabela 4 - Valores de R_t e R_s para a caracterização por ESI.	67
Tabela 5 - Valores da área eletroativa e ΔE_p para as modificações.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Transparência do substrato ITO.....	22
Figura 2 - Representação do dipolo elétrico induzido e efeito da força restauradora devido à separação de cargas nas nanopartículas metálicas.....	25
Figura 3 - Estrutura e gerações de um dendrímero.....	26
Figura 4 - Método divergente para síntese de dendrímeros.....	27
Figura 5 - Interações entre dendrímero e molécula alvo.	28
Figura 6 - Estrutura do PAMAM G3.....	31
Figura 7 - Equilíbrio redox das Quinonas.	35
Figura 8 - Estrutura do Lapachol e da β -lapachona.....	35
Figura 9 - Oxidação do DNA pelo radical nitro.	38
Figura 10 - Estrutura do 6CN10.	40
Figura 11 - Estrutura da Aminoguanidinhidrazona e LQM-10.	41
Figura 12 - Representação da Voltametria Cíclica de sistema reversível, quase-reversível e irreversível.....	43
Figura 13 - Representações da técnica de Voltametria de Pulso Diferencial.....	44
Figura 14 - Representação do diagrama de Nyquist.....	47
Figura 15 - Representação da cela eletroquímica com todos eletrodos.....	52
Figura 16 - Representação das modificações no eletrodo de ITO.....	54
Figura 17 - Avaliação do tempo de eletrodeposição de NPAu por UV-Vis.....	58
Figura 18 - a) Representação do eletrodo ITO sem modificação; b) após eletrodeposição de 500s de NPAu.....	59
Figura 19 - Cronoamperometria da eletrodeposição de NPAu com potencial de -0,3V durante 500s em solução de HAuCl_4 $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	59
Figura 20 - Caracterização por UV-Vis das modificações no eletrodo de ITO.	60
Figura 21 - Micrografia de MEV a) ITO; b) ITO/NPAu; c) ITO/NPAu/Cis e d) ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3.....	61
Figura 22 - Espectro de FTIR para amostras de a) ITO; b) ITO/NPAu; c) ITO/NPAu/Cis e d) ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3.....	63
Figura 23 - Micrografias AFM 2D e 3D das amostras a) ITO; b) ITO/NPAu; c) ITO/NPAu/Cis e d) ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3.	65
Figura 24 - Micrografia AFM de PAMAMG0 $2,50 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ depositado em uma lâmina de vidro comum.	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

(RPSL) – Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado

Ac – Corrente alternada

AFM – Microscopia de força atômica

AGH – aminoguanidinahidrazones

ATR – Reflectância total atenuada

BR – Tampão Britton-Robinson

Cis – Cisteamina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

$E_{1/2}$ – Potencial de meia-onda

EIE – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

E_{pa} – Potencial do pico anódico

E_{pc} – Potencial do pico catódico

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FTIR – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

I_{pa} – Corrente de pico anódico

I_{pc} – Corrente de pico catódico

ITO – Óxido de índio dopado com estanho

K_f – Constante de formação

LCD – Tela de Cristal Líquido

LQM10 – 2-[3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil-metileno]hidrazinecarboxilamida

MCF-7⁹⁹ – Linhagem de célula de câncer de mama humano

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

NPAu – Nanopartícula de ouro

PAMAM – Poliamidoamina

PAMAMG0 – Poliamidoamina

PAMAMG1 – Poliamidoamina de 1º geração

PAMAMG2 – Poliamidoamina de 2º geração

PAMAMG3 – Poliamidoamina de 3º geração

PET – Politereftalato de etileno

R_p – Resistência de polarização

R_Ω – Resistência do eletrólito

SAMs – monocamadas automontadas

T47D¹⁰⁰ – Linhagem de célula de câncer de mama humano

TCO – Óxidos transparentes condutores

UV – Vis – Ultravioleta no visível

VC – Voltametria cíclica

VPD – Voltametria de pulso diferencial

Z_w – Impedância de Waburg

β LP – Beta lapachona

LISTA DE SÍMBOLOS

\vec{E} - Vetor campo elétrico

Au - ouro

cm – centímetros

e^- - elétron

E – Potencial

f – Frequência

HAuCl_3 – Ácido cloroáurico

Hz – Hertz

I – Corrente

nm – nanômetros

O_2^- - Radical superóxido

OH^\bullet – Radical hidroxila

pH – potencial hidrogeniônico

pKa – Constante de acidez

$\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{NNH}_2$ - Estrutura da guanilhidrazona

V – Volts

Z – Amplitude

Z' – Impedância real

Z'' – Impedância imaginária

τ - Tempo entre duas aplicações sucessivas de pulso

Ω - Ohm

Ω - Resistência

Φ – Ângulo de fase

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO UTILIZANDO CARACTERIZAÇÕES POR MICROSCOPIA E TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS PARA O ESTUDO DE ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS COM CARREADOR SINTÉTICO DE FÁRMACOS	40
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 ITO	22
1.2 Nanopartículas de ouro depositadas sob substrato de ITO.....	23
1.2.1 Ressonância Plasmônica de Superfície	24
1.3 Dendrímeros	25
1.3.1 PAMAM.....	29
1.4 Quinonas	33
1.4.1 β -lapachona	36
1.5 Nitrocompostos	37
1.5.1 6CN10	39
1.6 Guanil-hidrazonas	40
1.6.1 LQM10.....	40
1.7 Técnicas Eletroquímicas	41
1.7.1 Voltametria Cíclica	42
1.7.2 Voltametria de Pulso Diferencial	43
1.7.3 Cronoamperometria.....	44
1.7.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	45
1.8 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	47
1.9 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	48
2. OBJETIVOS	50
2.1 Objetivo Geral.....	50
2.2 Objetivos Específicos.....	50
3. MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 Reagentes e solventes.....	51
3.1.1 Limpeza do eletrodo ITO	51
3.1.2 Preparo de soluções.....	51
3.2 Estudos eletroquímicos	52
3.2.1 Deposição de nanopartículas de ouro na superfície de ITO	52
3.2.1.1 Avaliação do tempo de eletrodeposição de NPAu por UV-Vis	52
3.3 Construção do eletrodo ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3	53
3.4 CARACTERIZAÇÕES.....	55

3.4.1 UV-Vis	55
3.4.2 FTIR	55
3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	55
3.4.4 Microscopia de Força Atômica	55
3.4.5 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	56
3.4.6 Voltametria Cíclica	56
3.5 Voltametria de Pulso Diferencial	56
3.6 Avaliação da interação por UV-Vis	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
4.1 Avaliação do tempo de eletrodeposição de nanopartículas de ouro.....	57
4.2 Espectroscopia no UV-Vis	59
4.3 MEV	60
4.4 FTIR	62
4.5 AFM	63
4.6. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	66
4.7 Estudos por VC	70
4.9 Avaliação da interação da β -lapachona, 6CN10 e LQM10 com PAMAMG3 por VPD.....	73
4.9.1 Determinação da Constante de Associação (K_f)	76
4.10 - Avaliação da interação da β -lapachona, 6CN10 e LQM10 com PAMAMG3 por UV-Vis....	77
5. CONCLUSÃO	80
6. PERSPECTIVAS	81
7. REFERÊNCIAS	82
CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS COM	
CARREADOR NATURAL DE FÁRMACOS UTILIZANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS 97	
1. INTRODUÇÃO	98
1.1 Albumina do Soro Bovino.....	99
1.2 Espectroscopia de Fluorescência molecular.....	100
1.2.1 <i>Quenching</i> de fluorescência	101
1.2.2 Fluorescência Sincronizada.....	102
1.2.3 Fluorescência Tridimensional	102
2. OBJETIVOS	104
2.1 Objetivo geral.....	104
2.2 Objetivos específicos.....	104
3. ExPERIMENTAL	105
3.1 Reagentes e soluções.....	105
3.2 Espectrometria de absorção molecular (Uv-vis)	105

3.3 Fluorescência molecular.....	105
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	107
4.1 Avaliação da interação por UV-vis	107
4.2 Avaliação da interação por fluorescência e constantes de ligação	108
4.3 Parâmetros termodinâmicos	112
4.4 Fluorescência Sincronizada.....	115
4.5 Fluorescência 3D.....	117
5. CONCLUSÃO	121
6. PERSPECTIVAS	122
7. Referências	123

**1. CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO UTILIZANDO
CARACTERIZAÇÕES POR MICROSCOPIA E TÉCNICAS
ELETROQUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS PARA O ESTUDO DE
ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS COM CARREADOR
SINTÉTICO DE FÁRMACOS**

1. INTRODUÇÃO

Um dos desafios da utilização de compostos que apresentam atividades farmacológicas, reside na baixa solubilidade de algumas substâncias, o que pode comprometer características desejáveis como biocompatibilidade e biodisponibilidade (BOYD *et al.*, 2019).

As moléculas de β -lapachona (quinona), 6CN10 (nitrocomposto) e LQM10 (guanilhidrazona) são moléculas que apresentam diversas atividades farmacológicas como atividade antitumoral, anticâncer, antihirpetensivo, antialzheimier, entre outras. Entretanto, seus potenciais efeitos farmacológicos são atenuados pela baixa solubilidade em meio aquoso, tornando-as inviáveis para utilização em meio biológico (AZEVEDO DE BRITO *et al.*, 2017; ELEAMEN *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

A fim de contornar esse problema, essas substâncias podem ser associadas a carreadores biológicos sintéticos como os dendrímeros, que são macromoléculas poliméricas que apresentam grupos funcionais em sua superfície e estrutura hidrofóbica interna, conferindo características polar e apolar, respectivamente. Além disso, em sua estrutura há espaços vazios internos que podem acomodar moléculas, processo conhecido como encapsulação. Ao interagir com pequenas moléculas, como as citadas, esses carreadores podem atravessar membranas celulares e atingir o alvo específico liberando assim a molécula carreada desejada (CZARNIK-KWAŚNIAK *et al.*, 2020).

Desta classe, os dendrímeros de PAMAM (poliamida-amina) são a classe mais conhecida e utilizada. Esse composto encapsula moléculas formando um complexo supramolecular conhecido também como sistema droga-hóspede. A partir desta interação, é possível a melhora da solubilidade resultando numa maior biocompatibilidade, biodisponibilidade e diminuição da toxicidade. Além disso, PAMAM têm como vantagem uma liberação programada do composto bioativo (ANTONIO-ANTONIO *et al.*, 2022).

Estudos eletroquímicos já foram realizados com β -lapachona (CANDIDO *et al.*, 2018) e 6CN10 (SILVA *et al.*, 2017) associados a PAMAM em sistemas eletroquímicos convencionais, utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado. A molécula de LQM10 está em fase de estudo de suas características eletroquímicas pelo grupo LEMAN (laboratório de Eletroquímica e Microssistemas de Análise). Porém, se faz necessários esforços para desenvolver um sistema que permita, além da avaliação eletroquímica, estudos espectroscópicos da interação com a mesma plataforma de análise. De forma a suprir esta

lacuna, os eletrodos transparentes de ITO são promissores candidatos por apresentarem propriedades eletroquímicas e serem transparentes na região visível.

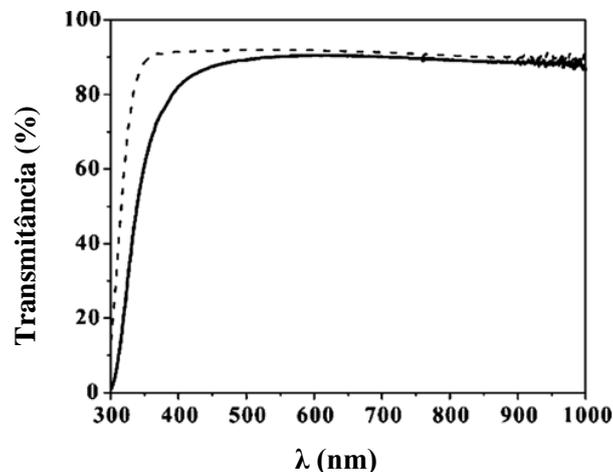
Diante do apresentado, foi utilizado eletrodo de ITO funcionalizado com nanopartículas de ouro, cisteamina e PAMAMG3 (PAMAM de 3º geração) para avaliar as interações do dendrímero com os fármacos selecionados, sendo este sistema o primeiro na literatura com utilização de técnicas eletroquímicas e espectroscópicas de avaliação da interação PAMAMG3 com substâncias de interesse farmacológico.

1.1 ITO

Óxido de índio dopado com estanho (ITO, $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$) é uma solução sólida, incolor e transparente pertencente ao grupo dos óxidos transparentes condutores (TCO). Esse material é comercializado como uma fina película depositada sob um substrato de vidro ou um polímero (geralmente o politereftalato de etileno, PET) com uma proporção de 9:1 entre óxido de índio e óxido de estanho IV. Apenas o óxido de índio isolado seria um isolante (AYDIN; SEZGINTÜRK, 2017).

Classificado como um semicondutor tipo n, possui uma boa faixa de transparência na região visível com transmitância superior a 82% na região de 400 a 700 nm (Figura 1) além de uma ampla área de trabalho eletroquímica, baixa corrente capacitiva, baixa resistividade (cerca de $1,0 \times 10^{-4} \Omega \text{ cm}^{-1}$) e características eletroquímicas estáveis. Amplamente utilizado por apresentar propriedades ópticas e elétricas únicas, suas características resultam numa grande quantidade de trabalhos no campo da eletroquímica (WEI *et al.*, 2017).

Figura 1 - Transparência do substrato ITO.



Fonte: Adaptado de CHEN, 2013.

Algumas áreas de aplicação deste material se encontram no âmbito dos biossensores, células foto voltaicas, telas de cristal líquido (LCD) e de plasma. Também são comercializados em telas sensíveis ao toque (tecnologia touchscreen), foto diodos, revestimentos antirreflexo, sensores de gás, telas planas, entre outras aplicações. A demanda por produtos que contenham ITO em sua composição é alta com uma produção global de 1400 toneladas ao ano (MEI, FANGSHENG; YUAN, TIECHUI; CHU, AIMIN; LI, 2019).

Uma das vantagens da lâmina de ITO é seu menor custo em comparação com eletrodos de ouro, prata e platina, mas a desvantagem advém do fato do eletrodo ser, em grande parte do uso, descartável necessitando de estudos específicos para uma possível recuperação (AYDIN; SEZGINTÜRK, 2017). Uma aplicação bastante documentada na literatura é a deposição de nanopartículas de ouro na superfície do ITO para melhoria de suas propriedades como condutividade e área eletroativa.

1.2 Nanopartículas de ouro depositadas sob substrato de ITO

Nanopartículas de ouro (NPAu) podem ser utilizados para modificar eletrodos melhorando a condutividade elétrica e facilitando a transferência de elétrons. Tais modificações resultam num aumento de seletividade e da sensibilidade analítica (FENG *et al.*, 2019).

Apesar de existir outras nanopartículas conhecidas advindas de metais como prata e cobre, as NPAu são preferíveis por apresentarem boa estabilidade e resistência a oxidação. Outro motivo é sua biocompatibilidade que favorece a imobilização de macromoléculas como proteínas e DNA, por exemplo (RAMALINGAM, 2019).

Dentre as aplicações convencionais, estão a deposição destas partículas em eletrodos de carbono vítreo, nanotubos de carbono, eletrodo de ouro e eletrodo de prata, entre outros. Outra aplicação é a deposição no substrato de ITO que permite investigações no âmbito da eletroquímica assim como na área da espectroscopia, devido sua transparência. Estudos desta natureza com NPAu depositados em ITO buscando dados eletroquímicos e espectroscópicos são bastante empregados e estão relatados na literatura (RAMALINGAM, 2019).

As estratégias de ligação das nanopartículas de ouro ao ITO para fins de funcionalização são diversas em duas vertentes, as estratégias por ligação química e outra alternativa é a deposição física. Por ligação química, pode ser utilizados moléculas contendo grupo silanol (SiOH), grupo tiol (SH) ou até mesmo o grupo amino (NH₃) em ligação com o

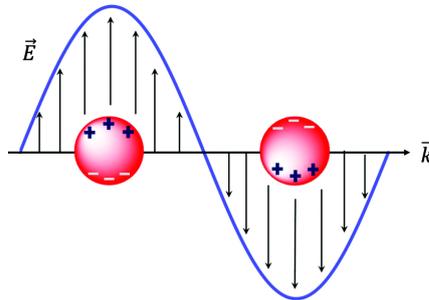
óxido. Na deposição física, um procedimento bastante utilizado é por eletroquímica, sendo um método mais rápido e simples e com tamanho da nanopartícula definido entre 114 a 217 nm. O tamanho das partículas de ouro influencia diretamente na capacidade catalítica (WEI *et al.*, 2017).

Nanopartículas metálicas depositadas em substrato sólido fornecem boa estabilidade e resposta estável do sensor na matriz com as nanoestruturas. Essas estruturas quando depositadas não necessitam de estabilizantes orgânicos. A partir da técnica utilizada e o meio reacional é possível obter diversas formas geométricas como bastão, triângulo e a forma esférica (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018). Além das formas, outras características podem variar como o tamanho e cor. Estas propriedades das NPAu são governadas pela ressonância plasmônica, fenômeno este que ocorre na superfície da partícula.

1.2.1 Ressonância Plasmônica de Superfície

As cores das nanopartículas são dependentes das propriedades ópticas em relação a sua forma e tamanho. O fenômeno de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado (RPSL) explica as cores das nanopartículas e algumas outras características. Esse fenômeno consiste na oscilação coletiva dos elétrons livres (*plasmon*) nos metais excitados por radiação eletromagnética, contrário ao campo elétrico (\vec{E}) da onda incidente na nanopartícula. O resultado disto é a indução de um dipolo elétrico na nanopartícula. O dipolo induzido promove o aparecimento de um campo elétrico restaurador na partícula, o qual tem a função de restaurar o equilíbrio dado pela distorção das cargas. Esta força restauradora e a indução do dipolo, quando acopladas, geram a ressonância plasmônica que acontece na superfície metálica (Figura 2). Tal característica resulta numa absorção de radiação eletromagnética no visível com relação aos metais de ouro, prata e cobre (YADAV; SHARAN; KUMAR, 2020).

Figura 2 - Representação do dipolo elétrico induzido e efeito da força restauradora devido à separação de cargas nas nanopartículas metálicas.



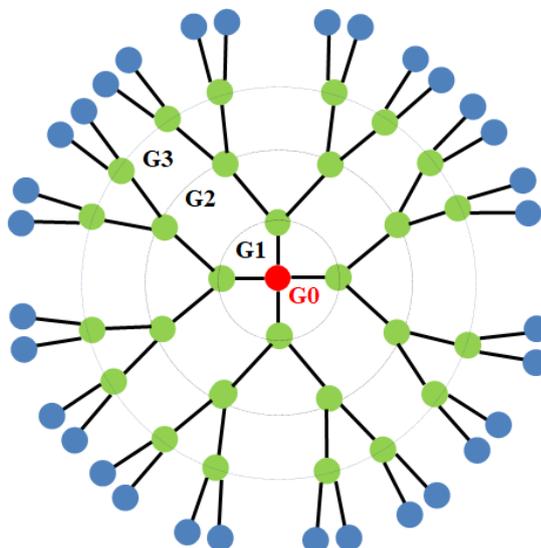
Fonte: OLSON, 2015.

Esse fenômeno é o responsável por algumas características imprescindíveis no estudo da deposição de nanopartículas sob o substrato de ITO, como a absorção no UV-Vis. Partículas com tamanho médio de 1 a 100 nm podem ser estudadas e suas propriedades esclarecidas a partir do RPSL e assim garantir melhor preparo do sistema com as possíveis modificações. Essas propriedades podem ser úteis no desenvolvimento de sistemas de monitoramento da interação entre macromoléculas e ligantes. A deposição de NP Au no material transparente é utilizado para imobilizar proteínas e também pode ser útil no estudo da interação de veículos sintéticos, como os dendrímeros, com compostos de interesse farmacológicos (XIAO *et al.*, 2018).

1.3 Dendrímeros

A palavra dendrímeros deriva do grego “*dendrimer*” que significa “árvore”. Esta analogia se deve pela grande quantidade de ramificações presentes nestes compostos. Os dendrímeros são macromoléculas poliméricas criadas por polimerização de subunidades menores que apresentam geometria próxima a esférica com vários grupos funcionais e espaços internos vazios. Apresentam alto grau de ramificação com estrutura tridimensional variando de 1 a 10 nm com arquitetura globular e massa molar bem definida (WAZIR *et al.*, 2020). Na Figura 3 é demonstrada a estrutura básica de um dendrímero.

Figura 3 - Estrutura e gerações de um dendrímero.



Fonte: Adaptado de SEPÚLVEDA-CRESPO, 2015.

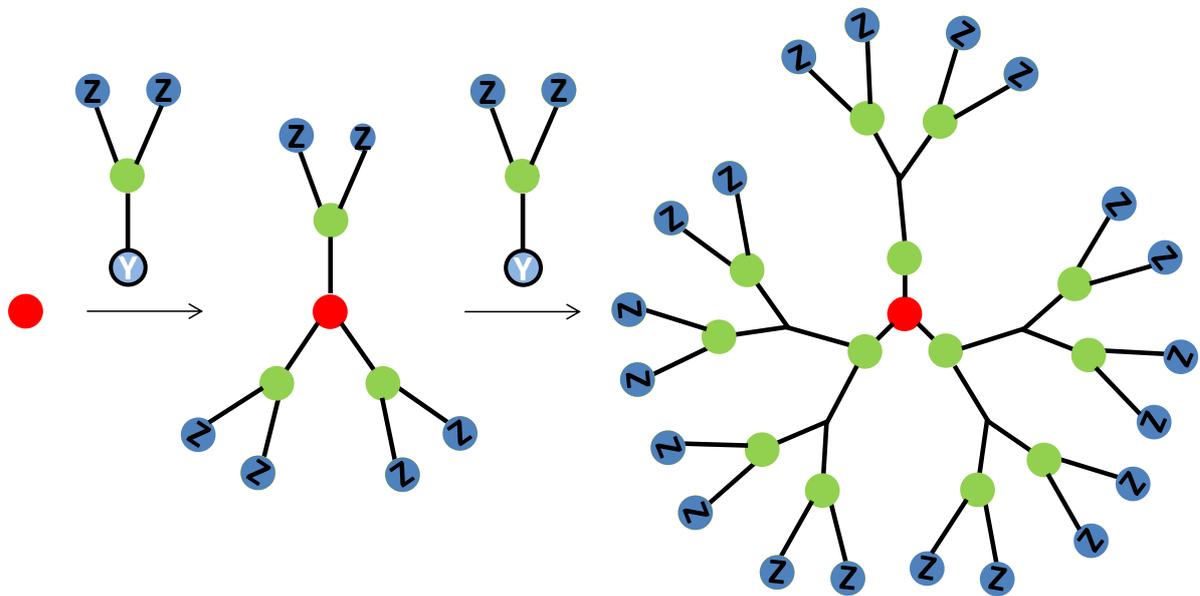
Essas macromoléculas podem ser divididas em três regiões: núcleo multifuncional central (círculo vermelho), pontos de ramificações (círculos em verde) e região de superfície externa (círculos em amarelo), conforme Figura 3.

Os dendrímeros são produtos de síntese orgânica em várias etapas. Essas moléculas são sintetizadas passo a passo, ao contrário de uma polimerização, dando origem a uma estrutura bem definida e reproduzível. Na maioria dos casos, essas macromoléculas são construídas camada a camada a partir de um núcleo central. Dendrímeros de baixa geração possuem uma estrutura aberta (WAZIR *et al.*, 2020).

Os procedimentos mais utilizados para a síntese são a abordagem divergente e convergente. Na síntese divergente, a mais usual, o dendrímero é sintetizado a partir do núcleo como ponto de partida e construído geração a geração formando assim n gerações (G1, G2, G3, G4, ...). A molécula do núcleo interage (molécula inicial) interage com a molécula do monômero que possui um grupo reativo e dois não reativos, originando um dendrímeros de geração zero (G0). A nova superfície é ativada para reações com mais monômeros, sendo este processo repetido por várias gerações, construindo o dendrímero camada sobre camada, constituindo-se uma boa opção para grandes quantidades dendríticas. Este processo está representado na Figura 4 (H. MEDINA; E. H. EL-SAYED, 2009).

Os monômeros dispostos a cada adição formam camadas em torno do núcleo com aspecto globular, dispostas de dentro para fora em três dimensões. Gerações posteriores são obtidas pela adição dos monômeros ramificados, resultando em dendrímeros completos finalizados com grupos químicos funcionais na superfície (JOHN R.GIUDICESSI, BA.MICHAEL J.ACKERMAN., 2008).

Figura 4 - Método divergente para síntese de dendrímeros.



●	- molécula do núcleo
Ⓢ	- ponto focal ativado
●	- monômero
Z	- grupos funcionais

Fonte: adaptado de H. MEDINA; E. H. EL-SAYED, 2009.

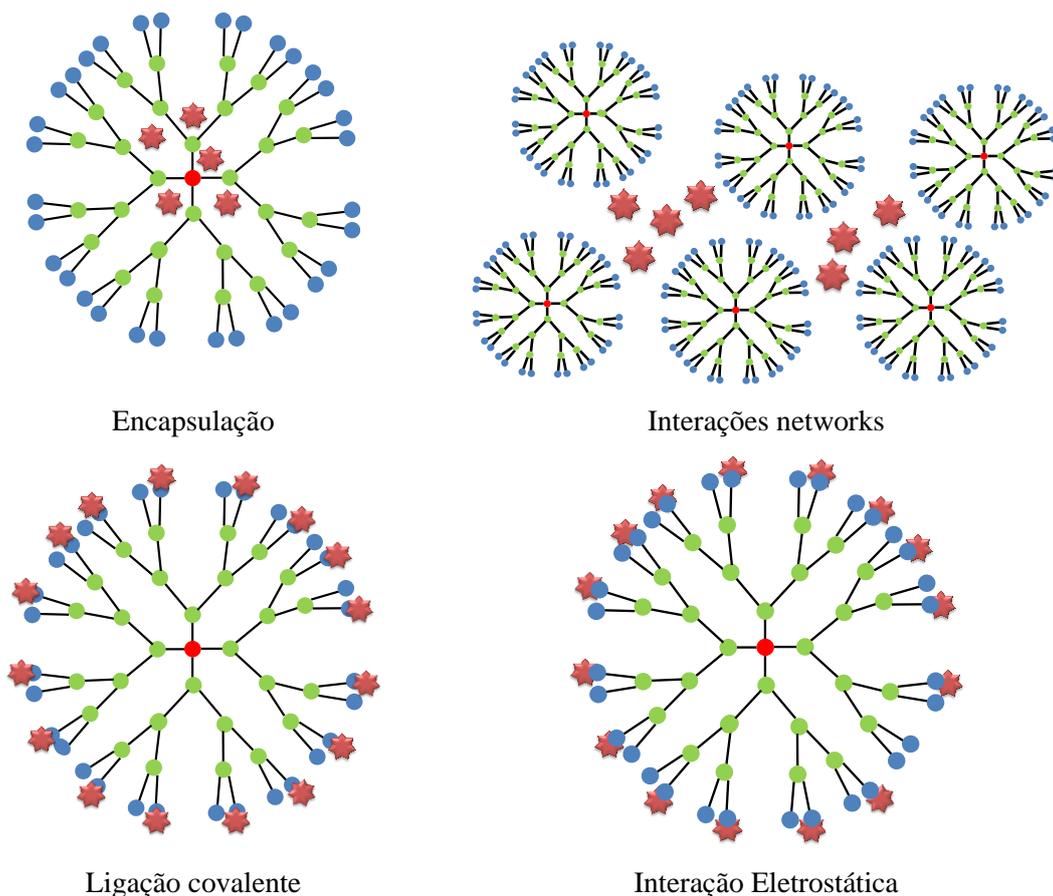
Entretanto, há alguns problemas nesta metodologia como uma grande quantidade de reações numa única molécula e também um rendimento máximo de 25% (JOHN R.GIUDICESSI, BA.MICHAEL J.ACKERMAN., 2008).

A síntese convergente começa na superfície e termina no núcleo em que os monômeros são acoplados. A vantagem neste procedimento é que apenas um pequeno número

de locais reativos é funcionalizado em cada etapa, fornecendo um pequeno número de possíveis reações colaterais (KOLOTYLO *et al.*, 2019).

As propriedades desta classe são únicas ao se associar de forma supramolecular a moléculas de interesse biológico. Além do que já foi mencionado, os dendrímeros podem atravessar as membranas celulares e chegar ao seu alvo específico. (CHENG *et al.*, 2008). Essas estruturas são utilizadas na absorção e liberação de fármacos, ácidos nucleicos, entre outros (GOLSHAN *et al.*, 2020). A interação dessas estruturas com a molécula alvo se dá, majoritariamente, pelo aprisionamento da molécula dentro da estrutura do dendrímero onde ocorrem múltiplas interações. Na superfície, pode ocorrer interações net works, ligação covalente e interações entre cargas (interações eletrostáticas), conforme Figura 5.

Figura 5 - Interações entre dendrímero e molécula alvo.



Fonte: Adaptado de SEPÚLVEDA-CRESPO, 2015.

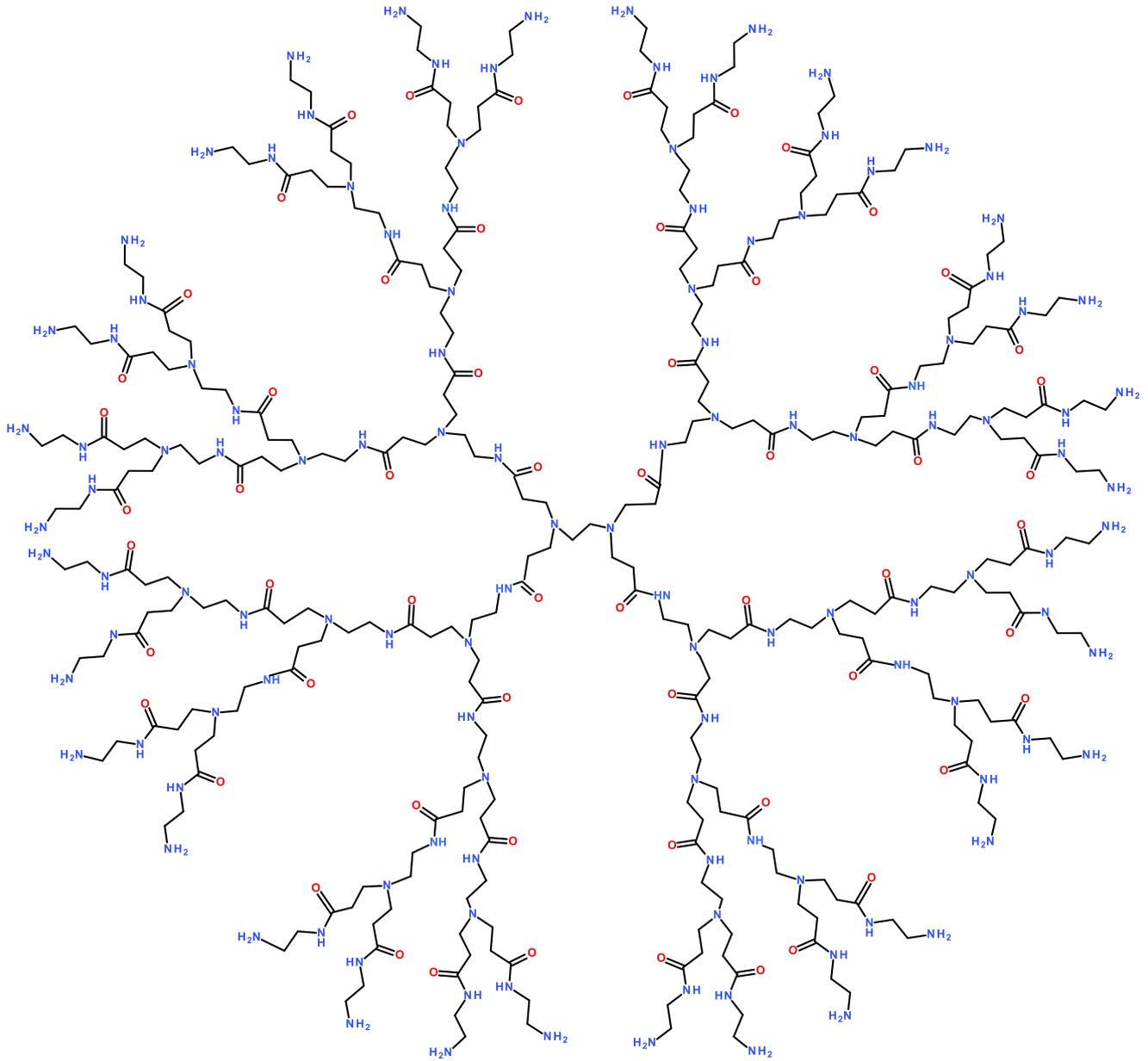
1.3.1 PAMAM

Dendrímeros de poliamida-amina (PAMAM) pertencem aos veículos sintéticos biológicos mais explorados como resultado de suas propriedades específicas: tamanho e peso molecular estritamente definido, forma esférica, baixas viscosidades intrínsecas, alta solubilidade em vários solventes e alta densidade de grupos funcionais localizados na superfície (DODANGEH *et al.*, 2020).

Os dendrímeros PAMAM são estruturas nanométricas que interagem com pequenas moléculas do sistema droga-hóspede e podem ser utilizadas para buscar características desejáveis a potenciais fármacos como: adequação, solubilidade, baixa toxicidade, entre outras características. Visto que inúmeros potenciais fármacos não apresentam uma ou mais desses itens, o complexo formado PAMAM-ligante pode solucionar tais problemas (FARMANZADEH; GHADERI, 2018).

Esses resultados da interação são obtidos, pois as pequenas moléculas são encapsuladas dentro da estrutura dendrítica apolar, conferindo as características supracitadas. Esse sistema de interação entre PAMAM e ligantes (macromolécula-ligante) já foi amplamente estudado. PAMAM é a classe mais utilizadas na encapsulação de biomoléculas (FARMANZADEH; GHADERI, 2018; LI *et al.*, 2017).

PAMAM de 3º geração (Figura 6) consiste num núcleo de etilenodiamino com ramificações ligados ao grupo amida do núcleo e 32 grupos de aminas terminais em sua superfície. Com o aumento no número de gerações (G0, G1, G2, G3, G4, G5, ...) de PAMAM acarreta a um aumento de tamanho, peso molecular e os grupamentos de superfície conforme Tabela 1. A biocompatibilidade e a toxicidade dos dendrímeros são dependentes da geração, sendo as gerações mais altas as mais tóxicas. Os dendrímeros PAMAM de geração completa, com grupos aminas de superfície, são bases relativamente fortes e são policatiônicos em pH fisiológico. Portanto, eles são capazes de interagir com membranas biológicas carregadas negativamente, bem como ácidos nucléicos, perturbando sua função (BANISHEYKHOLESAMI; HOSSEINI; NAJAFPOUR DARZI, 2021)

Figura 6 - Estrutura do PAMAM G3.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Tabela 1 - Gerações de PAMAM e suas propriedades.

Geração	Nº de Grupos na superfície	Massa molar (g mol⁻¹)	Diâmetro (nm)
0	4	609	1,5
1	8	1522	2,2
2	16	3348	2,9
3	32	7001	3,6
4	64	14307	4,5
5	128	28919	5,4
6	256	58140	6,7
7	512	116585	8,1

Fonte: Adaptado de CÂNDIDO, 2017.

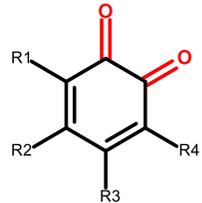
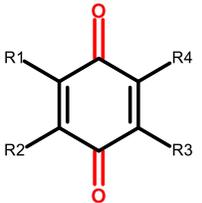
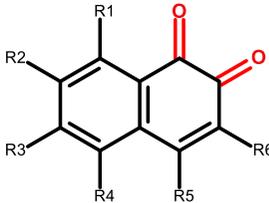
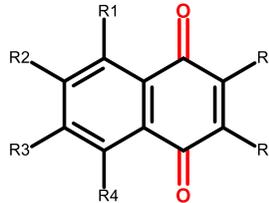
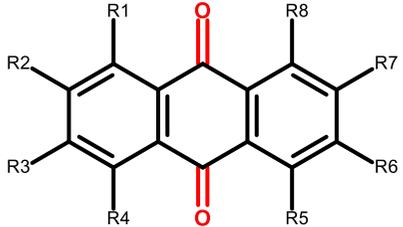
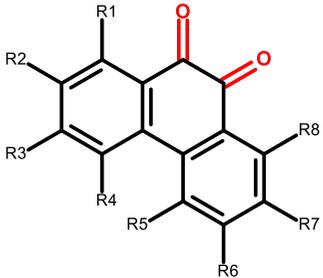
Essas moléculas ao atuarem como carreadores de fármacos, mesmo diante de moléculas com baixa solubilidade, podem aumentar a solubilidade do composto encapsulado que fica alojado no interior do dendrímeros que possui estrutura hidrofóbica ou em sua superfície, contendo os grupos polares. Assim, a macromolécula tem afinidade por compostos hidrofóbicos e hidrofílicos. Além destas características de aumento de solubilidade a interação dendrímero-molécula estabiliza a molécula hospedeira e permite uma liberação programada no meio. Moléculas contendo quinonas, grupo nitro e guanil-hidrazonas fazem parte de uma grande classe de potenciais fármacos para diversas atuações como antibiótico, antibacteriana e anticâncer. Todavia, a aplicação da maioria desses derivados é limitada pela pouca solubilidade. A associação desses compostos com dendrímeros, formando complexos de inclusão, pode ser um dos caminhos para utilização em meio biológico (LI *et al.*, 2018).

A interação do complexo acontece através de ligação covalente ou por interações intermoleculares. Dentre as intermoleculares está a ligação de hidrogênio que pode ocorrer entre os grupos amins presente na superfície do dendrímero e átomos eletronegativos como flúor, oxigênio e nitrogênio do fármaco avaliado. Outra forma é a interação eletrostática caso a molécula encapsulada possua átomos com carga negativa ou positiva. Quando há ligação direta entre o complexo macromolécula-ligante, ocorre a formação de uma amida ou grupo funcional éster (URAM *et al.*, 2017).

1.4 Quinonas

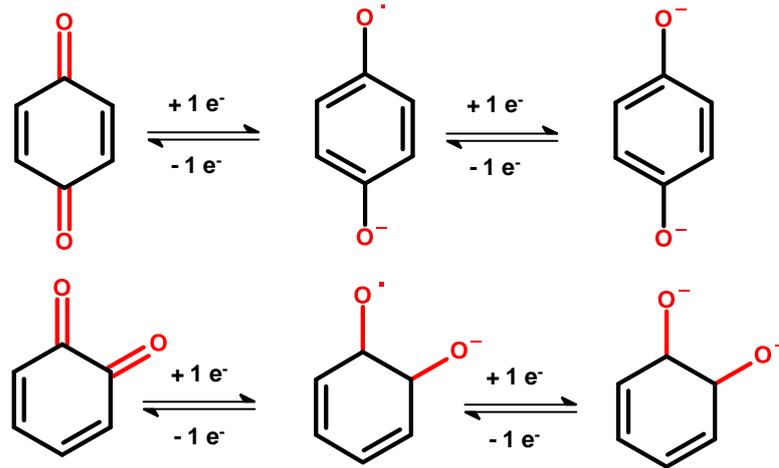
As quinonas fazem parte do grupo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e oxigenados, podendo ser encontradas em famílias de plantas, fungos, algas e bactérias. Sua estrutura básica é representada por dois grupamentos carbonilas em um anel cíclico com seis átomos de carbono nas posições *orto* ou *para* (SYMONS, 2021). Na Tabela 2 estão mostradas as classificações básicas e algumas de suas atividades.

Tabela 2 - Classificação das Quinonas e sua atividade.

Classe	Estrutura	Atividade	Ref.
Benzoquinonas		<i>Antibiótico</i>	(ABRAHAM et al., 2011)
		<i>Antitumoral</i> <i>Antimalárico</i>	
Naftoquinonas		<i>Antibiótico</i>	(LÓPEZ et al., 2014)
		<i>Antitumoral</i> <i>Antiviral</i>	
Antraquinonas		<i>Antibiótico</i> <i>Anticâncer</i> <i>Anti-inflamatório</i>	(CHIEN et al., 2015)
Fenantraquinonas		<i>Antibiótico</i> <i>Anticâncer</i> <i>Antioxidante</i>	(SUN et al., 2016)

Quinonas com atividade redox participam de ciclos enzimáticos e/ou não enzimáticos que produzem semiquinonas e hidroquinonas pela captura de um ou dois elétrons (Figura 7). Esses ânions-radicais podem ser danosos as células devido a geração de peróxido de hidrogênio (SYMONS, 2021).

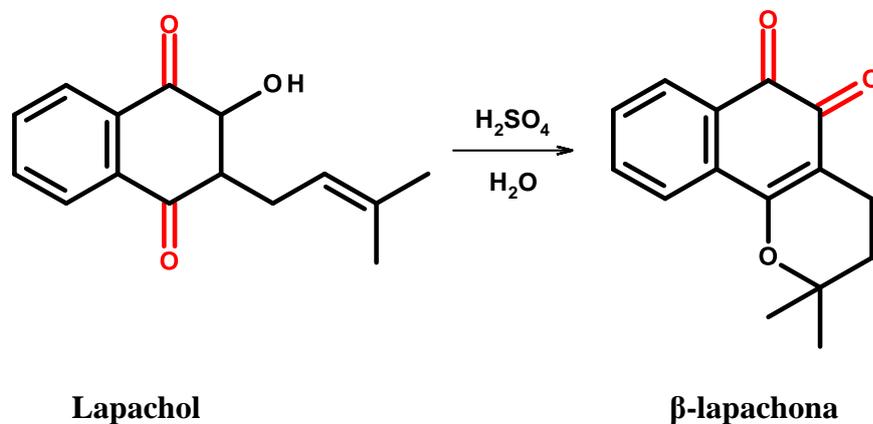
Figura 7 - Equilíbrio redox das Quinonas.



Fonte: Adaptado de ANDRADE, 2016.

O lapachol (Figura 8) que também pertence ao grupo das quinonas é obtido a partir de plantas da família *Bignoniaceae*. Apresenta diversas atividades biológicas como atividade antiparasitária contra *Trypanosoma Cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Leishmania amazonenses* e *L. braziliensis*. (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Figura 8 - Estrutura do Lapachol e da β -lapachona.



Fonte: Autor, 2022.

1.4.1 β -lapachona

Um dos derivados desta classe é a β -lapachona (β LP, Figura 8), um composto natural da ortonaftoquinona encontrado na casca da árvore lapacho, natural da América do Sul. Seu extrato já era conhecido popularmente há centenas de anos como um fármaco. (PARK *et al.*, 2019).

β LP é utilizada para prevenção de trofia muscular, atividade antibacteriana, antifúngica, antimalárica e antitumorais. Nos efeitos benéficos frente a células cancerígenas, β LP atua principalmente contra linhas celulares do pulmão, mama, e pâncreas (PARK *et al.*, 2016) (PARK *et al.*, 2016). Na literatura encontramos outras atribuições do fármaco como o combate ao estresse oxidativo, disfunção renal e apoptose, em estudos com camundongos que apresentavam isquemia/reperfusão nos rins (GANG *et al.*, 2014). O estudo de PINK e colaboradores (2000) mostrou que β LP causa apoptose em células malignas epiteliais de glioma humano e de pigmentos de retina humana. Esse mesmo mecanismo é ativado por células do tipo MCF-7⁹⁹ e T47D¹⁰⁰, da linhagem do câncer de mama quando interagem com β LP.

Entretanto, quinonas, semiquinonas e hidroquinonas (quinonas reduzidas) podem gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) como O_2^- , OH^\bullet , H_2O_2 e O_2 . Essas espécies podem danificar moléculas biológicas como proteínas e DNA originando tumores cancerígenos (CASSAGNES *et al.*, 2018).

Estudos eletroquímicos recentes utilizando sistema com eletrodo de carbono vítreo demonstrou que β LP pode ser encapsulada com PAMAM G2 e G3 (CANDIDO *et al.*, 2018). Diante do exposto e considerando baixa solubilidade do derivado de quinona, neste trabalho avaliamos a interação da β -lapachona com PAMAM num novo sistema de detecção, suportado em eletrodo ITO por vias eletroquímicas e espectroscópicas afim de determinar parâmetros que possam ajudar a compreender melhor este tipo de interação.

Afim de propiciar o estudo de interação de outras classes de compostos com o carreador sintético de PAMAMG3 suportado em eletrodo ITO para assim obter uma plataforma para avaliações similares, estudos de composto bioativo derivado de nitrocomposto e de molécula da classe de guanilhidrazona foram feitas.

1.5 Nitrocompostos

Moléculas de nitrocompostos são potenciais agentes biológicos com atuação antibacteriana, antiparasitário, antineoplásico, entre outros. Estudos com essa classe são relatados na literatura há décadas (XAVIER *et al.*, 2021).

Sua atividade biológica advém da presença do grupo nitro em sua estrutura que confere mudanças na estabilidade pela interação entre o grupo NO₂ e seu alvo de interesse. Essas espécies apresentam alta afinidade por elétrons, classificados como retiradores de elétrons, e também podem apresentar mecanismo de ressonância entre os átomos de oxigênio e nitrogênio e como consequência, se reduzem com facilidade (RAMU *et al.*, 2021). A maior parte das moléculas desta classe sofre biorredução enzimática, de maneira gradual, gerando radicais livres que atingem e bactérias e parasita, impedindo a síntese enzimática. A redução completa envolve um total de 6e⁻ até o derivado amino de acordo com o apresentado nas reações a seguir.

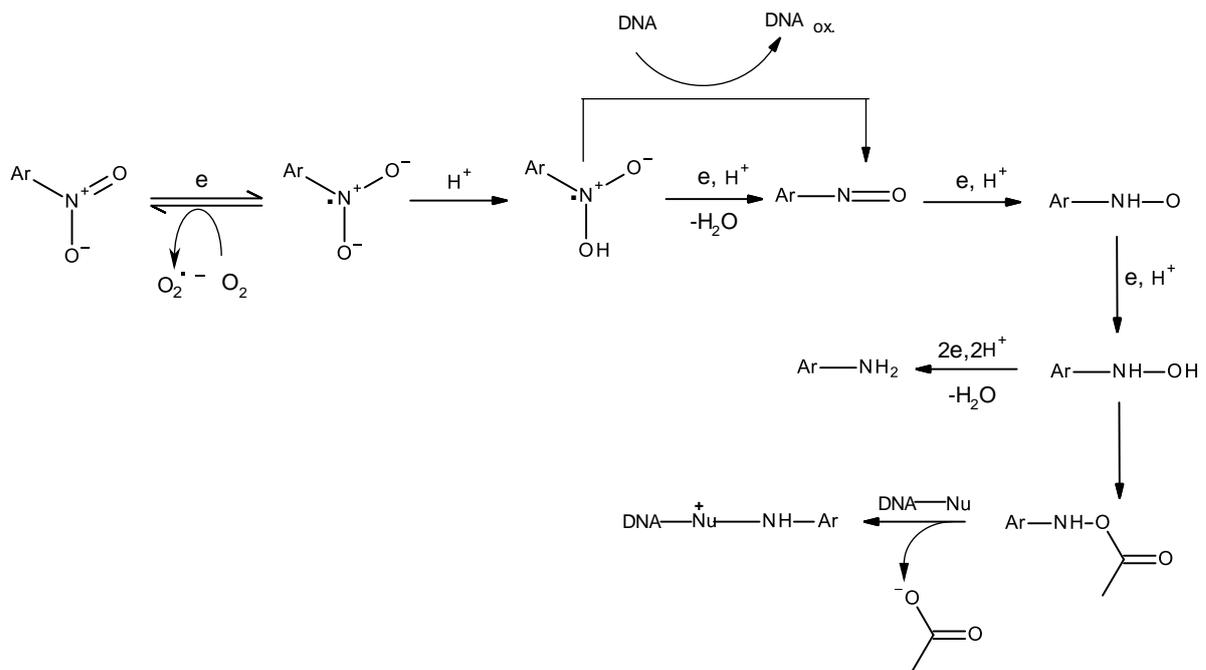


Não há consenso sobre o mecanismo de ação que varia de acordo com a estrutura de cada molécula. Mas a literatura relata que a passagem dessas espécies reativas pela membrana dos microorganismos ocorre por difusão passiva e aumenta com a desestabilização da membrana celular sendo este um dos resultados da ação desses ânions-radicaís causando estresse oxidativo. Em meio anaeróbico, as espécies RNO₂^{•-} e RNHOH são os principais intermediários da redução enzimática. Essas espécies podem interagir com o DNA de bactérias e parasitas promovendo a inativação da biomolécula. Referente ao meio aeróbico, RNO₂^{•-} reage com o oxigênio formando O₂^{•-}. O radical superóxido formado, através de enzimas como a superóxido dismutase propiciam a formação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que pode desestruturar membranas biológicas e reagir com enzimas ferredoxinas, liberando hidroxilas (OH^{•-}) que são tóxicas para células bacterianas e parasitárias. Outra característica importante é que os radicais livres e os intermediários de grupos nitros podem induzir a liberação de fosfato de timidina, promovendo a desestabilização e ruptura da dupla hélice do DNA (AVENDAÑO; MENÉNDEZ, 2015).

Também, uma possível rota de mecanismo para os nitro-compostos se dá pela ligação de intermediários do processo de redução a grupos tióis de enzimas essenciais de parasitas e bactérias ocorrendo decréscimo e inativação destas enzimas (RUIZ-BARRERA *et al.*, 2020)

Entre os compostos nitros, a classe com maior potencial biológico são os nitroaromáticos com aplicações contra diversos tipos de câncer, infecções anaeróbicas e como radiosensibilizadores. Nesta classe estão os nitroimidazóis que são capazes de induzir a morte celular em ambientes hipóxicos na ausência de radiação. Tal atividade deve-se a presença de dois dos seus metabólitos, o ânion radical nitro e da hidroxilamina. Desta forma é possível a oxidação do DNA pelo radical nitro sendo possível a formação de ligações covalentes através do derivado O-acetil da hidroxilamina, Figura 9 (AVENDAÑO; MENÉNDEZ, 2015).

Figura 9 - Oxidação do DNA pelo radical nitro.

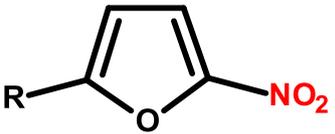
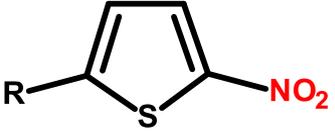
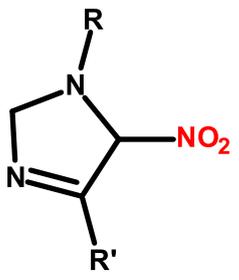


Fonte: Adaptado de AVENDAÑO, 2015.

Alguns exemplos de aplicação de moléculas nitro com comprovada ação farmacológica são a nifedipina e nitredipina, que atuam como agentes antihipertensivos, o acenocumarol como anticoagulante, clonitiazina com ação analgésico narcótico, nimesulida como anti-inflamatório, cloranfenicol e nitrofurais como antibacterianos, metronidazol e

tinidazol com características antiparasitários. As estruturas básicas dos compostos nitros estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Estrutura de derivados de nitrocompostos e respectivo agente etiológico.

Classe	Estrutura	Agente etiológico
Derivados Nitrofurânicos		<i>Leishmania major</i> <i>Trypanosoma brucei</i> <i>Trypanosoma cruzi</i>
Derivados Nitrotiofênicos		<i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Entamoeba histolítica</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Derivados Nitrobenzênicos		<i>Clostridium perfringes</i> <i>Bacterioides sp</i>
Derivados Nitroimidazólicos		<i>Micobacterium tuberculosis*</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Giardia muris</i>

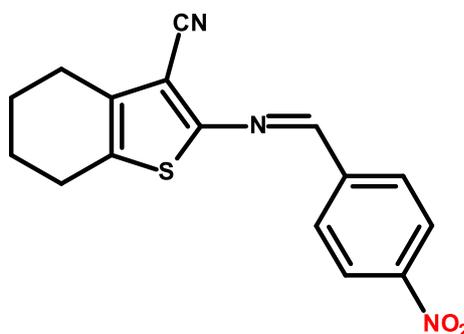
Fonte: Adaptado de PAULA, 2009.

1.5.1 6CN10

O 6CN10 (Figura 10), molécula da classe dos nitroaromáticos, foi desenvolvida e sua eficácia atinfúngica comprovada (ELEAMEN *et al.*, 2017). Estudos de SILVA e colaboradores (2017) demonstram que o composto interage com DNA e forma complexos com dendrímeros de β -ciclodextrina e PAMAM, levando a um aumento de solubilidade.

No presente trabalho, apresentamos um novo método para avaliarmos a interação do complexo PAMAM-6CN10 em eletrodo de ITO para coletar dados no âmbito eletroquímico e espectroscópico.

Figura 10 - Estrutura do 6CN10.



Fonte: Autor, 2022.

1.6 Guanil-hidrazonas

As hidrazonas apresentam estrutura básica $R_1R_2C=NNH_2$. A combinação de hidrazonas com outros grupos funcionais criam compostos químicos com características singulares. As principais aplicações destes compostos é no tratamento de câncer de mama, ovário, pulmão, próstata, leucemia, entre outras (KATHURIA *et al.*, 2018).

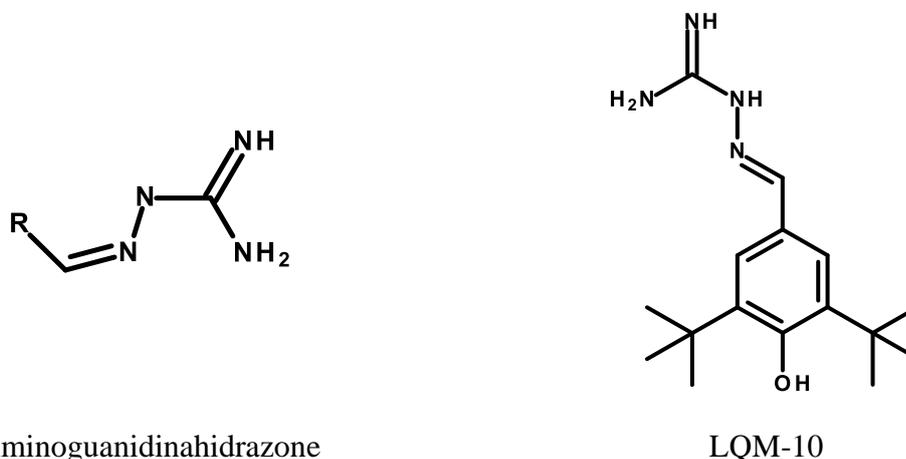
A classe de compostos pertencentes as guanilhidrazonas apresentam atividades biológicas já conhecidas na literatura como atividade antimalária, tripanocida, antihirpetensivo, antitumoral, antialzheimier, antibacteriano, entre outros. Uma subclasse são as aminoguanidinahidrazonas (AGH) que são representados por grupo amidina (guanil) ligado ao grupamento hidrazones (Figura 11), que podem apresentar, além das já relatadas, atividades anti-trypanossoma, antifúngica, antiglicação, entre outras. (DANTAS *et al.*, 2018; KATHURIA *et al.*, 2018; SANTANA *et al.*, 2019).

1.6.1 LQM10

Um dos derivados do grupo de AGH é o LQM10 (2-[3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil-metileno]hidrazinecarboxilamida), substância sintetizada pelo grupo *Laboratório de Síntese e Pesquisa em química Medicinal* (LSPMED), liderado pelo professor Thiago Aquino, que apresenta atividade contra cólon humano, melanoma, glioblastoma e leucemia promielocítica (AZEVEDO DE BRITO *et al.*, 2017). Esta substância ainda é pouco estudada. Em um dos

estudos, SANTANA (2019), relatou que LQM10 (Figura 11) foi capaz de inibir em 33% a atividade da lipase de *Candida Rugosa* simulando condições fisiológicas.

Figura 11 - Estrutura da Aminoguanidinahidrazone e LQM-10.



Fonte: Autor, 2022.

Sabendo-se dos poucos estudos envolvendo o composto LQM-10, procuramos estudar a interação entre PAMAM e o composto com possível formação do complexo PAMAM-LQM-10 com avaliação espectroscópica e eletroquímica.

1.7 Técnicas Eletroquímicas

As técnicas eletroquímicas são amplamente empregadas em diversas áreas do conhecimento como medicina, bioquímica, biologia molecular, química analítica, físico-química, entre outros (ZEA *et al.*, 2020).

Técnicas eletroquímicas são sistemas versáteis que oferecem alta sensibilidade, precisão e exatidão com instrumentação de custo relativamente baixo. São exploradas propriedades elétricas como corrente elétrica, diferenças de potencial e acúmulo interfacial de cargas. A partir de uma dada perturbação no meio reacional, as espécies redox interagem de modo físico, químico ou/e superficial com os componentes do meio reacional. As medidas coletadas são correlacionadas a características da molécula em estudo (BANSOD *et al.*, 2017).

Dentre as técnicas voltamétricas estão a voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, cronoamperometria e espectroscopia de impedância eletroquímica.

1.7.1 Voltametria Cíclica

Informações eletroquímicas qualitativas são comumente encontradas na Voltametria Cíclica (VC). A técnica é baseada na varredura de potencial de forma direta e inversa em vários ciclos com monitoramento dos picos catódico e anódico. Esta técnica fornece informações sobre os processos redox e cinéticos das reações heterogêneas de transferência de elétrons e reações químicas acopladas a processos adsorptivos. Os sistemas que podem ser estudados por esta técnica são classificados como reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis (PUTHONGKHAM; VENTON, 2020)

Os sistemas reversíveis são caracterizados por apresentar velocidade de transferência de carga elevada ($K_s > 10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$) o que garante a restauração do equilíbrio químico de forma rápida na superfície do eletrodo de forma que apenas a etapa de transferência de massa influencia o processo. A equação da corrente de pico para este sistema pode ser calculada conforme a equação 5.

$$i_{pc} = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} / AD_0^{1/2} v^{1/2} c_0 \quad (\text{Eq. 5})$$

Sabendo que n representa o número de mols de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D_0 o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), v é velocidade de varredura (V s^{-1}) e C_0 é a concentração da espécie em solução (mol cm^{-3}).

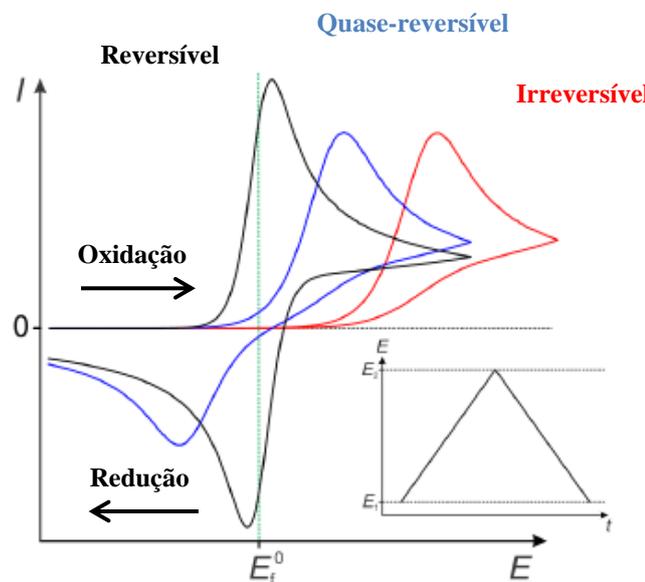
Diferentemente, nos sistemas irreversíveis a transferência de carga é lenta e com isso o equilíbrio químico demora para ser reestabelecido. Além desses, os sistemas quase-reversíveis a reação torna-se reversível em baixas velocidades de varredura e irreversível em altas velocidades. Desta forma, o perfil quase-reversível é observado em velocidades medianas de varredura. Essas características influenciam a resposta da Voltametria Cíclica como é mostrado a seguir (P. BALDWIN; RAVICHANDRAN; K. JOHNSON, 1984).

Para que aconteça a inversão do sentido de varredura é preciso antes que seja aplicado um potencial no eletrodo numa velocidade fixa até atingir o potencial desejado, a partir desse momento a varredura segue em sentido oposto. Em sistemas reversíveis, um par de picos é observado, potenciais de pico catódico (E_{pc}) e anódico (E_{pa}) e correntes de pico catódico (I_{pc}) e anódico (I_{pa}), além do potencial de meia onda ($E_{1/2}$) (WANG, 2006). Entretanto, em

sistemas irreversíveis, como a reação só acontece em um único sentido, só há surgimento dos picos mencionados na varredura inicial (Figura 12). A separação entre E_{pa} e E_{pc} é crescente à medida que ocorre o aumento da velocidade de varredura, assim o valor da diferença de potencial varia com o aumento da velocidade (P. BALDWIN; RAVICHANDRAN; K. JOHNSON, 1984).

Desta forma, a análise dos dados resulta em constatações sobre a reversibilidade da transferência de elétrons, existência de espécies intermediárias, adsorção e fenômenos catalíticos e determinação da concentração de substâncias eletroativas (ZOSKY, 2006).

Figura 12 - Representação da Voltametria Cíclica de sistema reversível, quase-reversível e irreversível.



Fonte: Adaptado de LEE, 2014.

1.7.2 Voltametria de Pulso Diferencial

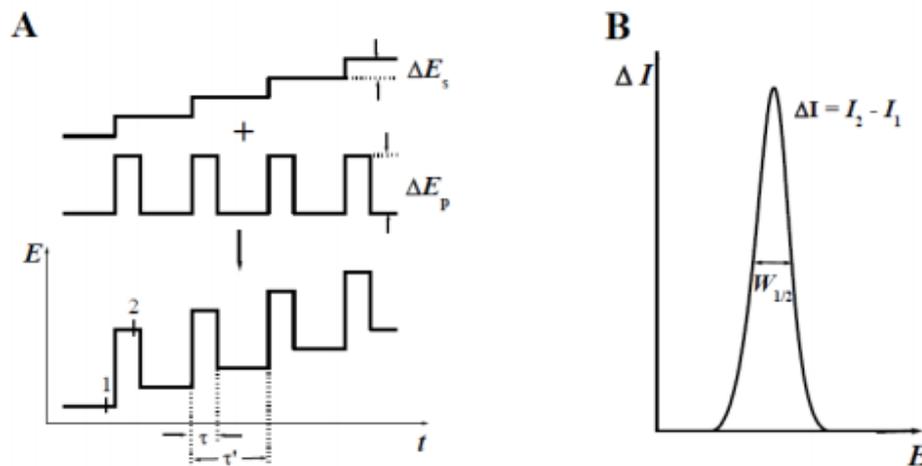
A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica que propicia maior sensibilidade em comparação a VC além de propiciar baixos limites de detecção (CRESPI, 2020).

As técnicas de pulso são baseadas na aplicação de degraus de potencial, fixos ou variáveis. O decaimento da corrente capacitiva, após aplicação do pulso de potencial, é muito mais rápido que a da faradaica. Isto se deve a um aumento na contribuição da corrente

capacitiva e da corrente faradaica, mas a corrente capacitiva diminui exponencialmente, enquanto que a corrente faradaica diminui linearmente. Desta forma, com um tempo apropriado para iniciar a segunda corrente, faz-se a leitura da corrente total a um valor de corrente onde a contribuição da corrente capacitiva pode ser desconsiderada. (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Pulso de potencial sucessivos de mesma amplitude (ΔE_p) são aplicadas sobre uma rampa linear ou escada de potencial com incrementos (ΔE_s) em intervalos de tempos e a corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (I_1) e outra ao final do pulso (I_2). A subtração numérica (ΔI) dessas duas correntes é plotado versus o potencial aplicado (Figura 13). O voltamograma resultante consiste de picos de correntes de forma gaussiana em que a área do pico é diretamente proporcional a concentração do analito. O termo “ τ ” representa o tempo entre duas aplicações sucessivas de pulso, sendo este parâmetro que determina a largura do pulso (PACHECO et al., 2013).

Figura 13 - Representações da técnica de Voltametria de Pulso Diferencial.



Fonte: BRETT, 1996.

1.7.3 Cronoamperometria

A cronoamperometria é baseada na aplicação de um potencial constante ao eletrodo de trabalho em função do tempo. O fluxo de corrente é correlacionado com o gradiente de concentração das espécies na superfície do eletrodo de trabalho. Nessas condições o transporte de massa se dá apenas por difusão. A curva corrente *versus* tempo se apresenta como uma curva de decaimento exponencial da corrente com o tempo (KONDRATYEVA et al., 2020)

Na cronoamperometria (*potencial-step*) é aplicado a dois potenciais, o potencial (ΔE_1) é realizado em regiões onde não há reação com espécies eletroativas, sem processos faradaicos, que tem como função carregar a dupla camada elétrica na superfície do eletrodo de trabalho. O segundo potencial (ΔE_2) é o potencial responsável pela redução das espécies eletroativas (YANG et al., 2021).

Informações sobre a identidade das espécies podem ser obtidas a partir da razão entre a corrente de pico de oxidação e a corrente de redução de pico. A técnica pode ser utilizada para determinar estabilidade de compostos em consideráveis intervalos de tempo. Entretanto, a cronoamperometria gera altas correntes de carga que decaem exponencialmente com o tempo (COSTENTIN; SAVÉANT, 2020).

1.7.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A base da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) está ancorada na descrição de um circuito para resistir corrente elétrica. A lei de Ohm rege este sistema (para um resistor ideal) pela relação existente:

$$R = \frac{E}{I} \quad (\text{Eq. 6})$$

A resistência (R) é expressa em ohms (Ω), o potencial em volts (V) e a corrente em ampére (A). Entretanto, o resistor ideal requer algumas características como valor de resistência ser independente da frequência e seguir a lei de Ohm em todos os níveis de corrente e tensão.

Corrente alternada (ac) é uma corrente elétrica que o sentido varia com o tempo de forma oposta a corrente contínua (sistema ideal) em que o sentido permanece constante ao longo do tempo. Na ac, que corresponde a maioria dos sistemas, a resistência a corrente elétrica é chamado de Impedância e é dada pela Equação 7.

$$E(t) = ZI(t) \quad \text{Eq. 07}$$

Em que Z é a impedância em Ohm. O potencial elétrico está diretamente relacionado ao tempo (t) em m circuito ac, dado por :

$$E(t) = E_0 \text{sen}wt \quad (\text{Eq. 8})$$

Sendo E_0 a amplitude do sinal. ω é a velocidade angular e é definido por :

$$\omega = 2\pi f \quad (\text{Eq. 9})$$

Em que f , dado em Hertz, refere-se à frequência de ac.

A corrente elétrica relacionada a esta oscilação $I(t)$ é:

$$I(t) = I_0 \text{sen}(\omega t + \phi) \quad (\text{Eq. 10})$$

Φ é a defasagem da corrente em relação ao potencial, chamado também de ângulo de fase (MARQUES, 2011).

De forma sintetizada, é realizado uma perturbação inicial (ΔE) do tipo senoidal. A resposta do eletrodo é uma corrente (ΔI) também senoidal, porém com diferença de fase Φ em relação ao sinal aplicado. Assim a impedância (Z), mede a relação entre ΔE e ΔI (RIBEIRO, D.V.; SOUZA, C. A. C.; ABRANTES, 2015).

EIE fornece dados mensuráveis das características elétricas da interface eletrodo/solução, sendo de suma importância no processo de caracterização de eletrodos. A técnica possibilita a aquisição de informações que visam compreender o comportamento geral de um sistema que possui diversos processos inter-relacionados ocorrendo em diferentes velocidades (CARVALHO; ANDRADE; BUENO, 2006).

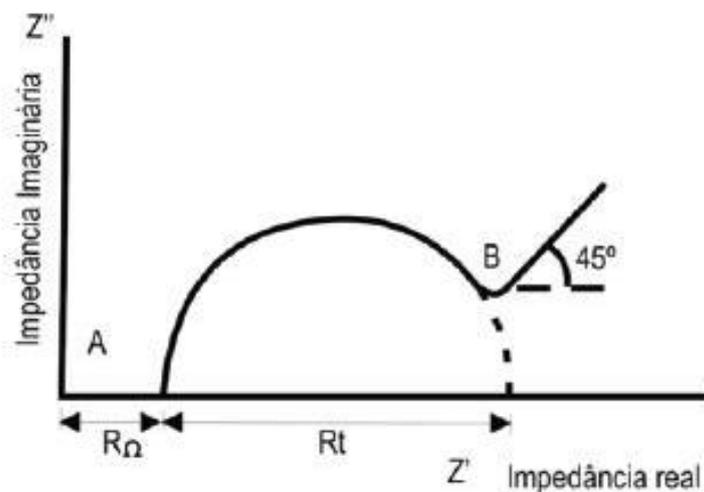
A impedância eletroquímica restringe sua aplicação para sistemas que não se alteram com o passar do tempo, ou seja, é uma técnica do estado estacionário. A resposta da aplicação de um sinal alternado de pequena amplitude (5-20 mV) é relacionado com a resposta do eletrodo pela mudança de fase dos componentes corrente, voltagem e amplitude. Desse modo é possível diferenciar processos com tempos característicos distintos possibilitando distinguir contribuições simultâneas a resposta total (CIUCCI, 2019). O gráfico da Figura 14 é chamado de diagrama de Nyquist e obedece a relação:

$$Z = Z' + jZ'' \quad (\text{Eq. 11})$$

Em que Z' representa a parte real da impedância e Z'' a parte imaginária. O diagrama de Nyquist é formado por um conjunto de pontos cada um representando a grandeza e a direção do vetor de impedância para uma determinada frequência. Pela Figura 14 pode-se observar que os dados de impedância relativos a baixas frequências estão do lado direito (Região B) e

os de alta frequência do lado esquerdo (Região A). O intercepto do semi-círculo com o eixo real em altas frequências fornece a resistência do eletrólito (R_{Ω}). De forma análoga, o intercepto do semi-círculo com o eixo real de baixas frequências indica a resistência de polarização (R_p), conhecida como resistência de transferência de carga que representa as características da interface eletrodo/solução. Desta forma, quanto maior o semicírculo, maior R_p , e maior a resistência de transferência de carga (RIBEIRO, D.V.; SOUZA, C. A. C.; ABRANTES, 2015).

Figura 14 - Representação do diagrama de Nyquist.



Fonte: RIBEIRO, 2015

1.8 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta poderosa para análises de microestrutura de materiais sólidos, inclusive no processo de caracterização. Além disso, é possível obter imagens tridimensionais, com elevada resolução, informações sobre a composição química da amostra e identificação da morfologia e tipologia da superfície de análise (ABDULLAH; MOHAMMED, 2019).

Esta técnica baseia-se na utilização de um feixe de elétrons é inicialmente demagnificado a partir de um sistema de lentes condensadoras, de pequeno diâmetro, gerado a partir de um filamento de tungstênio aquecido (operando numa faixa de alta tensão) ou cristal, com o objetivo de explorar a superfície da amostra, ponto a ponto provocando uma série de emissão de radiação. O sinal desse procedimento é transmitido para um detector a uma tela

catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Através de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. O sinal da imagem resulta da interação do feixe incidente (elétrons primários) com a superfície da amostra, resulta na liberação de elétrons secundários, retroespalhados, entre outros, que podem ser coletados por detectores e convertidos em sinal de vídeo (KLEIN; BUHR; GEORG FRASE, 2012).

Para a geração de boas imagens é necessário que o material analisado seja condutor de corrente elétrica. Dessa forma, materiais que apresentam baixa condutividade precisam ser preparados para que passem a apresentar condução elétrica mas que não tenham, com o procedimento adotado, modificações em sua estrutura. Uma das técnicas para a condução é a aplicação de uma película de ouro na amostra a ser analisada (NAZEM-BOKAEE *et al.*, 2018).

1.9 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (*Scanning Force Mircroscope*, AFM) é muito usada para caracterizar morfologicamente materiais, com precisão em escala micro, nano ou subnano. Esta técnica permite determinar através de forças atrativas e repulsivas entre uma sonda (ponta ligada a um cantilever) e uma amostra depositada sobre um suporte de vidro, silício ou mica (FUKUMA; GARCIA, 2018).

O princípio de funcionamento é baseado no contato da sonda, ou por proximidade, da superfície da amostra que se quer investigar, o que dá origem a uma interação altamente localizada entre a sonda e a amostra. No modo contato, o cantilever (pequena haste flexível) da AFM enverga-se na direção oposta à amostra. No modo não contato, o cantilever da AFM enverga-se na direção da amostra. Essas deflexões são resultado de forças de atração e repulsão. O AFM opera medindo as forças entre a ponteira e a amostra que dependem de diversos fatores como, por exemplo, dos materiais que compõem a amostra e a ponteira, da distância entre elas, da geometria da ponteira e de qualquer tipo de contaminação que houver sobre a superfície da amostra. A deflexão da sonda em função da interação com a amostra é utilizada para o estudo da morfologia de superfície como a topografia, rugosidade, dispersão e tamanho de partículas (ANDO, 2018).

A atração superficial entre a ponteira e a superfície do material analisado é devido a uma grande quantidade de forças atrativas como as forças de van der Waals. A atração continua até o limite máximo que acontece quando os orbitais se repelem mutuamente. Esta repulsão eletrostática enfraquece a força atrativa à medida que a distância diminui. A força anula-se quando a distância entre os átomos é da ordem de alguns ângstroms (da ordem da distância característica de uma união química). Quando as forças se tornam positivas, podemos dizer que os átomos da ponteira e da amostra estão em contato e as forças repulsivas acabam por dominar (JALILI; LAXMINARAYANA, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Preparar e caracterizar o eletro de ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3 e avaliar a interação de PAMAMG3 com β -lapachona, 6CN10 e LQM10.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar o sistema ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3 através das técnicas de UV-Vis, MEV, FTIR, AFM, VC, VPD e ESI;
- b) Promover a estabilização da deposição de nanopartículas de ouro através da adição de cisteamina ao sistema;
- c) Verificar se há interação de PAMAMG3 com β -lapachona, 6CN10 e LQM10 neste novo sistema de monitoramento;
- d) Calcular constantes de interação para as moléculas avaliadas por VPD, com indicação da magnitude da ligação PAMAM-ligante;
- e) Realizar a avaliação da interação e cálculo de constante por UV-Vis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

Placas de ITO (8-12 Ω) foram obtidos pela Delta Technologies. HAuCl_3 , cisteamina ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), PAMAMG3 (20% m/v em metanol) foram adquiridos pela sigma Aldrich. Ácido sulfúrico (H_2SO_4), álcool isopropílico ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$), glutaraldeído ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) e etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) foram obtidos pela Dinâmica. β -Lapachona foi sintetizada pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro e cedida pela professora Ligia Maria Marino Valente. 6CN10 e LQM10 foram sintetizados e cedidos pelo professor Thiago Mendonça Aquino do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

Todos os reagentes foram de grau analítico e as soluções preparadas em água ultrapura (18 $\text{M}\Omega$ cm) obtida através de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

3.1.1 Limpeza do eletrodo ITO

Eletrodos ITO foram limpos imergindo-os em solução 10% de Extran MA01 alcalino (Merck) durante 30 min. Feito isso, foram lavados com água deionizada e deixados por 30 min em água deionizada. Em seguida, ficaram durante 30 min em álcool isopropanol. Ao fim desta etapa, os eletrodos foram deixados expostos ao ar para secagem. Através de um multímetro foi identificada a superfície condutora e adicionada uma fita adesiva (3 x 8 mm) de cobre para contato elétrico. Os eletrodos foram armazenados em dessecador a vácuo. Procedimento de acordo com ALMEIDA, 2016.

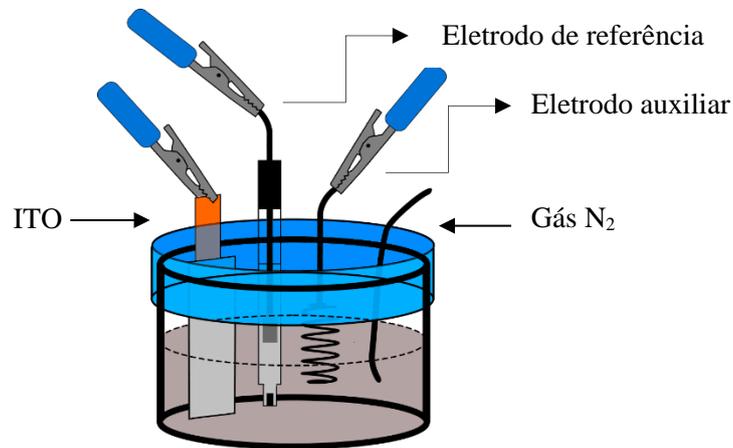
3.1.2 Preparo de soluções

Tampão Britton-Robinson (BR) foi utilizado para as análises. O preparo foi realizado pela mistura de 100 mL das soluções de ácido acético, ácido fosfórico e ácido bórico, todas a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ resultando no tampão de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com faixa tamponante de 2 a 12. Solução de HAuCl_3 $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em meio ácido utilizando solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Solução estoque de 6CN10, β LP e LQM10 foram preparadas com concentração $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sempre no dia da respectiva análise, em álcool etílico P.A.

3.2 Estudos eletroquímicos

Medidas eletroquímicas foram realizadas em potenciostato PGSTAT (AUT73222) da Metrohm Autolab em um sistema de três eletrodos. O eletrodo de trabalho neste trabalho é o ITO, o eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina e como eletrodo de referência foi utilizado o sistema Ag/AgCl/Cl⁻ (saturado). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente (25°C ± 1°C). Todos os tratamentos de dados que resultaram em gráficos/voltamogramas foram realizados no programa Origin 8.0.

Figura 15 - Representação da cela eletroquímica com todos eletrodos.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

3.2.1 Deposição de nanopartículas de ouro na superfície de ITO

Através de cronoamperometria, aplicando um potencial de -0,3V, foi depositado nanopartículas de ouro utilizando solução H₂AuCl₃ 1x10⁻⁴ mol L⁻¹ em meio ácido (H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹) na superfície do eletrodo ITO. Antes e durante a deposição a solução ficou sob gás N₂.

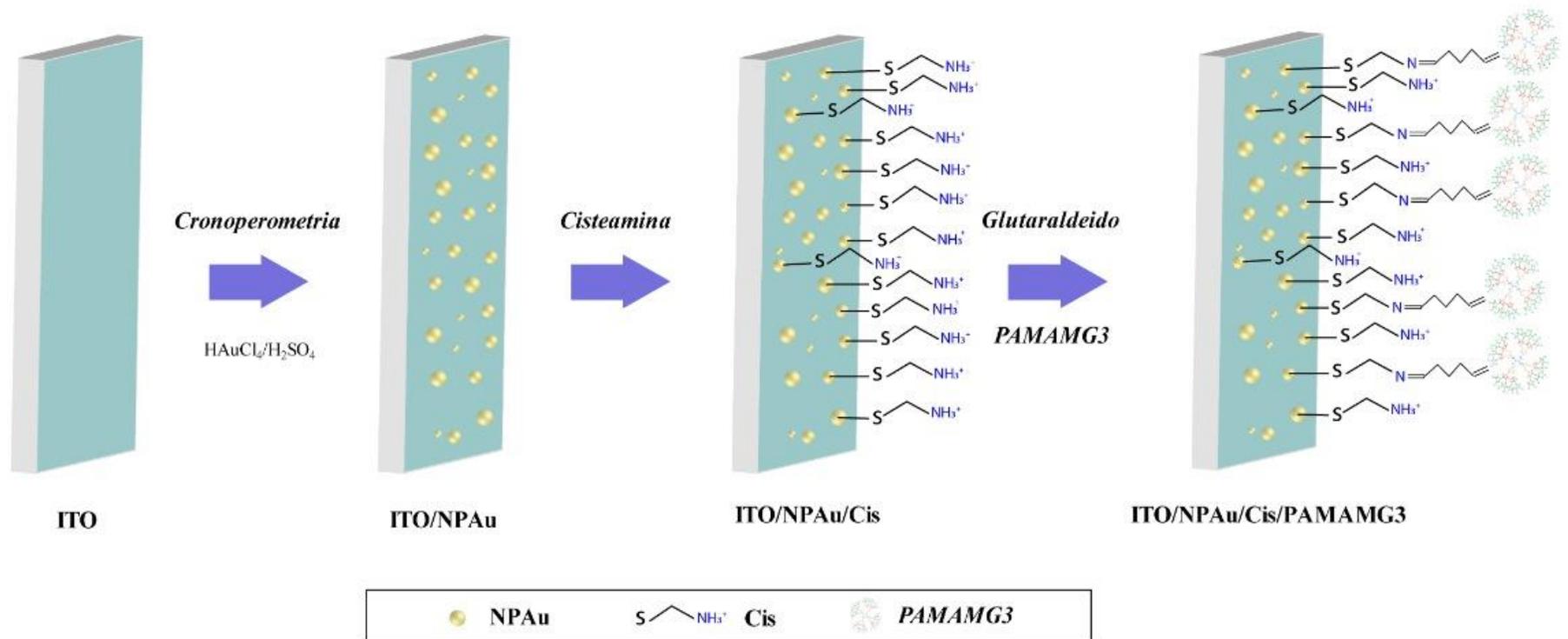
3.2.1.1 Avaliação do tempo de eletrodeposição de NPAu por UV-Vis

O tempo de eletrodeposição de NPAu por cronoamperometria, foi avaliada empregando potencial fixado em -0,3V com variação do tempo de 120, 300, 500 e 800s. Foi utilizado um eletrodo ITO para cada deposição. O sistema foi desaerado com N₂ durante 15 min antes da medida. Durante a análise o gás foi mantido na superfície da solução. A área de eletrodeposição de NPAu no ITO foi de 1,2 cm² (1,5 cm x 0,8 cm).

3.3 Construção do eletrodo ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3

Com a deposição de NPAu na superfície do ITO, as placas foram imersas em solução de cisteamina 1×10^{-2} mol L⁻¹, durante 2h formando o sistema ITO/NPAu/Cis. Logo em seguida, são inseridas em solução de glutaraldeído (1% em etanol) durante 2h. Por fim, o sistema é deixado overnight com PAMAMG3 $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Com isso é formado o eletrodo com todas as modificações: ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3. Ao fim de cada etapa o eletrodo é lavado com água deionizada para eliminar material adsorvido. Processo representado na Figura 16.

Figura 16 - Representação das modificações no eletrodo de ITO.



3.4 CARACTERIZAÇÕES

As caracterizações foram realizadas para os sistemas, ITO, ITO/NPAu/, ITO/NPAu/Cis e ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3.

3.4.1 UV-Vis

As medidas por UV-Vis foram realizadas com o eletrodo (1 x 1 cm) inserido numa cubeta de quartzo na faixa de 250 a 1100 nm. As medidas foram realizadas sem presença de qualquer solução, apenas para avaliação da superfície do eletrodo. As medidas foram efetuadas em um único ITO utilizando o espectrômetro Shimadzu Multispec-1501.

3.4.2 FTIR

Os espectros de FTIR foram obtidos com 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} na região de 4000 a 400 cm^{-1} à temperatura ambiente (27°C) utilizando o equipamento espectrômetro IRPrestige-21 com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio, Shimadzu Corp.

3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Quatro eletrodos ITO, cada um com uma modificação distinta, foram analisadas por MEV. Os eletrodos não necessitaram de metalização visto que o ITO é um semicondutor e há eletrodeposição de NPAu. Entretanto, foi necessário revestir as bordas das amostras com pasta de carbono com esmalte incolor (comercial) para aumentar a condutividade do sistema. As micrografias foram obtidas operando com tensão de aceleração de 25,0 a 30,0 kV utilizando um microscópio Shimadzu VEGA3 com detectores de elétrons secundários (SE) e retroespalhados (BSE).

3.4.4 Microscopia de Força Atômica

Todas as imagens da morfologia das amostras (uma amostra para cada modificação) foram obtidas utilizando um microscópio de força atômica Multiview 1000™ (Nanonics) montado em conjunto com um microscópio óptico BXM (Olympus). Esta combinação permitiu o posicionamento lateral da ponta de AFM sobre as amostras com precisão de escala micrométrica. Os experimentos foram realizados usando uma ponta de varredura com um raio típico de curvatura $< 20\text{ nm}$ em um *cantilever* de $320\text{ }\mu\text{m}$ de comprimento, com constante de mola $< 1\text{ N/m}$ e uma frequência nominal de 35 kHz . O sistema de AFM foi acusticamente isolado para reduzir qualquer interferência de ruídos ambiente durante as medições. A

topografia das amostras foi imageada (256×256 pixels) no modo de contato intermitente com uma taxa de varredura de 0,3-1 Hz. As imagens foram analisadas usando o *software* WSxM.

3.4.5 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

As medições eletroquímicas foram realizadas utilizando 15 mL da sonda $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ a $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 1:1 do par redox e $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de KCl utilizado como eletrodo de suporte, usando um sistema eletroquímico de três eletrodos. As medidas de EIE foram realizadas em potencial de circuito aberto com aplicação de amplitude de potencial de 5,0 mV e intervalo de frequência na faixa de 10^5 a 10^1 Hz de acordo com (DE LIMA FRANÇA et al., 2016). A fim de preservar a mesma área de modificação, todo o estudo foi feito apenas numa amostra do eletrodo, com medidas feitas para cada modificação.

3.4.6 Voltametria Cíclica

Utilizando 15 mL da sonda $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ foi realizado o ensaio de voltametria cíclica a uma taxa de varredura de 50 mV s^{-1} de -0,3 a 0,6V. Também por eletroquímica foi realizado VC utilizando tampão BR pH 7,4 para este mesmo sistema com velocidade 50 mV s^{-1} fazendo uma primeira varredura de -0,8 a 0,0V (sob N_2) e posteriormente de 0,0 a 0,4V. As medidas foram feitas numa única amostra de ITO.

3.5 Voltametria de Pulso Diferencial

Foi utilizado a técnica de VPD para avaliar a interação de PAMAMG3 com as substâncias e para determinar a constante de formação (K_f). O estudo foi feito em tampão BR 7,4 com adições sucessivas do analito. As medidas foram realizadas na faixa entre -0,8 a 0,0V (sob N_2) para βLP e 6CN10 e de 0,0 a 0,5V para LQM10.

3.6 Avaliação da interação por UV-Vis

O eletrodo ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3 foi inserido em cubeta de quartzo 1 x 1 cm. Alíquotas das soluções das moléculas ($1-14 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, 20% etanol) foram adicionadas a cubeta e cada alíquota adicionada ficou em contato com o eletrodo por 15 min. Posteriormente, o eletrodo foi lavado com água deionizada para retirar material adsorvido. Por fim, após secagem, foi realizada a leitura do ITO no equipamento na faixa 300 – 700 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da interação de PAMAMG3, suportado em eletrodo de ITO modificado, e as interações com β LP, 6CN10 e LQM10, são descritos a seguir. Inicialmente o sistema ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3 foi caracterizado e posteriormente foi estudado a interação do dendrímeros com as moléculas selecionadas por VPD e UV-Vis.

4.1 Avaliação do tempo de eletrodeposição de nanopartículas de ouro

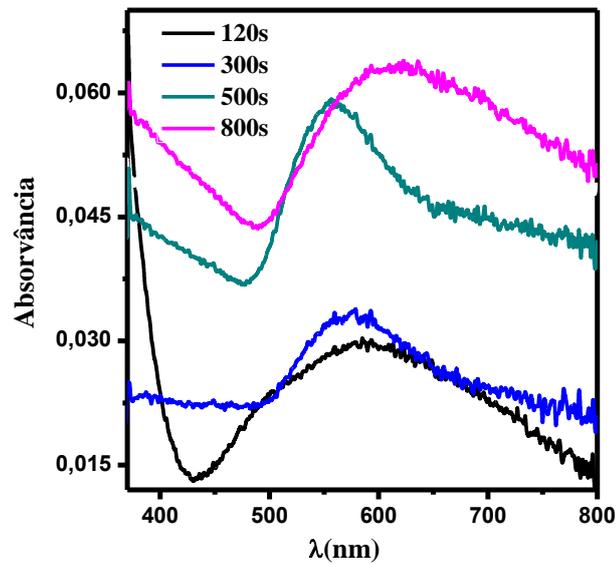
A eletrodeposição de nanopartículas de ouro em meio ácido propicia a redução do metal segundo a reação (RAJI *et al.*, 2022)



A maior parte dos trabalhos envolvendo eletrodeposição de NPAu na superfície condutora ITO, utiliza solução de ouro (HAuCl_4) em meio ácido com concentrações maiores ou iguais a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. (COLOMBO *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2013a). Empregando a concentração de ouro 10 vezes menor que o convencional ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), foi realizado o estudo por UV-Vis para definição do tempo de deposição das NPAu. Além disso, esta técnica fornece dados importantes como o tamanho da nanopartícula formada (ZUBER *et al.*, 2016). Mudanças de absorção para maiores comprimentos de onda são observados à medida que o tamanho das NPAu aumenta e à medida que a distância entre as nanopartículas diminui devido a agregação. Fenômeno este resultado da falta de uma camada eficiente de passivação das partículas metálicas, incapaz de estabilizar eletrostaticamente ou estericamente as nanopartículas (CHANDRA *et al.*, 2016; ZUBER *et al.*, 2016).

A Figura 17 mostra o perfil de absorção de plasmon de superfície das NPAu em diferentes tempos de eletrodeposição. Em 120 segundos, a banda de plasmon de superfície (LSPR) está localizada em 582 nm, que corresponde a partículas com diâmetro médio de 80 nm. Em 300 segundos, a banda diminui para o valor de 570 nm o que indica um diâmetro estimado de 80 nm. Na aplicação de 500 segundos de cronoamperometria, há mais um deslocamento para 557 nm com tamanho da nanopartícula entre 90 a 100 nm (HAISS *et al.*, 2007). 616 nm é a banda ao se utilizar a eletrodeposição de 800 segundos com diâmetro médio de 125 nm (STAROWICZ *et al.*, 2018).

Figura 17 - Avaliação do tempo de eletrodeposição de NPAu por UV-Vis.

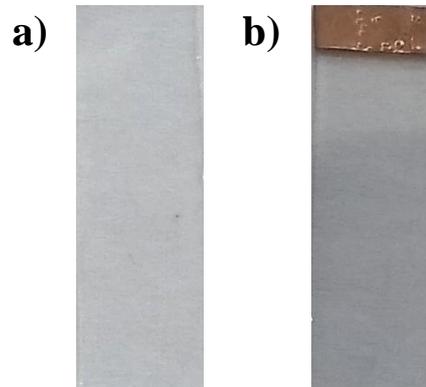


Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Com o aumento de tempo de deposição houve aumento na banda de absorção. Esse resultado já era esperado visto que com o maior tempo de deposição resulta numa maior concentração de NPAu na superfície do eletrodo. Entretanto, o comprimento de onda diminuiu entre os tempos de 120, 300 e 500 segundos. Esse fato se deve a alterações no diâmetro médio das nanopartículas. Possivelmente em 120 e 300s, a banda é o resultado de uma média de tamanhos das AuNPs tornando a absorção larga em detrimento da maior contribuição de partículas maiores. Em 500 segundos o tamanho das partículas está mais uniforme o que resulta numa média de tamanho menor (AI; OMPTON, 2006). Em 616 nm o tamanho aumenta pela agregação das partículas.

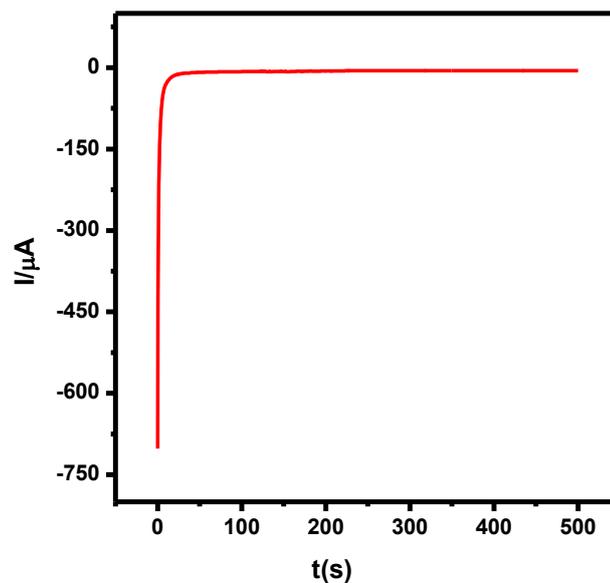
Desta forma, foi selecionado o tempo de 500 segundos para eletrodeposição para as demais avaliações por apresentar maior uniformidade de tamanho da partícula e conseqüentemente uma banda de absorção melhor definida. A amostra ITO antes e depois da adição do nanometal está mostrado na Figura 18. O voltamograma da cronoamperometria de 500s está representado na Figura 19.

Figura 18 - a) Representação do eletrodo ITO sem modificação; b) após eletrodeposição de 500s de NPAu.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Figura 19 - Cronoamperometria da eletrodeposição de NPAu com potencial de -0,3V durante 500s em solução de HAuCl_4 $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

4.2 Espectroscopia no UV-Vis

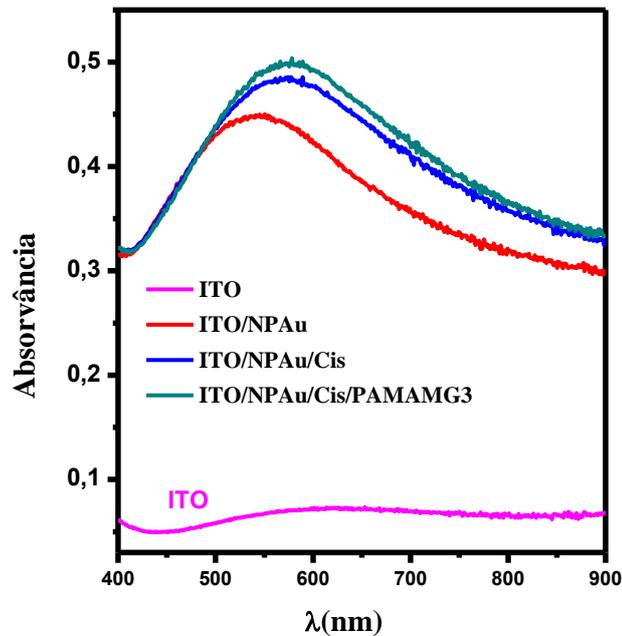
Foram realizadas medidas de espectroscopia de UV-Vis que é uma técnica muito utilizada para validação das etapas de funcionalização do substrato (OZKARTAL, 2019). O fenômeno de LSPR oriundo das partículas de ouro é o referencial nesta caracterização.

O espectro de Figura 20 mostra a transparência do substrato de ITO sem modificação. Mudanças da banda de absorção de LSPR do sistema ITO/Au acontecem e deslocam a absorção. Com adição de cisteamina as NPAu há um deslocamento para o vermelho (557 para 580 nm), somado ao efeito hipercrômico (+8,6%). A cisteamina se liga as nanopartículas de

ouro reduzidas por ligação tiol (S-Au) e possuem o efeito de aproximar as NPAu presentes conferindo maior estabilidade e formando um sistema mais compacto e homogêneo. O resultado dessas mudanças é uma absorção com maiores comprimentos de onda pois houve alterações no ambiente dielétrico local das nanopartículas (BÜRGI, 2015). Com adição de PAMAM o comprimento de onda não se alterou, mas houve um aumento na absorção em 14,2 % indicando que houve modificação.

Resultado similar obteve os estudos de (FENG *et al.*, 2018) com eletrodo de ITO/NPAu funcionalizado com glutatona utilizado para detecção de cátions Pb^{2+} . Feng observou deslocamento da ressonância plasmônica para maiores comprimentos de onda e maior absorção ao realizar a funcionalização do eletrodo de trabalho.

Figura 20 - Caracterização por UV-Vis das modificações no eletrodo de ITO.



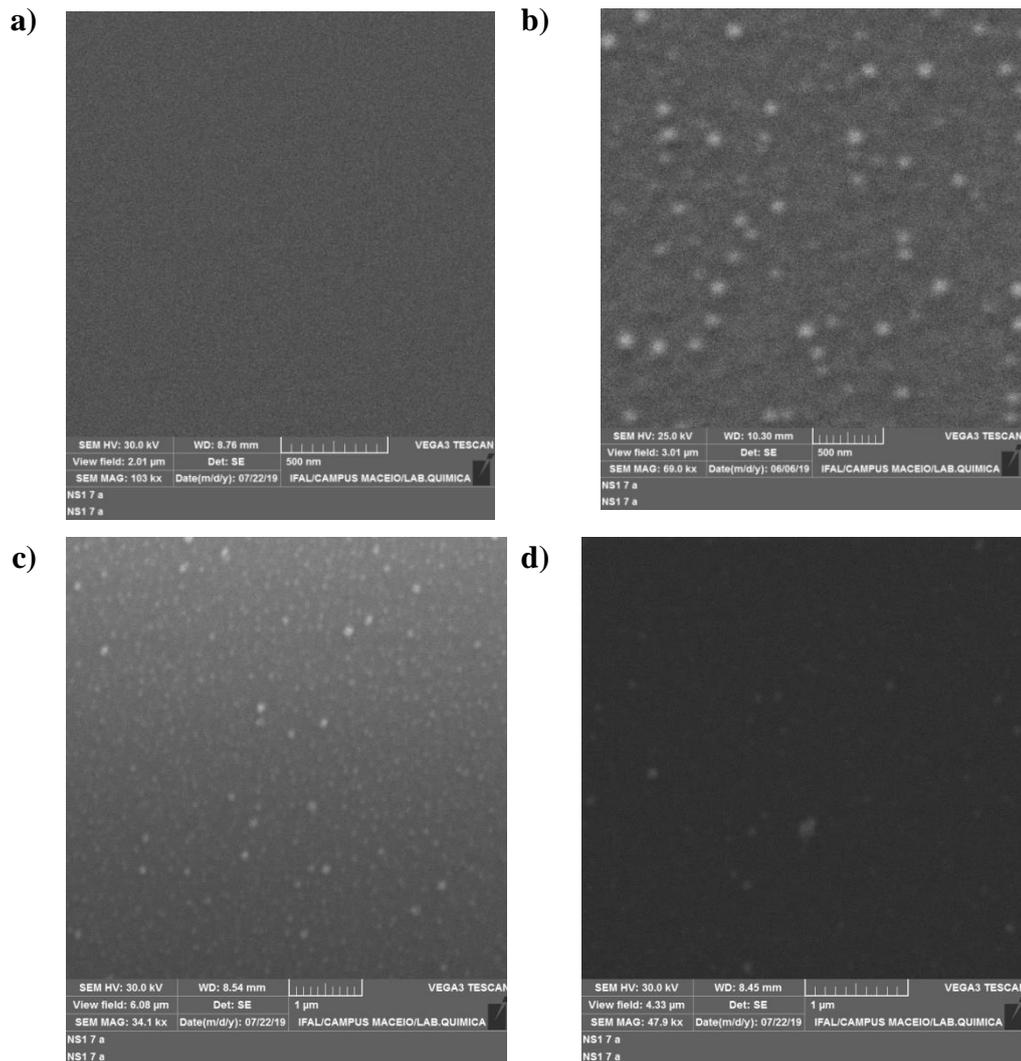
Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

4.3 MEV

A Microscopia Eletrônica de Varredura é uma técnica versátil utilizada para caracterização de microestruturas por produzir imagens de alta resolução da superfície da amostra. MEV é fundamentado na aplicação de um feixe de elétrons que interage com a região de incidência (GIANNATOU *et al.*, 2019). Esta microscopia foi utilizada para caracterização de todas as etapas no processo de funcionalização do eletrodo de trabalho.

A imagem da Figura 21a mostra a superfície de ITO sem modificação. Na Figura 21b, a imagem referente a eletrodeposição, é possível observar nanopartículas de ouro impregnadas na superfície do eletrodo. Essas NPAu estão dispersas na superfície e apresentam aspecto esférico com relativa uniformidade sem indícios de agregação. Este resultado corrobora com a avaliação por UV-Vis referente a uniformidade das partículas.

Figura 21 - Micrografia de MEV a) ITO; b) ITO/NPAu; c) ITO/NPAu/Cis e d) ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3.



Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Com a modificação com cisteamina (Figura 21c), é possível notar que as partículas de ouro estão mais próximas. Essa constatação está de acordo com as características da ligação tiol S-Au. Esse fenômeno de aproximação pode ser explicado pois a cisteamina forma ligações cruzadas com as NPAu. Sabendo-se que a molécula tiolada representar centros básicos de Lewis, essa característica leva a interações ácido base com as nanopartículas

metálicas resultando numa aproximação e produzindo uma ligação covalente S-Au (ALVES M; SAMUEL S.; NOGUEIRA C.; 2012). Outra observação é que a deposição da molécula contendo enxofre forma monocamadas auto-montadas (SAMs) (G. ACRES *et al.*, 2014). Vale salientar que a escala do equipamento foi aumentada devido a propriedade de isolante da cisteamina.

A modificação com PAMAMG3 (Figura 21d) apresenta uma imagem sem definição, com poucas partículas de ouro. Esta imagem indica que a molécula de PAMAMG3 foi imobilizada na superfície de ITO/NPAu/Cis promovendo o recobrimento da superfície e dificultando a observação das NPAu, pela mesma propriedade da cisteamina mencionada no parágrafo anterior.

Zhu e colaboradores (2019) na caracterização do eletrodo de trabalho formado por NPAu/óxido de grafeno reduzido/PAMAMG1/Ferroceno por MEV, foi constatado uma ampla diminuição na resolução das imagens na etapa de adição do dendrímero.

4.4 FTIR

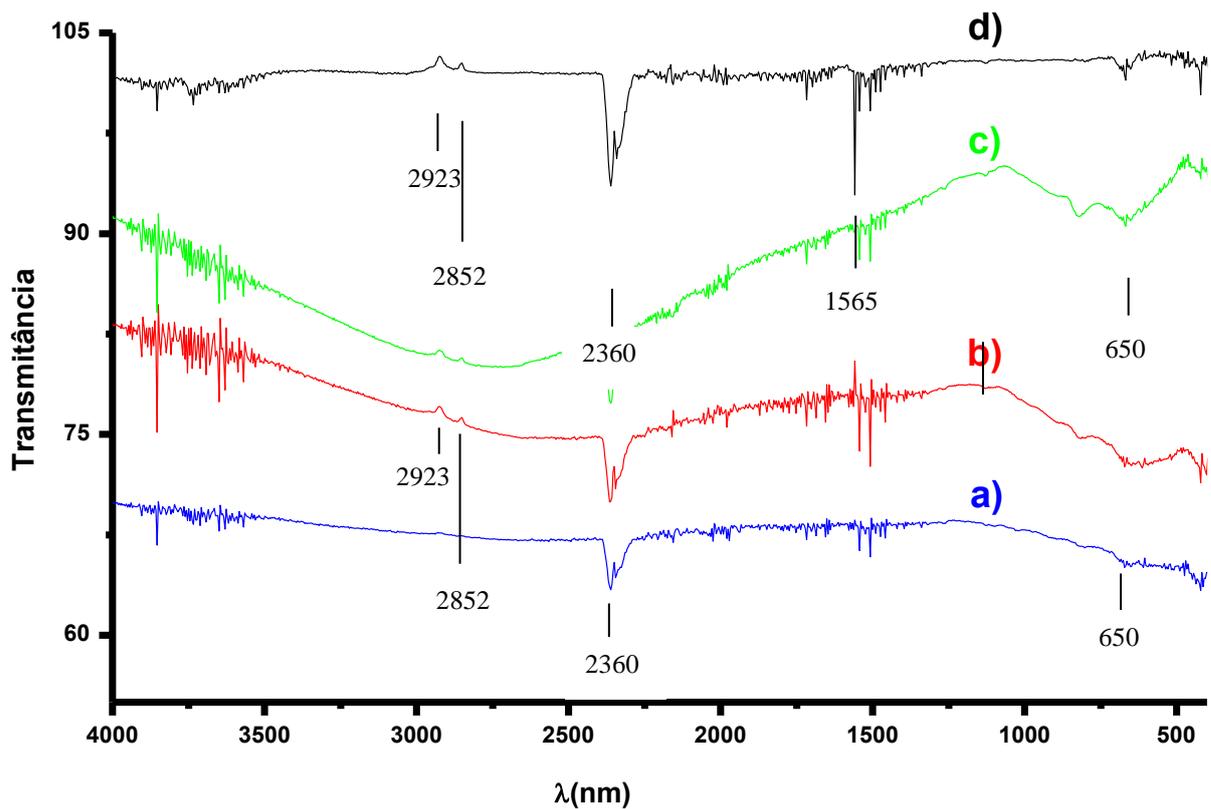
A espectroscopia vibracional na região do infravermelho no modo transmitância foi utilizada para investigar ligações e interações existentes nas diversas etapas de modificação na superfície de ITO numa faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} .

A Figura 22a mostra o espectro da superfície de ITO com banda principal em 2360 cm^{-1} que provavelmente corresponde a ligação O=C=O proveniente do CO_2 da atmosfera adsorvido na superfície. Além desta banda, em 650 cm^{-1} é possível observar uma pequena banda correspondente a as ligações O-In e O-Sn (YADAV *et al.*, 2016).

Não foi possível detectar bandas relacionadas a eletrodeposição de ouro (Fig. 22b) e a modificação com cisteamina (Fig.22c), mesmo com a surgimento de duas bandas em 2923 e 2852 cm^{-1} , pois não há menção desses sinais reportados na literatura. Apesar disto, teoricamente, a ligação S-Au é observada em 1777 ou 1545 cm^{-1} (HARRISON *et al.*, 2017).

O espectro da Figura 22d correspondente a ligação do dendrímeros que apresenta uma banda característica em 1565 cm^{-1} . Essa banda ocorre pelo estiramento da ligação da carbonila (C=O) e pela deformação da ligação NH e CN de amidas do interior da macromolécula (ROLIM; CANCINO; ZUCOLOTTO, 2015).

Figura 22 - Espectro de FTIR para amostras de a) ITO; b) ITO/NPAu; c) ITO/NPAu/Cis e d) ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

4.5 AFM

AFM mede quantitativamente a rugosidade que é definida como a frequência de desvios extremos na distribuição de irregularidades em uma superfície (FERNANDES; PAULIN FILHO; MORELLI, 2011). Para as análises é empregada uma sonda pontiaguda para digitalizar e criar as imagens de superfície. As imagens são geradas através das forças de interação provenientes da sonda e a amostra ao se aproximarem (NOEL *et al.*, 2019). A técnica foi utilizada para estudo da morfologia da superfície ITO e das modificações em estudo.

As imagens de AFM foram registradas em 2D e 3D. A superfície do substrato ITO está apresentada na Figura 23a. e mostra um alto grau de rugosidade. A deposição de NPAu (Figura 23b) resulta numa diminuição da rugosidade média pelo preenchendo das cavidades do ITO, indicado pelo gráfico de amplitude $Z(\text{nm})$. Estas observações estão consoantes aos estudos de Barbara (2016) e também de Dhibi (2014), estudando uma amostra ITO/NPAu com um filme de 5nm de espessura de NPAu utilizando sistema de deposição por feixe de elétrons sob ultra vácuo.

Entretanto, a análise da eletrodeposição foi comprometida, pois na realização do experimento constatou-se que a sonda, ao entrar em contato com o filme de NPAu, formava agregados em sua extremidade, inviabilizando a correta análise. Com esta informação pode-se afirmar que as áreas mais claras do gráfico 2D e os picos mostrados na topografia são decorrentes dessa agregação de nanopartículas. Diante do exposto, é possível afirmar que a eletrodeposição não está firmemente ligada à superfície do material.

A próxima modificação, com cisteamina (Fig. 23c) conferiu estabilidade as NPAu permitindo a análise sem o desprendimento de material de superfície. Pode-se observar maior uniformidade pela Figura 2D e picos com amplitude média de 45 nm. Este resultado está condizente com os resultados de MEV, indicando que a camada de SAM estabiliza as nanopartículas, aproximando-as e conferindo maior interação com a ligação NPAu-Cis.

A ligação de PAMAMG3 na estrutura pode ser confirmada através da imagem da Figura 23d. Os pontos mais claros em 2D representam as maiores estruturas moleculares ($Z=120$ nm) da área analisada indicando a ligação do dendrímeros ao sistema ITO/NPAu/Cis. Em 3D se observa picos arredondados. Essas características de modificação com a molécula carreadora estão em conformidade com a imagem de AFM do trabalho de Spyropoulos-antonakakis (2015) ao imobilizar fisicamente PAMAMG0 ($2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) na superfície de uma lâmina de vidro comum (Figura 24). De forma similar, tanto o trabalho com PAMAMG0 quanto este em estudo apresentaram 4 picos bem definidos.

Figura 23 - Micrografias AFM 2D e 3D das amostras a) ITO; b) ITO/NPAu; c) ITO/NPAu/Cis e d) ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3.

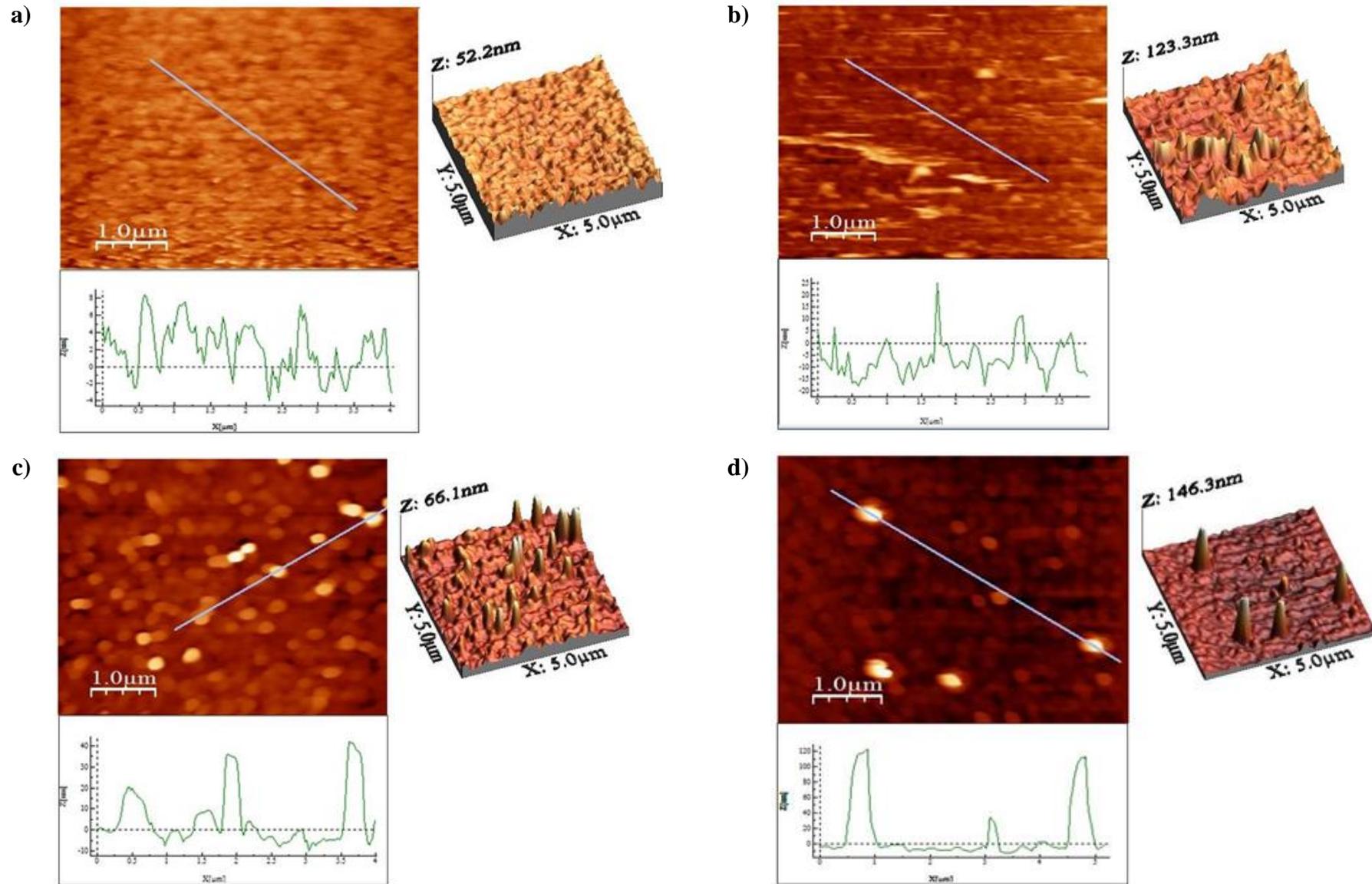
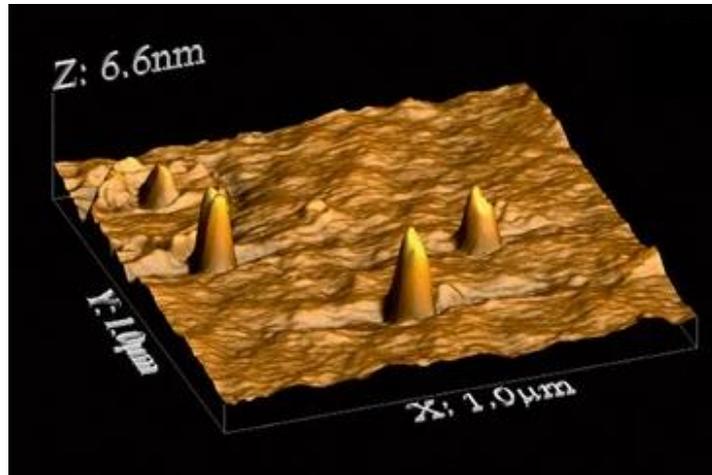


Figura 24 - Micrografia AFM de PAMAMG0 $2,50 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ depositado em uma lâmina de vidro comum.



Fonte: SPYROPOULOS-ANTONAKAK, 2015.

4.6. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

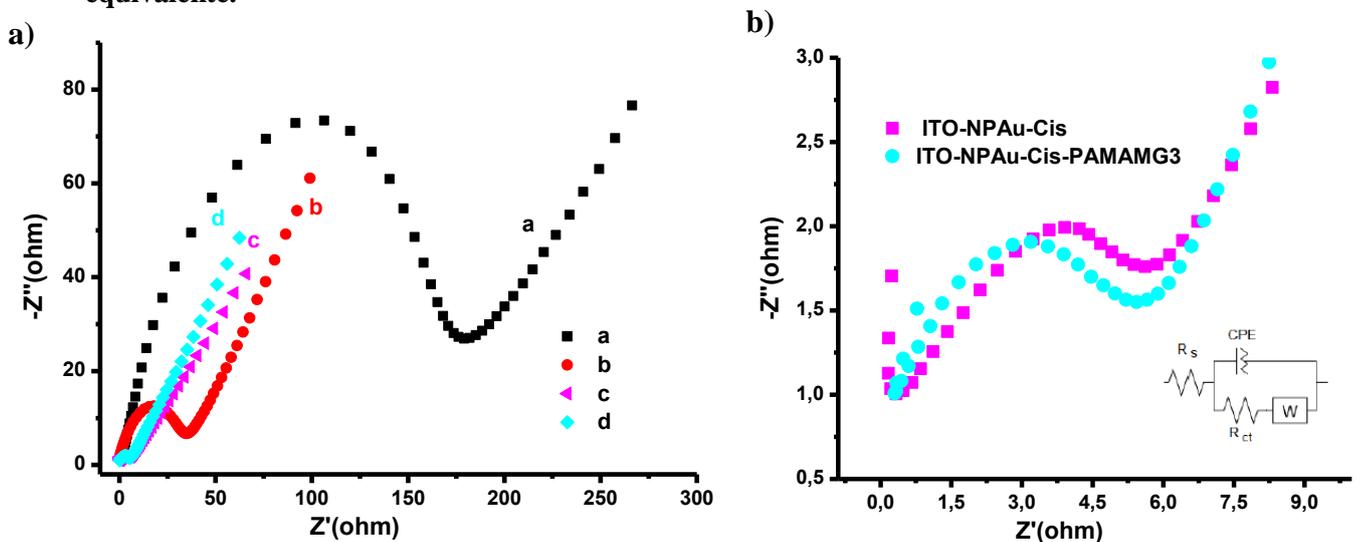
Recorreu-se a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (do inglês – electrochemical impedance spectroscopy, ESI) para monitorar as modificações. Para preservar a área das análises utilizou-se o mesmo ITO para garantir que a mesma área superficial fosse apreciada. As medidas aconteceram a partir de uma perturbação inicial (aplicada) com a resposta do eletrodo, pela medida da mudança de fase dos componentes de corrente, voltagem e amplitude (STANKEVIČIUS *et al.*, 2019).

A Figura 25a apresenta o diagrama de Nyquist representado pelo plano complexo real (Z') versus imaginário (Z'') que denotam a presença de um semicírculo em altas frequências em que o diâmetro do semicírculo se refere a resistência de transferência de carga (R_t). Em baixas frequências, a técnica traz informações do mecanismo de transporte de massa por difusão. Pelo Nyquist é observado um ângulo de 45° na região do fim do semicírculo com o início da reta o que corresponde à difusão semi-infinita representado pela impedância de Waburg (Z_w). A região linear no fim do Nyquist (lado direito) está associada a uma resposta capacitiva (CARVALHO; ANDRADE, 2006). O circuito equivalente está representado na Figura 25b (inset) de acordo com (DE LIMA FRANÇA *et al.*, 2016).

As medidas foram registradas para ITO, ITO/NPAu, ITO/NPAu-Cis e ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3 em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo 5 x 10⁻³ mol L⁻¹ de Fe(CN)₆^{3-/4-} como par redox.

Os resultados mostram que a resistência (R_t) diminui a medida que as modificações acontecem segundo a ordem ITO < ITO/NPAu < ITO/NPAu/Cis < ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3, conforme a Tabela 4. Os valores R_t para ITO sem modificação, estão de acordo com a literatura, provando desta forma que a superfície está totalmente limpa (LIU et al., 2017; SUN *et al.*, 2017). A diminuição da resistência com a eletrodeposição já era prevista, pois as nanopartículas de metais aumentam a área eletroativa da superfície do óxido e são excelentes condutores, facilitando a passagem de elétrons além de diminuir a rugosidade, como mostrado por AFM, o que reflete na diminuição de R_t . Resultado condizente com a eletrodeposição de nanopartículas de ouro no trabalho de Chinnadayala,(2019).

Figura 25 - a) Diagrama Nyquist para as modificações no eletrodo ITO; b) Ampliação do diagrama para os sistemas ITO/NPAu/Cis e ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3. Inset: circuito equivalente.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

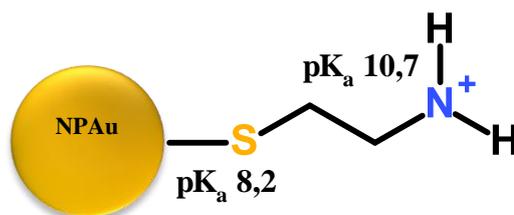
Tabela 4 - Valores de R_t e R_s para a caracterização por ESI.

Parâmetros	Modificação			
	ITO	ITO/NPAu	ITO/NPAu/Cis	ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3
R_t (ohm)	178,05	34,90	5,18	5,39
R_s (Ohm)	59,85	52,12	55,90	57,2

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

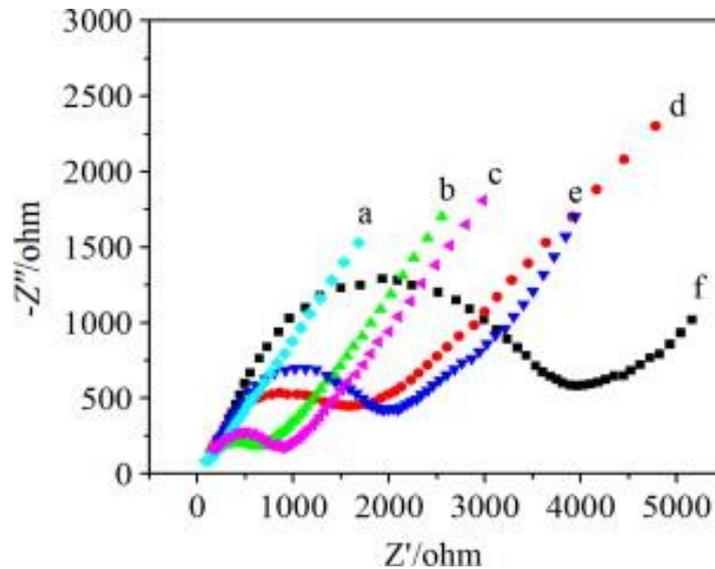
Entretanto, os resultados seguintes apresentaram um padrão diferente do inicial. Tanto na modificação com cisteamina quanto na adição da macromolécula, a resistência diminuiu de 34,90 para 5,18 e depois 5,39 Ω , respectivamente (Tabela 4). As últimas adições apresentaram valores muito pequenos, sendo necessário a ampliação do Nyquist (Figura 25b). Esse resultado está relacionado a carga positiva presente na estrutura da molécula. No pH em estudo (pH 7,4), apesar de não ajustado com tampão nesse experimento, é necessário salientar que a molécula possui dois valores de pKa's, 8,2 para o tiol e 10,75 para a amina (Figura 26). Desta forma, nesta modificação, o enxofre se liga ao ouro, mas a amina permanece com carga positiva facilitando a migração de elétrons com a sonda que possui carga negativa. Zhang e colaboradores (2014), ao analisar os resultados por ESI, para uma de suas modificações, observou o perfil de Nyquist similar ao estudo aqui apresentado. As modificações em eletrodo de ouro foram com cisteamina, glucose oxidase e quitosa, na sequência descrita. A ligação tiol da cisteamina com eletrodo de ouro foi relatado como de baixa resistência, apesar do valor não mencionado. As demais modificações seguiram ordem crescente de R_t , Figura 27.

Figura 26 - Molécula de cisteamina em pH 7,40 com seus respectivos pKa's ligada a nanopartículas de ouro.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Figura 27 - Diagrama Nyquist para a caracterização do sistema a) eletrodo de ouro/cis; b) eletrodo de ouro/cis/glucose oxidase; c-f) eletrodo de ouro/ cis/glucose oxidase/quitosana em diferentes espessuras de ouro.



Fonte: ZHANG, 2014.

A modificação com PAMAMG3, embora se espere um aumento em R_t , por ser uma macromolécula que recobre a superfície, o valor permaneceu praticamente estável (Tabela 4). A prevalência de baixa resistividade está relacionado ao fato da interação entre as cargas positivas presentes nas aminas do carreador (em pH 7,4) e a carga aniônica da sonda redox (SILVA, 2018).

Apesar da interação eletrostática de PAMAMG3 com a sonda $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, uma possível solução seria a mudança de pH para fornecer um meio com carga neutra e assim evitar a atração de cargas. Entretanto, esta não seria a melhor escolha para a avaliação deste parâmetro visto que a análise por impedância depende da dupla camada que varia com o pH no eletrodo ITO, pois os grupos óxidos da superfície sofrem modificações com mudanças de pH e assim os valores de R_t ficam comprometidos, não mensurando as modificações mas sim, uma contribuição da adição de moléculas, somadas as modificações de pH na superfície do eletrodo (FOLKERTSMA *et al.*, 2018).

4.7 Estudos por VC

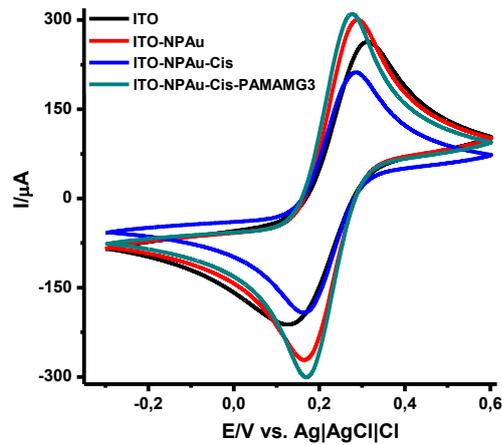
A solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ foi utilizada como sonda eletroquímica para avaliar a reversibilidade da reação na superfície do eletrodo com as modificações pois a área resultante da eletrodeposição metálica é determinada com precisão (GROCHOWSKA *et al.*, 2015).

A Figura 28 representa a VC de cada modificação no ITO. Observa-se, de maneira geral, que as curvas mostram um aspecto típico de oxido-redução com reversibilidade da sonda $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, resultado de uma perturbação na cinética de transferência de elétrons. A modificação com NPAu provocou aumento de 13,51% (Tabela 5) da área eletroativa em relação ao ITO sem modificação. Este resultado está condizente com as propriedades das nanopartículas metálicas que aumentam a área eletroativa (GROCHOWSKA *et al.*, 2015).

Alguns parâmetros como correntes geradas nos processos de oxidorredução (corrente de pico anódico (E_a) e catódico (E_p)), que estão representadas no voltamograma, são cruciais para determinar o comportamento redox. Para uma reação reversível, a diferença entre os picos mencionados (ΔE , potencial de pico) deve ser próximo a $59/n$ mV, em que n é o número de elétrons transferido no processo. A separação do potencial de ΔE diminuiu de 0,166 para 0,117 V, confirmando que a reversibilidade aumenta quando há o contato da solução com as nanopartículas metálicas.

Com a ligação da cisteamina, a área apresenta um decréscimo de 30,16% pela formação das camadas auto organizadas que diminuem o contato da sonda com a superfície dos nano metais tendo um comportamento de isolante. O aumento da área com PAMAMG3 deve-se ao fato da interação eletrostática deste com a sonda, fato já mencionado nos resultados de impedância.

Figura 28 - Voltametria Cíclica das modificações utilizando a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Tabela 5 - Valores da área eletroativa e ΔE_p para as modificações.

Modificação	Área (10^{-3})	Alteração da área (%)	ΔE (V)
ITO	2,22	-	0,166
ITO/NPAu	2,52	+ 13,51	0,117
ITO/NPAu/Cis	1,76	- 30,16	0,112
ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3	2,55	+ 44,89	0,097

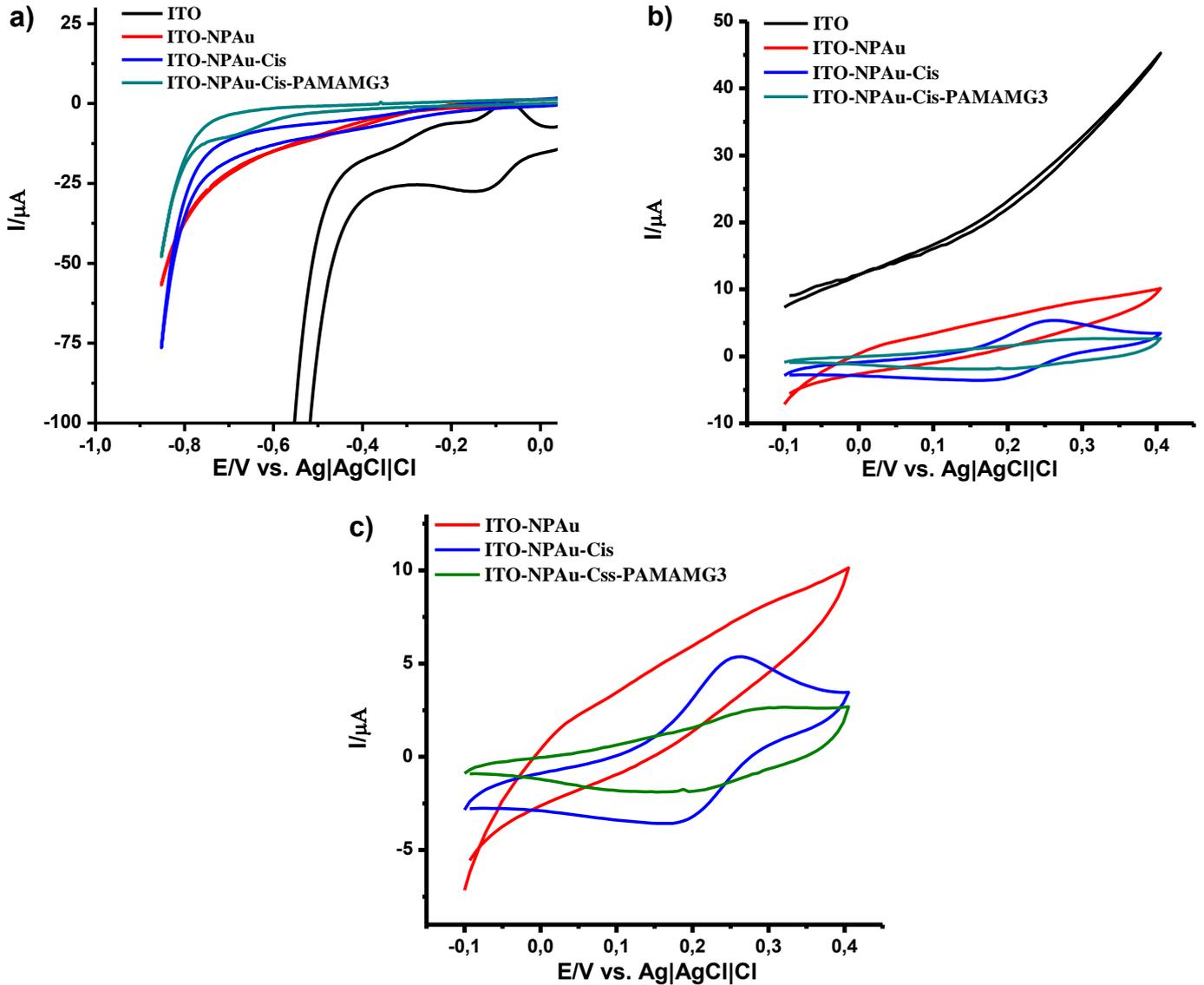
Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Adicionalmente, realizou-se o estudo de VC com tampão BR 7,4. Os estudos por voltametria cíclica das modificações nestas condições estão classificados em duas regiões: a faixa da redução (Figura 29a) e a da oxidação (Figura 9b). Na região anódica (-0,8 a 0,0V), houve aumento da janela de potencial com adição de NPAu. Resultado semelhante com o trabalho de Alessio e colaboradores (ALESSIO *et al.*, 2011).

A Figura 29c, que nada mais é que uma ampliação de Figura 29b, mostra que as nanopartículas promovem aumento na área eletroativa como já mencionado. Perfis similares voltamétricos de ITO e ITO/NPAu foram publicados por Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.*, 2013b). Na modificação ITO/NPAu/Cis surge um par redox, sendo E_{a-} +0,25V e E_{c-} +0,18V. Ao se ligar as aminas da molécula ancorada, PAMAMG3 diminui a área eletroativa do sistema e também minimiza a reversibilidade da reação (Figura 29c). Resultado oposto das análises por impedância e VC, ambos utilizando a sonda $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, em que o PAMAM com carga positiva interage com a carga negativa da sonda. Como neste experimento utilizamos um

meio neutro, o dendrímero pôde ser avaliado corretamente, de forma a não sofre interações eletrostáticas ocasionadas pelo pH do meio, resultando numa diminuição da área eletroativa e também da reversibilidade.

Figura 29 - Perfil voltamétrico das modificações na a) redução e b) oxidação; c) imagem ampliada da região positiva.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

4.9 Avaliação da interação da β -lapachona, 6CN10 e LQM10 com PAMAMG3 por VPD

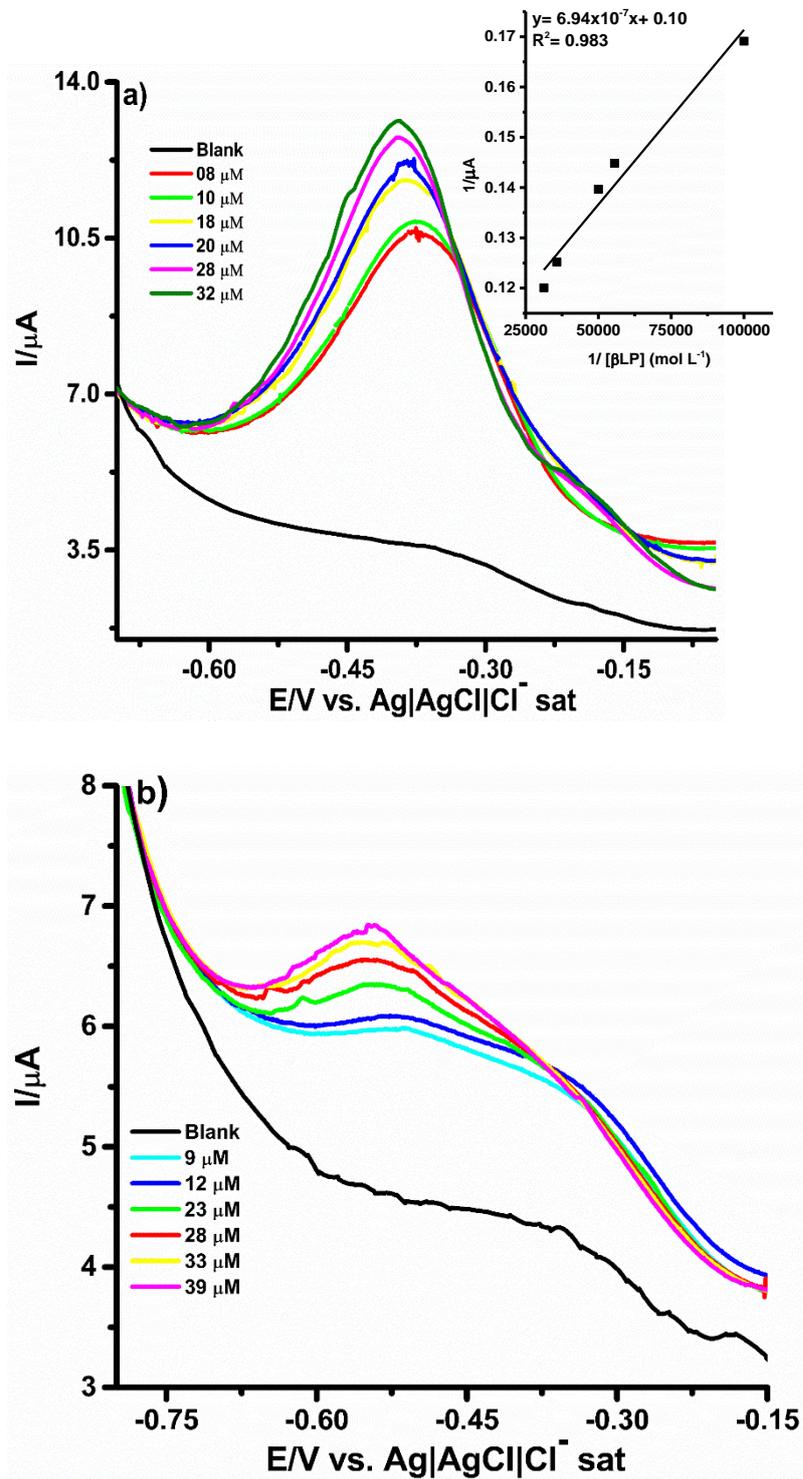
Com o eletrodo caracterizado e pronto para uso, foi avaliada por VPD a interação das três substâncias com PAMAMG3 em tampão pH 7,4 com 20% de etanol, sendo duas com sinais característicos na redução (β -lapachona e 6CN10) e uma outra na região anódica (LQM10).

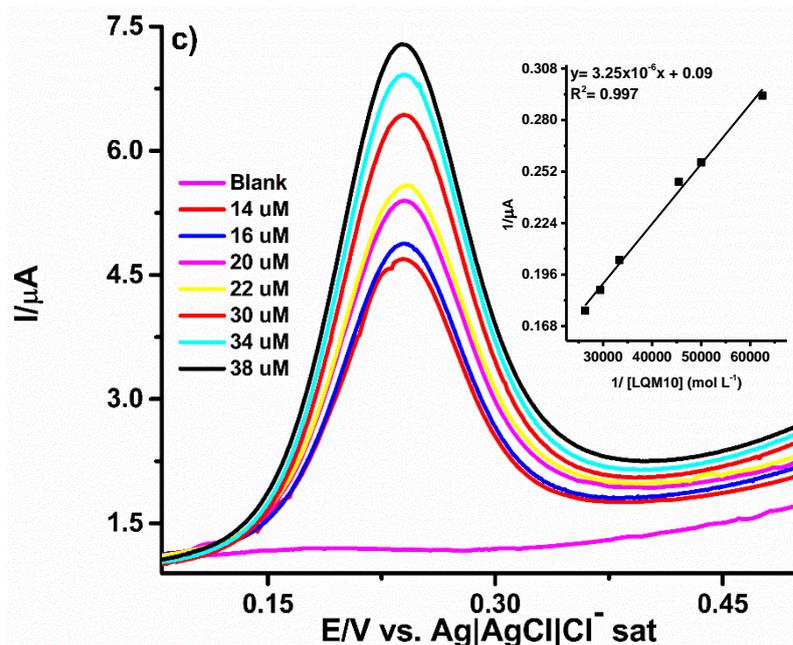
A interação da β LP com PAMAM (Fig. 30a) mostra um aumento significativo de sinal com as sucessivas adições de alíquotas de β LP (0-32 μ M) com excelente correlação linear ($R^2= 0,996$), indicando interação e formação do complexo β LP-PAMAMG3 com Limite de detecção (LD) de $1,94 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e Limite de quantificação (LQ) de $6,46 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O voltamograma apresenta Epc de -0,37V, região característica pela redução das quinonas, com posterior deslocamento máximo (último ponto do voltamograma) para -0,39V.

Esse deslocamento provavelmente está relacionado à migração para regiões mais internas de determinada quantidade da molécula no arcabouço do dendrímero, visto que esse dendrímero possui ramificações e cavidades internas hidrofóbicas que contribuem para interações com moléculas pouco solúveis em meio aquoso LP (TAGHAVI POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014).

Estudos semelhantes deste sistema são os de Candido e colaboradores (*CANDIDO et al.*, 2018) que realizaram a avaliação da interação de β LP com PAMAMG3 em sistema convencional com eletrodo de carbono vítreo utilizando VC em pH 7,00 com concentração de β LP fixa e com adições de PAMAMG3. Os resultados evidenciam que β LP foi encapsulada por PAMAMG3 e sinal eletroquímico em -0,3V com deslocamento para regiões anódicas (valor não informado), com a adição de alíquotas. O sinal de β LP nesta tese, está ainda mais deslocado para regiões catódicas o que é indício de uma interação maior com PAMAM.

A interação de PAMAMG3 com 6CN10 apresenta sinal característico para grupos nitro em -0.5V (Figuraa 30b), indicando encapsulação da molécula pelo dendrímeros. Apesar da formação do complexo PAMAM-6CN10 não foi possível obter linearidade do sistema pois há formação de dois sistemas (picos em -0,50V e -0,32V) que impossibilitam determinar a linha de base do sinal analítico.

Figura 30 - VPD das interações de a) β -lapachona; b) 6CN10 e c) LQM10 com PAMAMG3.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

O perfil de VPD de LQM ($0\text{-}38 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) com aumento de sinal com boa correlação linear ($R^2 = 0,999$), porém sem deslocamento de potencial. O mesmo apresentou LD de $3,14 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e LQ de $10,46 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Resultado indica que PAMAMG3 encapsulou a molécula promovendo seu aumento de solubilidade sendo possível ser detectada no eletrodo de ITO.

Infelizmente ainda não há dados na literatura em relação a interação desta molécula com carreadores e ainda não se sabe qual é o grupo responsável pelo sinal de oxidação. Contudo, vê-se claramente um sistema hóspede-hospedeiro clássico indicando que PAMAMG3 pode ser utilizado como carreador desta substância.

A partir das curvas construídas corrente *versus* concentração (Figura 30, *inset*) foi possível calcular o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para β LP e LQM10. LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado. Por sua vez, LQ é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão. Ambos os parâmetros são obtidos pelas Equações 12 e 13.

$$LD = \frac{3 \times S_b}{b} \quad (\text{Eq. 12})$$

$$LQ = \frac{10 \times S_b}{b} \quad (\text{Eq. 13})$$

S_b é o desvio padrão médio e o termo “b” refere-se ao coeficiente angular da reta (SKOOG, WEST, HOLLER, 2006).

Os valores calculados de LD foram $1,94 \times 10^{-6}$ e $3,14 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e LQ de $6,46 \times 10^{-6}$ e $10,46 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para β LP e LQM10, respectivamente. Desta forma, o sistema avaliado apresentou boa sensibilidade. Os valores dos parâmetros analíticos (LD e LQ) para β LP comparados com os trabalhos de Cândido et al. (2018) foram próximos, indicando que a plataforma de análise, apresentada neste trabalho, pode ser uma boa alternativa frente a análises de interação com eletrodos de trabalho tradicionais.

4.9.1 Determinação da Constante de associação (K_f)

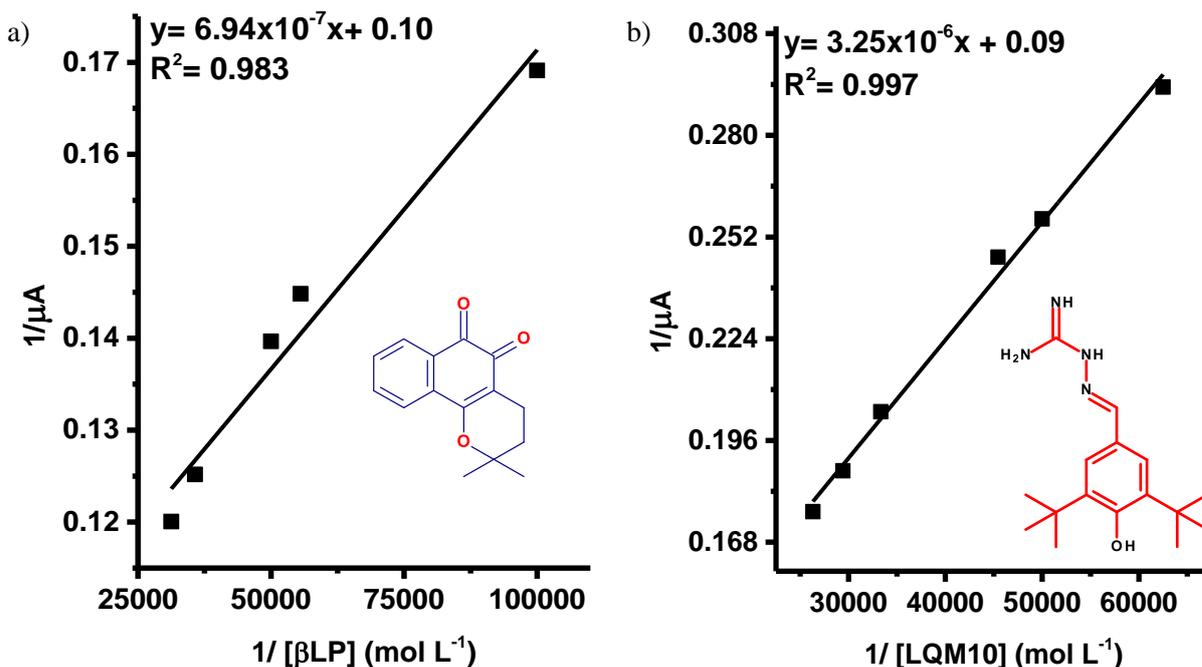
Os 32 grupos funcionais presentes na superfície do PAMAMG3 são um indicativo que a estequiometria de formação do complexo pode ser diferente de 1:1 e que essa proporção afete diretamente a constante de formação. Desta forma, recorreu-se a equação de Scatchard-Klotz (Equação 14) para esta avaliação.

$$\frac{1}{\Delta I} = \frac{1}{K[\text{ligante}]} + \frac{1}{n} \quad (\text{Eq. 14})$$

ΔI é a diferença de corrente ($I_p - I_m$) gerada pela molécula avaliada em diferentes concentrações. I_p é a corrente referente à substância complexada e I_m a corrente da substância livre. K é a constante de equilíbrio do complexo formado e $[\text{ligante}]$, a concentração do ligante. O número de sítios ativos em que o fármaco pode se ligar ao dendrímeros é dado por n . Para esta avaliação, foi atribuído o valor de zero para I_p , pois a área modificada com PAMAMG3 (I_m) é diferente da área ITO/NPAu-Cis (I_p).

A razão entre $1/K[\text{ligante}]$ é o coeficiente angular da reta e $1/n$ o coeficiente linear. As curvas analíticas para determinação da constante estão apresentadas na Figura 31. Foram obtidos os valores de K $1,42 \times 10^6$ mol L⁻¹ ($R^2 = 0,983$) e $3,33 \times 10^5$ mol L⁻¹ ($R^2 = 0,997$) para β LP e LQM10, respectivamente. O número de sítios de ligação foi 9,81 para o derivado de quinona e 10,67 para o derivado de guanilhidrazona.

Figura 31 - Curva analítica gerada através de valores de concentração e corrente de VPD de a) β LP-PAMAMG3; b) LQM10-PAMAMG3.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Candido e colaboradores (2018) relatou K_f no valor de $2,59 \times 10^2 \text{ mol L}^{-1}$ para βLP . De forma comparativa, o valor da constante apresentado neste trabalho foi maior 10^4 maior para a molécula avaliada. Vale ressaltar que as medidas do trabalho de Cândido foram por VC. Como esta técnica é menos sensível que VPD, possivelmente contribua para diferenças no valor da constante. Outra possibilidade é que a molécula de PAMAM esteja mais estável na superfície do ITO possibilitando uma maior interação.

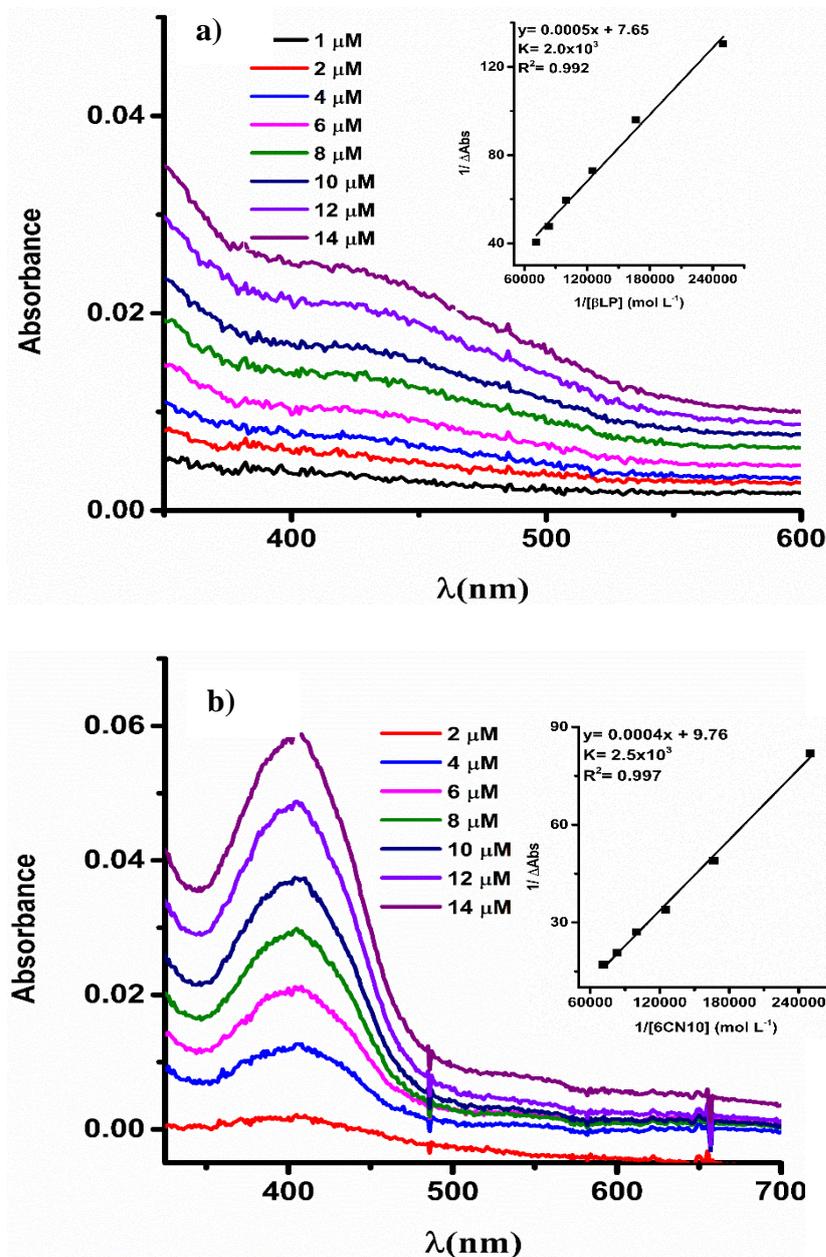
4.10 - Avaliação da interação da β -lapachona, 6CN10 e LQM10 com PAMAMG3 por UV-Vis

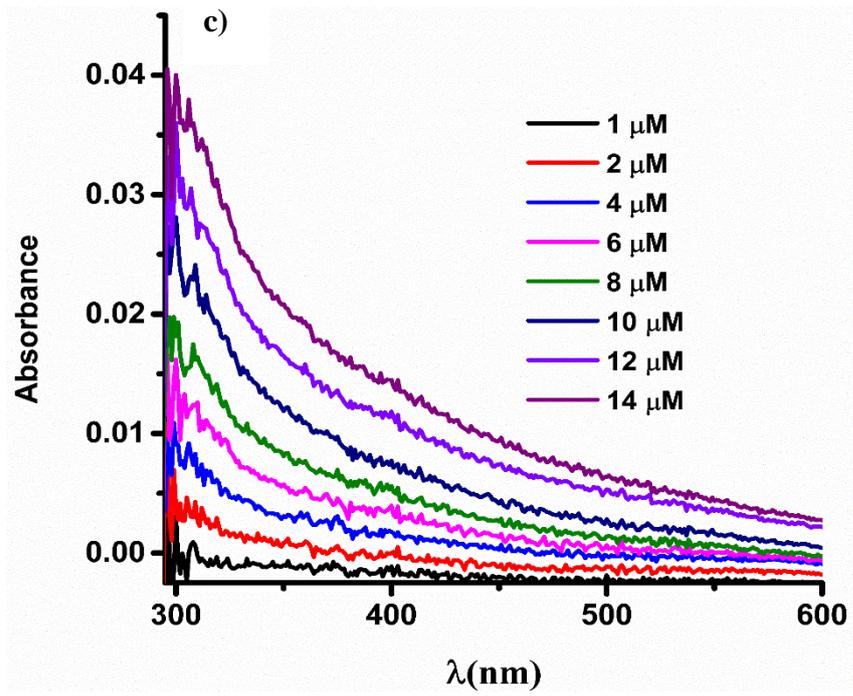
Os espectros de UV-Vis para os complexos das substâncias com PAMAMG3 no eletrodo ITO estão mostrados na Figura 32. O complexo com βLP apresenta banda de absorção próximo a 430 nm devido as transições $n \rightarrow \pi^*$ da ligação $\text{C}=\text{O}$ (Figura 32a). A ligação $\text{N}=\text{N}$ com transição $n \rightarrow \pi^*$, do composto 6CN10 (Figura 32b) complexado com a macromolécula é a responsável pela absorção em 403 nm (WORMELL, 2013). Não foi possível obter bandas definidas para complexo contendo LQM10 (Fig. 32c), o que indica que esta técnica é ineficaz para avaliação da interação LQM10-PAMAMG3. Este resultado reforça a versatilidade deste sistema, moléculas que apresentam dificuldade de resposta por vias eletroquímicas e espectroscópicas, podem superar esta barreira ser avaliadas com apenas uma dessas técnicas, tornando o sistema abrangente. Foi possível construir curvas analíticas

com os dois primeiros compostos mencionados com boa correlação linear, $R^2 = 0,996$ e $R^2 = 0,998$ para β LP e 6CN10, respectivamente. O valor de K , calculado através da eq. 14 (substituindo corrente por absorvância) foi de $2,00 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ para β LP and $2,50 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ para 6CN10, conforme gráficos inset 32a e 32b.

Este resultado indica que este eletrodo ITO pode ser utilizado para análises quantitativas e qualitativas de técnicas espectroscópicas e eletroquímicas.

Figura 32 - UV-Vis das interações de a) β -lapachona; b) 6CN10 e c) LQM10 com PAMAMG3.





Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

5. CONCLUSÃO

O sistema ITO/NPAu/Cis/PAMAMG3 foi caracterizado por UV-Vis, MEV, FTIR, AFM, Impedância eletroquímica e VC. O tempo de deposição das NPAu foi otimizado para 500s pela técnica de UV-Vis. Ainda por esta técnica, foi visto que as nanopartículas possuem tamanho médio de 100 nm, o que foi confirmado por MEV. Além disto, a microscopia eletrônica de varredura mostrou que as nanopartículas possuem forma esférica e não apresentam agregados. As imagens de microscopia mostraram que a adição de cisteína promove uma aproximação e garante maior estabilidade as nanopartículas, o que comprova a ligação S-Au.

Por FTIR é possível observar a presença de PAMAMG3. AFM confirmou que há uma estabilização das nanopartículas com a ligação por cisteína e também possibilitou a confirmação da presença do carreador. As técnicas ESI e VC foram utilizadas com a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-4-}$ o que gerou dados inconclusivos, pois existe atração eletrostática entre o dendrímero e a sonda. Eletroquimicamente foi possível determinar que as modificações em ITO aumentam a janela de potencial.

Por fim, o eletrodo construído mostrou bom desempenho na avaliação eletroquímica da interação entre BLP e LQM10 registrando constantes de formação $1,42 \times 10^6$ e $3,33 \times 10^6$ mol L⁻¹, respectivamente, com excelentes correlações lineares. Utilizando UV-Vis, a constante foi de $2,0 \times 10^3$ mol L⁻¹ para βLP e $2,5 \times 10^3$ mol L⁻¹ para 6CN10.

Deste modo é possível afirmar que o eletrodo modificado é uma boa plataforma para avaliação da interação entre PAMAMG3 e moléculas passíveis de encapsulação, pois como esse processo se dá na superfície do ITO, possibilita a obtenção de dados eletroquímicos e espectroscópicos num mesmo sistema.

6. PERSPECTIVAS

- Avaliar a eletrodeposição de NPAu/Cis em uma única etapa;
- Avaliar a interação de PAMAMG3 com outras moléculas com potencial farmacológico no eletrodo construído.

7. REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A.; MOHAMMED, A. Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. **International Conference on Hydraulics and Pneumatics**, n. January, p. 1–9, 2019.
- ABRAHAM, I. et al. Recent Advances in 1,4-Benzoquinone Chemistry. v. 22, n. 3, p. 1–37, 2011.
- AI, X. D.; OMPTON, R. G. C. Direct Electrodeposition of Gold Nanoparticles onto Indium Tin Oxide Film Coated Glass: Application to the Detection of Arsenic(III). **Analytical Sciences**, v. 22, n. April, p. 3212, 2006.
- ALESSIO, P. et al. Combining SERRS and electrochemistry to characterize sensors based on biomembrane mimetic models formed by phospholipids. **RSC Advances**, v. 1, n. 2, p. 211–218, 2011.
- ALMEIDA, A. K. A. **Síntese e caracterização Espectroeletróquímica de Derivados Eletrocromáticos e Fluorescentes de Polipirrol e Politiofeno**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2016.
- ALVES MELO JR, M.; SAMUEL SOARES SANTOS, L.; DO CARMO GONÇALVES ANA FLÁVIA NOGUEIRA, M. Preparación de nanopartículas de plata y oro: un método simple para la introducción de la nanociencia en el laboratorio de Ensino. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.
- ANDO, T. High-speed atomic force microscopy and its future prospects. **Biophysical Reviews**, v. 10, n. 2, p. 285–292, 2018.
- ANTONIO-ANTONIO, F. et al. PAMAM dendron-grafted poly(vinyl alcohol) via click reaction. **Materials Chemistry and Physics**, v. 275, p. 125215, 1 jan. 2022.
- AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. **Drug Targeting in Anticancer Chemotherapy**. [s.l.: s.n.].
- AYDIN, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. **Indium tin oxide (ITO): A promising material in biosensing technology** TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2017.
- AZEVEDO DE BRITO, W. et al. Development and Validation of HPLC-DAD and UHPLC-

DAD Methods for the Simultaneous Determination of Guanylhydrazone Derivatives Employing a Factorial Design. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 9, p. 1–15, 2017.

BANISHEYKHOLESAMI, F.; HOSSEINI, M.; NAJAFPOUR DARZI, G. Design of PAMAM grafted chitosan dendrimers biosorbent for removal of anionic dyes: Adsorption isotherms, kinetics and thermodynamics studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 306–316, 30 abr. 2021.

BANSOD, B. K. et al. **A review on various electrochemical techniques for heavy metal ions detection with different sensing platforms** *Biosensors and Bioelectronics*, 2017.

BARBARA BALLARIN, DAVIDE BARRECA, MARIA CRISTINACASSANI, G. Goldnanoparticles-decoratedfluoroalkylsilanenano-assembliesforelectrocatalyticapplications. **Applied Surface Science**, p. 1–19, 2016.

BOYD, B. J. et al. Successful oral delivery of poorly water-soluble drugs both depends on the intraluminal behavior of drugs and of appropriate advanced drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 137, p. 104967, 1 set. 2019.

BRETT, A. M.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica, Princípios, Métodos e Aplicações**. New York: Oxford University Press Inc., 1996.

BÜRGI, T. Properties of the gold-sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters. **Nanoscale**, v. 7, n. 38, p. 15553–15567, 2015.

BUTNARASU, C. et al. Interaction of squaraine dyes with proteins: Looking for more efficient fluorescent turn-on probes. **Dyes and Pigments**, v. 184, p. 108873, 1 jan. 2021.

BYADAGI, K. et al. Investigation of binding behaviour of procainamide hydrochloride with human serum albumin using synchronous, 3D fluorescence and circular dichroism. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 2, p. 103–109, 2017.

CANDIDO, A. C. L. et al. Electrochemical and spectroscopic characterization of the interaction between β -lapachone and PAMAM derivatives immobilized on surface electrodes. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 22, n. 5, p. 1581–1590, 2018.

CÂNDIDO, A. C. L. **ESTUDO ELETROQUÍMICO DA INTERAÇÃO DE QUINONA DE INTERESSE BIOLÓGICO E DENDRÍMERO PAMAM DE 2º E 3º GERAÇÃO**. [s.l.] UFAL, 2017.

CARVALHO, L. A. DE; ANDRADE, A. R. DE. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA APLICADA AO ESTUDO DAS REAÇÕES HETEROGÊNEAS EM ÂNODOS DIMENSIONALMENTE ESTÁVEIS. **Química Nova**, v. 29, p. 796–804, 2006.

CARVALHO, L. A. DE; ANDRADE, A. R. DE; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796–804, jul. 2006.

CASSAGNES, L. E. et al. Oxidative stress and neurodegeneration: The possible contribution of quinone reductase 2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 120, p. 56–61, 20 maio 2018.

CHANDRA, S. et al. An Undergraduate-Level Electrochemical Investigation of Gold Nanoparticles-Modified Physically Small Carbon Electrodes. **World Journal of Chemical Education**, v. 4, n. 5, p. 93–100, 2016.

CHEN, Z. et al. Fabrication of highly transparent and conductive indium-tin oxide thin films with a high figure of merit via solution processing. **Langmuir**, v. 29, n. 45, p. 13836–13842, 2013.

CHENG, W. et al. Interaction mechanism between resveratrol and ovalbumin based on fluorescence spectroscopy and molecular dynamic simulation. **LWT**, v. 146, p. 111455, 1 jul. 2021.

CHENG, Y. et al. Dendrimers as drug carriers: Applications in different routes of drug administration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008.

CHI, Q. et al. Interactions of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid with serum albumins by native mass spectrometry, fluorescence and molecular docking. **Chemosphere**, v. 198, p. 442–449, 1 maio 2018.

CHIEN, S. C. et al. Naturally occurring anthraquinones: Chemistry and therapeutic potential in autoimmune diabetes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. Figure 1, 2015.

CHINNADAYYALA, S. R. et al. Electrochemical impedance characterization of cell growth on reduced graphene oxide-gold nanoparticles electrodeposited on indium tin oxide electrodes. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 9, n. 2, 2019.

CIUCCI, F. **Modeling electrochemical impedance spectroscopy** *Current Opinion in Electrochemistry*, 2019.

COLOMBO, R. N. P. et al. Porous polymeric templates on ITO prepared by breath figure method for gold electrodeposition. *Electrochimica Acta*, 2015.

COSTENTIN, C.; SAVÉANT, J. M. Ohmic drop correction in electrochemical techniques. Multiple potential step chronoamperometry at the test bench. *Energy Storage Materials*, v. 24, p. 1–3, 1 jan. 2020.

CRESPI, F. Differential Pulse Voltammetry: Evolution of an In Vivo Methodology and New Chemical Entries, A Short Review. *Journal of New Developments in Chemistry*, v. 2, n. 4, p. 20–28, 2020.

CZARNIK-KWAŚNIAK, J. et al. Glucoheptoamidated polyamidoamine PAMAM G3 dendrimer as a vehicle for succinate linked doxorubicin; enhanced toxicity of DOX against grade IV glioblastoma U-118 MG cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 55, p. 101424, 1 fev. 2020.

DANTAS, N. et al. Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpress NorA efflux pump. *Chemico-Biological Interactions*, 2018.

DE LIMA FRANÇA, C. C. et al. The electrochemical behavior of core-shell CdSe/CdS magic-sized quantum dots linked to cyclodextrin for studies of the encapsulation of bioactive compounds. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 20, n. 9, p. 2533–2540, 2016.

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Quimica Nova*, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

DHIBI, O. et al. Effect of thin gold interlayer on the electrical and dielectrical behaviors of ITO/MEH-PPV/Al structures. *Microelectronic Engineering*, v. 129, n. C, p. 24–30, 2014.

DODANGEH, M. et al. Functionalization of PAMAM dendrimers with curcumin: Synthesis, characterization, fluorescent improvement and application on PET polymer. *Dyes and Pigments*, v. 174, p. 108081, 1 mar. 2020.

EL-MESSERY, T. M. et al. Spectroscopic studies of the interaction between isolated polyphenols from coffee and the milk proteins. *Surfaces and Interfaces*, v. 20, n. February,

p. 100558, 2020.

ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, v. 184, p. 537–556, 1 jul. 2018.

ELEAMEN, G. R. A. et al. Improvement of solubility and antifungal activity of a new aminothiophene derivative by complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 1, p. 116–125, 2017.

FARMANZADEH, D.; GHADERI, M. A computational study of PAMAM dendrimer interaction with trans isomer of picoplatin anticancer drug. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 2018.

FATHI, F. et al. Kinetic and thermodynamic insights into interaction of albumin with piperacillin: Spectroscopic and molecular modeling approaches. **Journal of Molecular Liquids**, v. 296, p. 111770, 15 dez. 2019.

FENG, B. et al. A sensitive LSPR sensor based on glutathione-functionalized gold nanoparticles on a substrate for the detection of Pb²⁺ ions. **RSC Advances**, v. 8, n. 8, p. 4049–4056, 2018.

FENG, T. et al. Deposition of gold nanoparticles upon bare and indium tin oxide film coated glass based on annealing process. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 14, n. 1, p. 13–22, 2019.

FERNANDES, M. C. S.; PAULIN FILHO, P. I.; MORELLI, M. R. Análise da superfície de grês porcelanato por microscopia de força atômica. **Cerâmica**, v. 57, n. 342, p. 173–179, jun. 2011.

FOLKERTSMA, L. et al. Reference-Electrode Free pH Sensing Using Impedance Spectroscopy. **Proceedings**, v. 2, n. 13, p. 742, 2018.

FUKUMA, T.; GARCIA, R. Atomic- and Molecular-Resolution Mapping of Solid–Liquid Interfaces by 3D Atomic Force Microscopy. **ACS Nano**, v. 12, n. 12, p. 11785–11797, 13 nov. 2018.

G. ACRES, R. et al. Mechanisms of Aggregation of Cysteine Functionalized Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 19, p. 10481–10487, 5 maio 2014.

GANG, G. T. et al. Protection of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 against renal ischemia/reperfusion injury in mice. **Free Radical Biology and Medicine**, 2014.

GIANNATOU, E. et al. Deep learning denoising of SEM images towards noise-reduced LER measurements. **Microelectronic Engineering**, 2019.

GOLSHAN, M. et al. A review on synthesis, photophysical properties, and applications of dendrimers with perylene core. **European Polymer Journal**, v. 137, p. 109933, 15 ago. 2020.

GROCHOWSKA, K. et al. Functionalization of indium-tin-oxide electrodes by laser-nanostructured gold thin films for biosensing applications. **Applied Surface Science**, 2015.

H. MEDINA, S.; E. H. EL-SAYED, M. Dendrimers as Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Agents. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 3141–3157, 17 jun. 2009.

HAISS, W. et al. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215–4221, 26 abr. 2007.

HAO, C. et al. Fluorescence quenching study on the interaction of ferroferric oxide nanoparticles with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 184, p. 191–197, 5 set. 2017.

HARRISON, E. et al. Peptide functionalized gold nanoparticles: The influence of pH on binding efficiency. **Nanotechnology**, v. 28, n. 29, 2017.

HU, Y. J. et al. Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method. **Journal of Molecular Structure**, v. 750, n. 1–3, p. 174–178, 2005.

JALILI, N.; LAXMINARAYANA, K. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. **Mechatronics**, v. 14, n. 8, p. 907–945, 1 out. 2004.

JIANG, J. et al. The effect of non-covalent interaction of chlorogenic acid with whey protein and casein on physicochemical and radical-scavenging activity of in vitro protein digests. **Food Chemistry**, v. 268, p. 334–341, 1 dez. 2018.

JOHN R.GIUDICESSI, BA.MICHAEL J.ACKERMAN., 2013. Dendrimers as drug delivery

vehicles: non-covalent interactions of bioactive compounds with dendrimers. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

KATHURIA, D. et al. Ring-chain isomerism in conjugated guanylhydrazones: Experimental and theoretical study. **Tetrahedron**, 2018.

KHATUN, S. et al. Calorimetric, spectroscopic and molecular modelling insight into the interaction of gallic acid with bovine serum albumin. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 122, p. 85–94, 1 jul. 2018.

KLEIN, T.; BUHR, E.; GEORG FRASE, C. TSEM: A Review of Scanning Electron Microscopy in Transmission Mode and Its Applications. **Advances in Imaging and Electron Physics**, v. 171, p. 297–356, 1 jan. 2012.

KOLOTYLO, M. et al. Synthesis of sulfonimide-based dendrimers and dendrons possessing mixed 1 → 2 and 1 → 4 branching motifs. **Tetrahedron Letters**, v. 60, n. 4, p. 352–354, 24 jan. 2019.

KONDRATYEVA, Y. O. et al. Chronoamperometric and coulometric analysis with ionophore-based ion-selective electrodes: A modified theory and the potassium ion assay in serum samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 310, p. 127894, 1 maio 2020.

LAÍÑO MARTA, E. DÍAZ-GARCÍA JOSEFA, A. G. C. Fluorescence | Multidimensional Fluorescence Spectrometry. **Encyclopedia of Analytical Science**, p. 301–308, 2019.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. [s.l.: s.n.].

LEE, J. Electrochemical Sensing of Oxygen Gas in Ionic Liquids on Screen Printed Electrodes. n. October, p. 251, 2014.

LI, J. et al. Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimer mediated delivery of drug and pDNA/siRNA for cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 546, n. 1–2, p. 215–225, 30 jul. 2018.

LI, X. Y. et al. Synthesis of a IAP antagonist analogue and its binding investigation with BSA/HSA. **Journal of Molecular Structure**, v. 1251, p. 131989, 5 mar. 2022.

LI, Y. et al. A poly(amidoamine) dendrimer-based drug carrier for delivering DOX to gliomas cells. **RSC Advances**, v. 7, n. 25, p. 15475–15481, 2017.

- LIU, X. et al. Enhanced photocatalytic properties of α -SnWO₄ nanosheets modified by Ag nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 490, p. 46–52, 2017.
- LÓPEZ, L. I. L. et al. Naphthoquinones: Biological Properties and Synthesis of Lawsone and Derivatives — a Structured Review. **Vitae**, v. 21, n. 3, p. 248–258, 2014.
- LV, L. et al. PVP-coated gold nanoparticles for the selective determination of ochratoxin A via quenching fluorescence of the free aptamer. **Food Chemistry**, v. 249, p. 45–50, 30 maio 2018.
- MA, R. et al. Spectroscopic methodologies and molecular docking studies on the interaction of antimalarial drug piperazine and its metabolites with human serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 222, p. 117158, 5 nov. 2019.
- MAKARSKA-BIALOKOZ, M. Interactions of hemin with bovine serum albumin and human hemoglobin: A fluorescence quenching study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 193, p. 23–32, 15 mar. 2018.
- MANOUCHEHRI, F. et al. Experimental, computational and chemometrics studies of BSA-vitamin B6 interaction by UV–Vis, FT-IR, fluorescence spectroscopy, molecular dynamics simulation and hard-soft modeling methods. **Bioorganic Chemistry**, v. 68, p. 124–136, 1 out. 2016.
- MARQUES, G. C. **APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (EIE) NA INVESTIGAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO BIODIESEL DE DENDÊ (*Elaeis guineensis*)**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, 2011.
- MEI, FANGSHENG; YUAN, TIECHUI; CHU, AIMIN; LI, R. Comparative study on the microstructure and properties of 10 wt%- and 35wt%- tin doped indium oxide materials.pdf. **Journal of the European Ceramic Society**, 2019.
- NAN, Z. et al. Interaction of graphene oxide with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 210, p. 348–354, 5 mar. 2019.
- NAZEM-BOKAEE, H. et al. Probing pore structure of virus filters using scanning electron

microscopy with gold nanoparticles. **Journal of Membrane Science**, v. 552, p. 144–152, 15 abr. 2018.

NOEL, G. et al. Nano- and micro-mechanical properties of wheat grain by atomic force microscopy (AFM) and nano-indentation (IIT) and their relationship with the mechanical properties evaluated by uniaxial compression test. **Journal of Cereal Science**, v. 90, n. September, p. 102830, 2019.

OLIVEIRA, M. E. F. A. G. et al. Evaluation of acute toxicity of β -lapachone associated with chitosan as a cytoprotective agent. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 54, n. 5, p. 279–287, 2018.

OLSON, J. et al. Chem Soc Rev Optical characterization of single plasmonic nanoparticles. **Chem Soc Rev**, p. 40–57, 2015.

OZKARTAL, A. Characterization of the ITO/p-Si/Al contacts produced by thermal evaporation. **Vacuum**, 2019.

P. BALDWIN, R.; RAVICHANDRAN, K.; K. JOHNSON, R. A cyclic voltammetry experiment for the instrumental analysis laboratory. **Journal of Chemical Education**, v. 61, n. 9, 1 set. 1984.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A brief review about concepts. **Revista Virtual de Quimica**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PANG, W. et al. Preparation of Curcumin–Piperazine Coamorphous Phase and Fluorescence Spectroscopic and Density Functional Theory Simulation Studies on the Interaction with Bovine Serum Albumin. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, p. 3013–3024, 3 ago. 2017.

PARK, J. S. et al. β -Lapachone increases phase II antioxidant enzyme expression via NQO1-AMPK/PI3K-Nrf2/ARE signaling in rat primary astrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, 2016.

PARK, S. et al. Beta-lapachone attenuates immobilization-induced skeletal muscle atrophy in mice. **Experimental gerontology**, 2019.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecânicos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013–1020, 2009.

PINK, J. J. et al. Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during β -lapachone-mediated apoptosis. **Experimental Cell Research**, 2000.

PRASAD, A. R. et al. Investigation on Bovine Serum Albumin (BSA) binding efficiency and antibacterial activity of ZnO nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 240, p. 122115, 15 jan. 2020.

PUTHONGKHAM, P.; VENTON, B. J. Recent advances in fast-scan cyclic voltammetry. **Analyst**, v. 145, n. 4, p. 1087–1102, 2020.

RABBANI, G. et al. Biophysical Study on the Interaction between Eperisone Hydrochloride and Human Serum Albumin Using Spectroscopic, Calorimetric, and Molecular Docking Analyses. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 1656–1665, 17 abr. 2017.

RÀFOLS, C. et al. Molecular interactions between warfarin and human (HSA) or bovine (BSA) serum albumin evaluated by isothermal titration calorimetry (ITC), fluorescence spectrometry (FS) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 150, p. 452–459, 20 fev. 2018.

RAJI, K. et al. Neem seed derived green C-dots: A highly sensitive luminescent probe for aqueous Au³⁺ ions and nurtures green gold recovery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 641, p. 128523, 20 maio 2022.

RAMALINGAM, V. Multifunctionality of gold nanoparticles: Plausible and convincing properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2019.

RAMU, A. G. et al. A facile and green synthesis of CuO/NiO nanoparticles and their removal activity of toxic nitro compounds in aqueous medium. **Chemosphere**, v. 271, p. 129475, 1 maio 2021.

RIBEIRO, D.V.; SOUZA, C. A. C.; ABRANTES, J. C. C. Uso da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) para monitoramento da corrosão em concreto armado. **RIEM - IBRACON Structures and Materials Journal**, v. 8, n. 4, 2015.

ROLIM, T.; CANCINO, J.; ZUCOLOTTI, V. A nanostructured genosensor for the early diagnosis of systemic arterial hypertension. **Biomedical Microdevices**, v. 17, n. 1, 2015.

RUIZ-BARRERA, O. et al. Nitro-treatment of composted poultry litter; effects on Salmonella, E. coli and nitrogen metabolism. **Bioresource Technology**, v. 310, p. 123459, 1

ago. 2020.

SANTANA, C. C. et al. Evaluation of guanylhydrazone derivatives as inhibitors of *Candida rugosa* digestive lipase: Biological, biophysical, theoretical studies and biotechnological application. **Bioorganic Chemistry**, 2019.

SANTOS, J. C. N. et al. Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1032–1040, 1 jul. 2018.

SEPÚLVEDA-CRESPO, D. et al. **Polyanionic carbosilane dendrimer-conjugated antiviral drugs as efficient microbicides: Recent trends and developments in HIV treatment/therapy** **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2015.

SIDDIQUI, G. A. et al. Probing the binding of phenolic aldehyde vanillin with bovine serum albumin: Evidence from spectroscopic and docking approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 203, p. 40–47, 5 out. 2018.

SILVA, M. P. G. DA et al. Electrochemical investigation of the toxicity of a new nitrocompound and its interaction with β -cyclodextrin and polyamidoamine third-generation. **Electrochimica Acta**, v. 251, p. 442–451, 2017.

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**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2018.

SKOOG, WEST, HOLLER, C. **Fundamentos de Química Analítica**. 8^o ed. São Paulo: Thomson, [s.d.].

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; DE ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486–495, 2016.

SPYROPOULOS-ANTONAKAKIS, N. et al. Selective aggregation of PAMAM dendrimer nanocarriers and PAMAM/ZnPc nanodrugs on human atheromatous carotid tissues: a photodynamic therapy for atherosclerosis. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2015.

STANKEVIČIUS, E. et al. Engineering electrochemical sensors using nanosecond laser treatment of thin gold film on ITO glass. **Electrochimica Acta**, 2019.

STAROWICZ, Z. et al. The tuning of the plasmon resonance of the metal nanoparticles in terms of the SERS effect. **Colloid and Polymer Science**, v. 296, n. 6, p. 1029–1037, 2018.

SUN, A. et al. Two novel phenanthraquinones with anti-cancer activity isolated from *Bletilla striata*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2016.

SUN, D. et al. Voltammetric aptamer based detection of HepG2 tumor cells by using an indium tin oxide electrode array and multifunctional nanoprobe. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 9, p. 3487–3496, 22 set. 2017.

SURYAWANSHI, V. D. et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 1, p. 56–63, 1 fev. 2016.

SYMONS, P. Quinones for redox flow batteries. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 29, p. 100759, 1 out. 2021.

TAGHAVI POURIANAZAR, N.; MUTLU, P.; GUNDUZ, U. Bioapplications of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers in nanomedicine. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 4, 2014.

URAM, Ł. et al. Cellular uptake of glucoheptoamidated poly(amidoamine) PAMAM G3 dendrimer with amide-conjugated biotin, a potential carrier of anticancer drugs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2017.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. John Wiley ed. New Jersey: [s.n.].

WANI, T. A. et al. Evaluation of competitive binding interaction of neratinib and tamoxifen to serum albumin in multidrug therapy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 227, p. 117691, 15 fev. 2020.

WAZIR, M. B. et al. Dendrimer assisted dye-removal: A critical review of adsorption and catalytic degradation for wastewater treatment. **Journal of Molecular Liquids**, v. 315, p. 113775, 1 out. 2020.

WEI, W. et al. Electron-beam irradiation induced optical transmittance enhancement for

Au/ITO and ITO/Au/ITO multilayer thin films. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 33, n. 10, p. 1107–1112, 2017.

WORMELL, P. Absorption Spectroscopy: Relationship of Transition Type to Molecular Structure. In: **Encyclopedia of Biophysics**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 35–38.

WU, X. et al. Investigation of interactions between zein and natamycin by fluorescence spectroscopy and molecular dynamics simulation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 327, p. 114873, 1 abr. 2021.

XAVIER, J. A. et al. Unveiling the relevance of the redox character of nitroaromatic and nitroheteroaromatic compounds as potential medicines. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 29, p. 100740, 1 out. 2021.

XIAO, W. et al. Influence of ligands property and particle size of gold nanoparticles on the protein adsorption and corresponding targeting ability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 538, n. 1–2, p. 105–111, 1 mar. 2018.

YADAV, A.; SHARAN, P.; KUMAR, A. Surface plasmonic resonance based five layered structure-biosensor for sugar level measurement in human. **Results in Optics**, v. 1, p. 100002, 1 nov. 2020.

YADAV, B. C. et al. Fabrication and characterization of nanostructured indium tin oxide film and its application as humidity and gas sensors. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 27, n. 5, p. 4172–4179, 2016.

YANG, L. et al. A red-emitting water-soluble fluorescent probe for biothiol detection with a large Stokes shift. **Chinese Chemical Letters**, v. 30, n. 3, p. 563–565, 1 mar. 2019.

YANG, M. et al. A new approach to characterising the porosity of particle modified electrodes: Potential step chronoamperometry and the diffusion indicator. **Applied Materials Today**, v. 25, p. 101249, 1 dez. 2021.

ZAHEER, Z.; KOSA, S. A.; AKRAM, M. Interactions of Ag⁺ ions and Ag-nanoparticles with protein. A comparative and multi spectroscopic investigation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 335, p. 116226, 1 ago. 2021.

ZEA, M. et al. Electrochemical sensors for cortisol detections: Almost there. **TrAC Trends**

in **Analytical Chemistry**, v. 132, p. 116058, 1 nov. 2020.

ZHANG, K. et al. Electrodeposition of gold nanoparticle arrays on ITO glass as electrode with high electrocatalytic activity. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 3, p. 1338–1341, 2013a.

ZHANG, K. et al. Electrodeposition of gold nanoparticle arrays on ITO glass as electrode with high electrocatalytic activity. **Materials Research Bulletin**, 2013b.

ZHANG, Y. et al. Chitosan coated on the layers' glucose oxidase immobilized on cysteamine/Au electrode for use as glucose biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 60, p. 271–276, 2014.

ZOSKY, C. G. **Handbook of Electrochemistry**. 1^o ed. [s.l: s.n.].

ZUBER, A. et al. Detection of gold nanoparticles with different sizes using absorption and fluorescence based method. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, 2016.

**CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS COM CARREADOR NATURAL DE FÁRMACOS UTILIZANDO
TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

1. INTRODUÇÃO

As interações de proteínas com compostos de baixo peso molecular no sangue são um dos fatores significativos no transporte e liberação de muitos medicamentos e hormônios no meio biológico. Essas interações podem influenciar a distribuição biológica desses compostos, bem como sua excreção, atividade terapêutica e toxicidade. Considerando que a principal função da albumina é transportar moléculas de baixa solubilidade aquosa, essa proteína tem papel fundamental para o transporte e liberação de fármacos com baixa solubilidade. Este tipo de ligação se dá no arcabouço de bolsas hidrofóbicas na proteína (WANI *et al.*, 2020).

Neste segundo capítulo, mimetizando condições fisiológicas (pH 7,4), toda a pesquisa foi direcionada a investigação da interação dos compostos β LP, 6CN10 e LQM10 com albumina do soro bovino, visto que as albuminas são excelentes transportadoras de diversas substâncias. Com isso, este trabalho pretende determinar os principais parâmetros relacionados ao sistema macromolécula-ligante e desta forma ajudar a compreender melhor a dinâmica do complexo formado.

Inicialmente foi realizado um estudo preliminar utilizando UV-Vis com objetivo de identificar os possíveis complexos formados. Posteriormente, todas as avaliações foram feitas por fluorescência com determinação de constante de ligação, parâmetros termodinâmicos, modificações na estrutura proteíca, entre outros.

1.1 Albumina do Soro Bovino

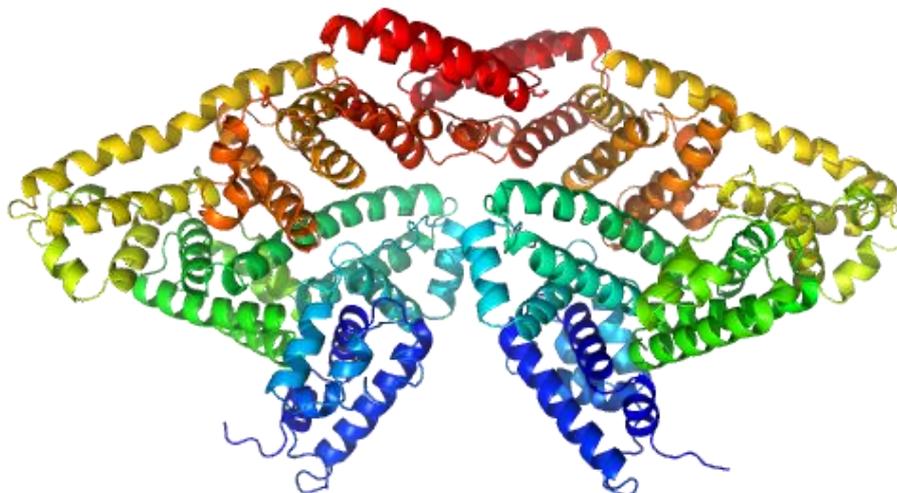
As albuminas são proteínas solúveis mais abundantes no plasma de mamíferos com características notáveis atuando principalmente no sangue. Essas proteínas desempenham uma série de funções fisiológicas essenciais para o metabolismo humano. Uma das propriedades proeminentes dessas proteínas é sua capacidade de transporte no caso de fármacos e outras substâncias semelhantes (RABBANI *et al.*, 2017).

A albumina do soro bovino (*bovine serum albumin*, BSA), Figura 33, é amplamente empregada nos estudos de interação supramolecular pela similaridade estrutural, cerca de 76% na sequência de aminoácidos, com a albumina do soro humano (*human serum albumin*, HSA). A BSA apresenta alta estabilidade, disponibilidade e também é de baixo custo comparada a HSA. Além disto, esta proteína é constituída por 583 resíduos de aminoácidos com domínios classificados em I, II e III sendo cada um subdivididos em A e B. As moléculas que ficam armazenadas na proteína geralmente ficam localizadas nos subdomínios IIA e IIIA, conhecidos como sítios I e II, respectivamente (NAN *et al.*, 2019).

Devido a presença de aminoácidos aromáticos como os 20 resíduos de tirosina e os dois triptofanos Trp-134 e Trp-212, as proteínas possuem propriedades fluorescentes que podem ser investigadas e relacionadas as mudanças estruturais da proteína a partir de interação (KHATUN *et al.*, 2018).

As ligações por interação entre uma macromolécula com uma pequena molécula (ligante) podem formar um complexo supramolecular em que a ligação é de natureza não covalente conhecidas como química supramolecular. Essas ligações podem ser ligações de hidrogênio, hidrofóbicas, atração eletrostática ou forças de Van der Waals (JIANG *et al.*, 2018). Estas avaliações podem ser feitas por fluorescência, visto que a proteína apresenta resíduos fluorescentes.

Figura 33 – Estrutura da albumina do soro Bovino (BSA).



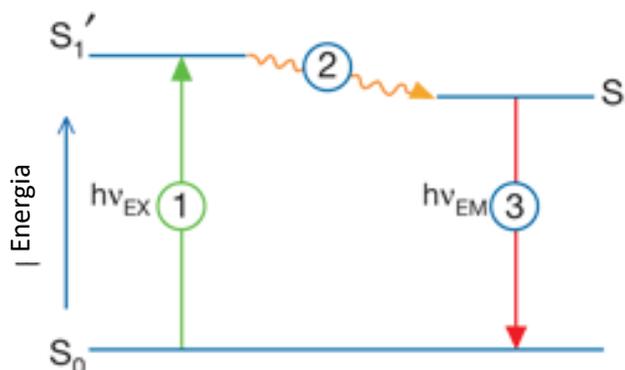
Fonte: SASBDB, 2021

1.2 Espectroscopia de Fluorescência molecular

A técnica de espectroscopia de fluorescência molecular baseia-se na absorção de radiação em um determinado comprimento de onda e posterior reemissão em um diferente comprimento de onda (LAÍÑO MARTA, E.DÍAZ-GARCÍAJOSEFA, 2019).

De forma geral, o fenômeno de fluorescência pode ser classificação em três etapas. A primeira é a excitação em que um fóton de energia $h\nu_{ex}$ é fornecido por uma fonte externa, na maioria dos equipamentos é utilizado lâmpadas incandescentes ou laser, e absorvido pelo fluoróforo (molécula fluorescente), criando um estado *singlete* excitado, S_1' . O estado excitado, segunda etapa, é a etapa mais rápida, na ordem de nanossegundos, e neste período o fluoróforo sofre mudanças conformacionais e interações com seu ambiente molecular. Nestas mudanças, a energia S_1' é parcialmente dissipada, resultando num estado *singlete* relaxado, S_1 . Vale ressaltar que nem todas as moléculas excitadas retornam ao estado fundamental por fluorescência, pois outros processos acontecem simultaneamente, como transferência de energia por ressonância de fluorescência (*Fluorescence Resonance Energy Transference*, FRET). Por fim, a emissão de fluorescência ocorre quando o fóton é emitido ($h\nu_{em}$), retornando ao seu estado fundamental, S_0 (Figura 34). Como consequência da dissipação de energia durante os processos no estado excitado, a energia desse fóton é menor e assim o comprimento de onda é maior comparado ao fóton de excitação inicial. Esta diferença de energia ou comprimento de onda é chamada de deslocamento Stokes (YANG *et al.*, 2019)

Figura 34 - Processo energético de emissão de Fluorescência.



Fonte: (LAKOWICZ, 2006)

Os estudos de interação envolvendo moléculas do âmbito farmacológico, alimentício, dos pesticidas, entre outros, com macromoléculas como proteínas e DNA são feitos, majoritariamente, por fluorescência. As vantagens da fluorescência molecular comparada às demais técnicas espectroscópicas, são a sua alta sensibilidade, a grande faixa de concentração linear e seletividade (WANI *et al.*, 2020).

Especificamente, a interação de proteínas com pequenas moléculas pode ser monitorada pelo sinal intrínseco de fluorescência da macromolécula. Desta forma, alguns dados como mecanismo de interação (tipo de *quenching*), valor da constante de formação (K_b), parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG), tipos de forças intermoleculares envolvidas, entre outras características podem ser investigadas (EL-MESSERY *et al.*, 2020).

1.2.1 *Quenching* de fluorescência

A interação de determinada molécula com um fluoróforo ocasionando diminuição do sinal de fluorescência, denomina-se *quenching*. A molécula responsável por esta diminuição é chamada de *quencher* (HU *et al.*, 2005).

Nos estudos de interação proteína-ligante, o mecanismo de interação pode ser determinado através do sinal de fluorescência da proteína (fluoróforo) com a molécula em estudo (*quencher*). Este mecanismo é classificado em dois: *quenching* dinâmico ou estático. No primeiro, o mecanismo ocorre quando o fluoróforo no estado-excitado (F^*) é desativado ao entrar em contato com outra molécula (Q). O choque é suficiente para a desativação energética do fluoróforo. Após a colisão, ocorre transferência de energia do fluoróforo no estado excitado para a espécie *quencher*, levando assim a uma diminuição do sinal de fluorescência. De modo diferente, o *quenching* estático refere-se à formação de um complexo não-fluorescente ($F-Q$). Este mecanismo ocorre no estado fundamental e não depende de

processos de difusão ou colisões moleculares resultando na desativação energética do fluoróforo, liberação de calor e com isso, redução do sinal analítico de fluorescência (LV *et al.*, 2018).

1.2.2 Fluorescência Sincronizada

Esta técnica é baseada na varredura simultânea do espectro de excitação (λ_{exc}) e de emissão (λ_{em}) enquanto a diferença de comprimento de onda ($\Delta\lambda$) entre λ_{ex} e λ_{em} é mantida constante. Quando a diferença entre o comprimento de onda de excitação e emissão ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$) é igual a 60 nm, monitora-se o microambiente dos resíduos de triptofano, enquanto que para $\Delta\lambda = 15$ nm, se avalia o microambiente dos resíduos de tirosina (PRASAD *et al.*, 2020).

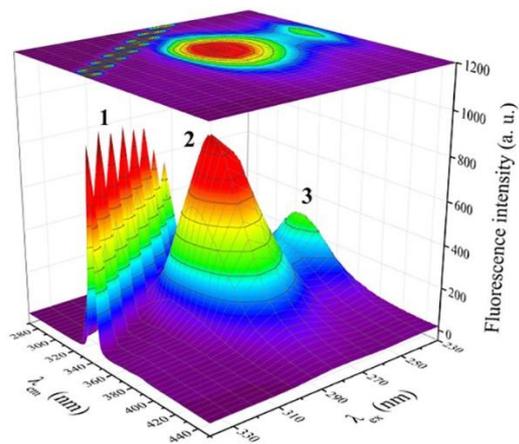
A fluorescência sincronizada é utilizada frequentemente para caracterizar a interação entre supressores e proteínas, uma vez que esse tipo de estudo permite a análise do microambiente em que se encontra o fluoróforo. As principais características desta técnica são o estreitamento da banda espectral, simplificação do espectro de emissão e contração da faixa espectral (SANTOS *et al.*, 2018).

1.2.3 Fluorescência Tridimensional

Mudanças na estrutura da proteína podem ser monitoradas pela fluorescência tridimensional. Além disso, é possível determinar mudanças no microambiente da macromolécula (BYADAGI *et al.*, 2017).

Neste estudo é feito a comparação entre o gráfico em 3D da proteína com e sem o ligante com possível variação de fluorescência, o que indica mudança no microambiente da macromolécula. Para a proteína, são observados três picos característicos: o primeiro associado ao efeito rylight, em 280 nm relacionados aos resíduos de aminoácidos triptofano e tirosina e o terceiro em 220 nm é referente a cadeia polipeptídica da estrutura secundária da proteína, Figura X. Neste sentido, havendo diminuição destes picos ocasionado pelo ligante, indica que há alterações na estrutura da proteína e ela torna-se menos enovelada com a exposição de alguns resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (LI *et al.*, 2022).

Figura 35 - Fluorescência em 3D da BSA. Pico 1 referente ao efeito Rayleigh; pico 2 relacionado aos resíduos de triptofano e tirosina e pico 3 referente a cadeia polipeptídica.



Fonte: SANTOS, 2018.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o mecanismo de interação entre BSA com β LP, 6CN10 e LQM10 por UV-vis e fluorescência e determinar os principais parâmetros associados a este processo.

2.2 Objetivos específicos

- a)* Determinar a possível formação do complexo entre BSA e com β LP, 6CN10 e LQM10 por UV-vis;
- b)* Calcular constantes de ligação dos sistemas formados por Fluorescência;
- c)* Determinar parâmetros termodinâmicos como ΔH , ΔS e ΔG para os sistemas de interação avaliados e inferir sobre as forças predominantes de interação;
- d)* Realizar o mapeamento da região de interação, através dos resíduos de tirosina e triptofano, aplicando fluorescência sincronizada;
- e)* Avaliar mudanças conformacionais na estrutura da proteína por fluorescência 3D.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Albumina do soro bovino, NaCl foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). β -Lapachona foi sintetizada pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro e cedida pela professora Ligia Maria Marino Valente. 6CN10 e LQM10 foi sintetizado e cedido pelo professor Thiago Mendonça Aquino do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Outros reagentes empregados nos ensaios foram de grau analítico com pureza acima de 98%. As soluções estoques de β LP, 6CN10 e LQM10 (0,1 mM) e de BSA (100 μ M) foram preparados em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4 \pm 0,1) com 100 mM de NaCl para ajuste da força iônica. Em todos os experimentos foi utilizada água ultrapura (18,2 M Ω cm⁻¹) para o preparo das soluções (Millipore, EUA).

3.2 Espectrometria de absorção molecular (Uv-vis)

As medições por UV-vis foram realizadas numa cubeta de quartzo 1x1 cm de 250 a 400 nm utilizando espectrofotômetro Shimadzu Multispec-1501 de duplo feixe equipado com par de cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico. Os espectros foram obtidos em módulo de absorvância das soluções de BSA (3 μ M), β LP (12 μ M), 6CN10 (12 μ M) e LQM10 (12 μ M) e mistura (BSA+ligante).

3.3 Fluorescência molecular

Os espectros de fluorescência no estado estacionário foram obtidos utilizando espectrofluorímetro modelo RF-5301PC (Shimadzu, Japão) com lâmpada de xenônio (150 W) como fonte de radiação. As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm. O slit utilizado em todos experimentos foi de 5 nm para excitação e emissão, respectivamente. Nas titulações espectrofluorimétricas a concentração de BSA foi fixada em 2 μ M, sendo adicionado incrementos ds ligantes (0–36 μ M) com excitação em 280 nm e emissão em 342 nm.

Na avaliação dos parâmetros termodinâmicos as temperaturas utilizadas foram 20, 27 e 37°C.

Para monitoramento dos resíduos de triptofano e tirosina, assim como, avaliação da polaridade do microambiente destes aminoácidos foi empregada fluorescência sincronizada.

Esta técnica se baseia na variação simultânea dos dois monocromadores (excitação e emissão) mantendo-se uma diferença de comprimento de onda fixa ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). Os resíduos de triptofano foram monitorados utilizando $\Delta\lambda = 60$ nm, enquanto tirosina igual a 15 nm (CHUNMEI *et al.*, 2014).

Para a avaliação da fluorescência 3D as soluções da BSA (2 μ M) na ausência e presença de cada um dos ligantes (20 μ M) foram excitadas na faixa de 220–340 nm sendo os espectros de emissão registrados na faixa 270 - 450 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação da interação por UV-vis

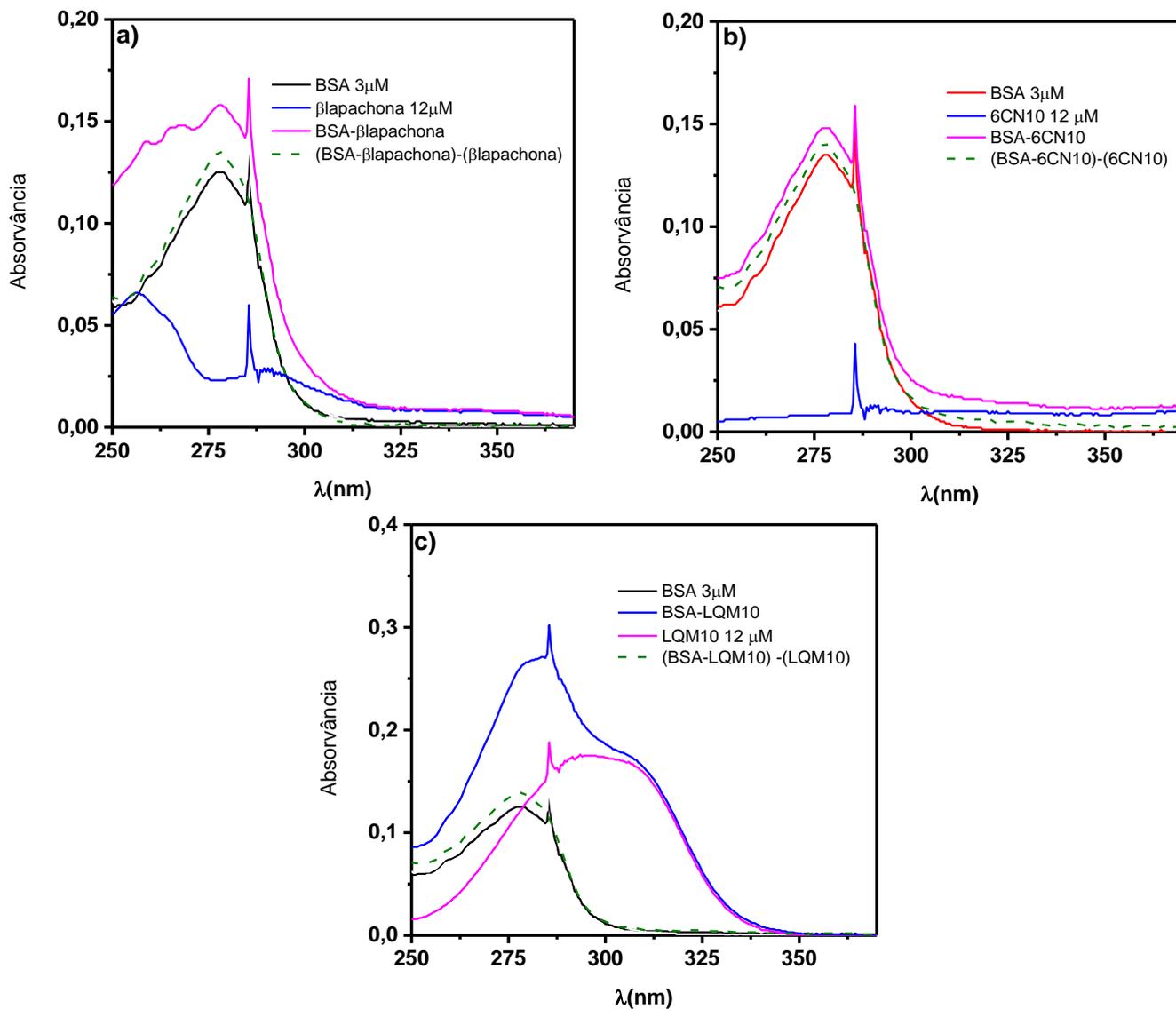
A espectroscopia por UV-vis é utilizada para estudos preliminares de interação, como a possível formação do complexo macromolécula-ligante. Além de denotar mudanças na conformação da proteína, oriundas da interação intermolecular (BUTNARASU *et al.*, 2021).

A Figura 38 mostra a absorção máxima da albumina em 277 nm, oriunda das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e, majoritariamente, pelos resíduos triptofano, tirosina, fenilalanina, cisteína, cistina, metionina e histidina presentes na proteína. Embora apenas os três primeiros citados (resíduos aromáticos) possuam absorvidade molar considerável em pH 7,4 (SURYAWANSHI *et al.*, 2016).

A mistura das soluções de BSA+ β LP, resulta no efeito hiper-crômico do espectro, quando este é comparado ao da solução de BSA (Figura 38a). Ademais, a subtração dos espectros do sistema BSA+ β LP pelo do ligante (β LP) deu origem a um espectro que não foi sobreponível ao espectro da proteína, indicando que há formação de um novo composto com absorvidade molar diferente da soma entre a macromolécula e o ligante. Desta forma, os resultados evidenciam a formação do complexo supramolecular BSA- β LP. De forma análoga, nas Figuras 38b e 38c, houve efeito hiper-crômico ao adicionar solução de ligante a solução da macromolécula, seguido de um deslocamento batocrômico ($\Delta\lambda = 6$ nm) no sistema com LQM10. Além disto, em todos os sistemas, a subtração dos espectros, como mencionado anteriormente, não foi sobreponível. Estes resultados indicam interação e formação dos complexos BSA- β LP, BSA-6CN10 e BSA-LQM10 (ZAHEER; KOSA; AKRAM, 2021).

A constatação da formação dos complexos BSA- β LP, BSA-6CN10 e BSA-LQM10 por UV-vis pode fornecer dados do tipo de *quenching* no processo. O *quenching* dinâmico está associado a formação do complexo no estado excitado e seria evidenciado caso não houvesse mudanças no espectro de absorção do complexo formado (subtração dos espectros). De outra forma, o *quenching* estático é caracterizado pela formação do complexo no estado fundamental e por isso é possível observar mudanças no espectro resultante da interação (MANOUCHEHRI *et al.*, 2016). Pelo exposto, todos os complexos formados são característicos de *quenching* estático.

Figura 36 - Espectros de absorção dos sistemas a) BSA (3 μ M), β LP (12 μ M), da mistura BSA+ β LP e a diferença dos espectros (BSA+ β LP) – β LP; b) BSA (3 μ M), 6CN10 (12 μ M), da mistura BSA+ 6CN10 e a diferença dos espectros (BSA+ 6CN10) – 6CN10; c) BSA (3 μ M), LQM10 (12 μ M), da mistura BSA+ LQM10 e a diferença dos espectros (BSA+ LQM10) – LQM10. Na faixa de 250 a 365 nm. Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM) a 27°C.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

4.2 Avaliação da interação por fluorescência e constantes de ligação

No sistema, mimetizando condições fisiológicas, BSA foi titulada com β LP, 6CN10 e LQM10, Figura 39a-c. Para os três sistemas, BSA apresentou máximo de fluorescência em 341 nm sendo sua fluorescência suprimida sem deslocamento do máximo de emissão com adição de alíquotas do ligante. Este resultado indica que há interação entre a macromolécula e

os fármacos e que a diminuição do sinal de fluorescência resulta da formação de um complexo supramolecular não fluorescente (CHI *et al.*, 2018).

A avaliação das constantes de ligação permite quantificar a interação de modo que seja possível obter valores de ligação considerados fracos, moderados ou fortes. A constante de Stern-Volmer (K_{sv}) indica a eficiência do *quencher* (ligante) de reduzir a intensidade de fluorescência do fluoróforo (BSA), calculada pela equação (JIANG *et al.*, 2018).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{Eq. (14)}$$

Sendo F_0 e F os sinais de fluorescência na ausência e presença do ligante, respectivamente. $[Q]$ é a concentração do *quencher* e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer. A constante é obtida através do coeficiente angular da relação F_0/F versus $[Q]$, conforme Figura 39 a-c.

K_b é a constante de ligação e quantifica a magnitude da interação entre a macromolécula e o ligante. Também, a partir da Equação 15 é possível obter o número de sítios de ligação (n) entre o fluoróforo e a molécula de interesse, conforme Figura 39 a-c (MAKARSKA-BIALOKOZ, 2018).

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = K_b + n \log [Q] \quad \text{Eq. (15)}$$

A constante de ligação é obtida através do coeficiente linear e n pelo coeficiente angular da relação $\log(F_0 - F/F)$

Os valores calculados das constantes estão na Tabela 6. Os espectros de fluorescência assim como os gráficos para determinar as constantes estão representados na Figura 39. Os valores de K_{sv} demonstram quantitativamente que há interação entre BSA e as moléculas. Os valores de K_b para β LP e 6CN10 são considerados intermediários neste sistema de interação. Entretanto, para o LQM10, K_b apresenta alto valor de interação. Isto pode estar associado a maior solubilidade do LQM10 frente as outras moléculas, facilitando a interação com a albumina. Além disso, a estequiometria do complexo, para todos os sistemas, foi próxima de 1:1. Trabalhos de interação de Rafols e colaboradores por fluorescência em pH 7,4 a 30°C entre BSA e HSA com varfarina, um anticoagulante, utilizado na prevenção de trombose e tromboembolismo, mostraram que as constantes de interação para este sistema foram de $8,39 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ para a albumina do soro humano e $1,16 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ para albumina do soro bovino com a molécula de estudo (RÀFOLS *et al.*, 2018). Pang e colaboradores (2017) estudaram a possível interação mimetizando condições fisiológicas entre BSA com fármaco sintético com melhoria de solubilidade, derivado de curcumina. O valor da constante foi de

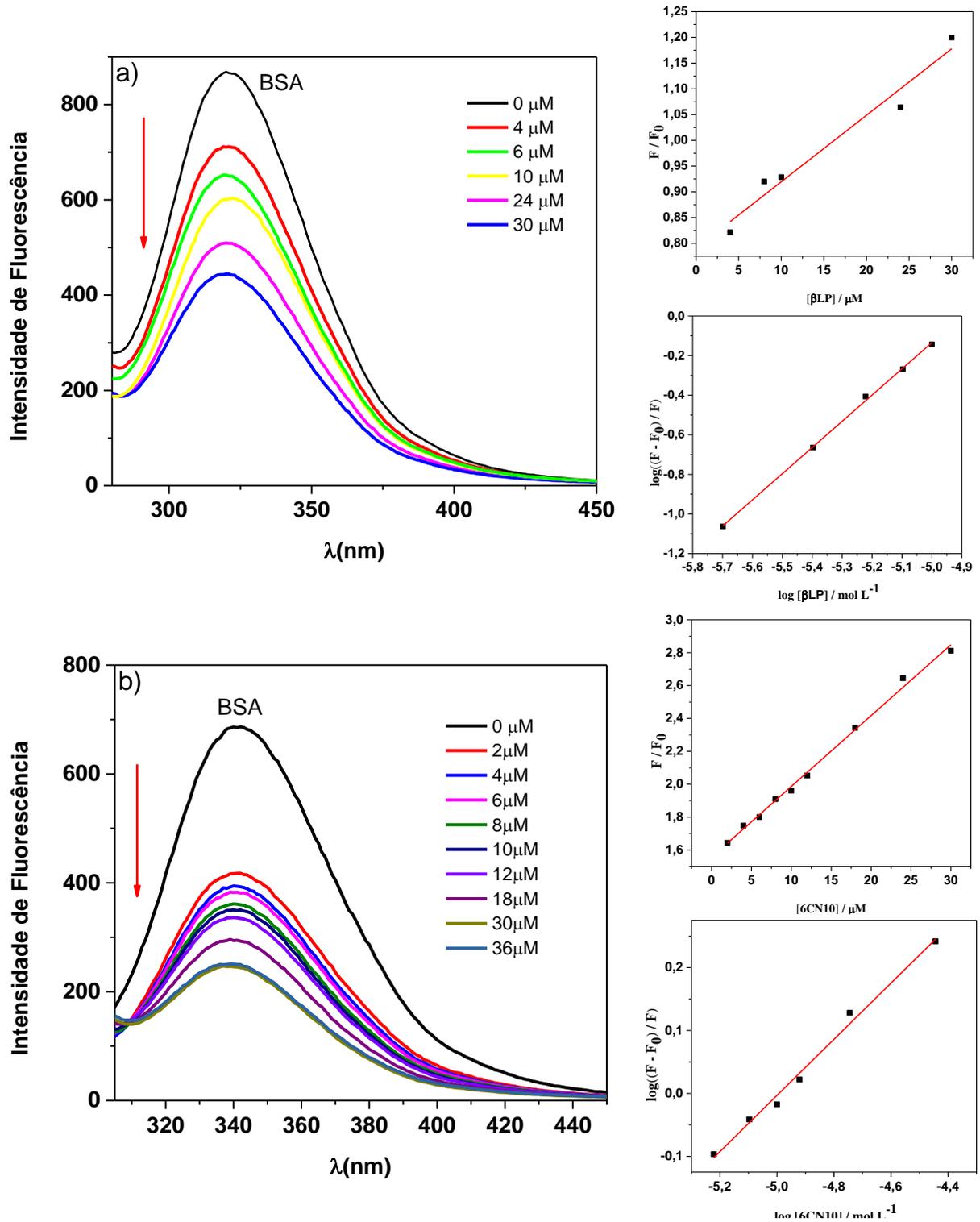
$10,0 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ e esse mesmo fármaco associado a piperazina foi de $9,1 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ambos os sistemas a 25°C (PANG *et al.*, 2017). Este resultado indica que os valores de K_b para as interações mensuradas neste trabalho são similares com os descritos na literatura. Com isso, as interações neste estudo têm potencial para prosseguir com investigações acerca da liberação da molécula na região desejada visto que os valores calculados mostram que a interação é moderada indicando que há ligação da molécula com a macromolécula e que essa interação não é muito forte a ponto de não ocorrer liberação da substância.

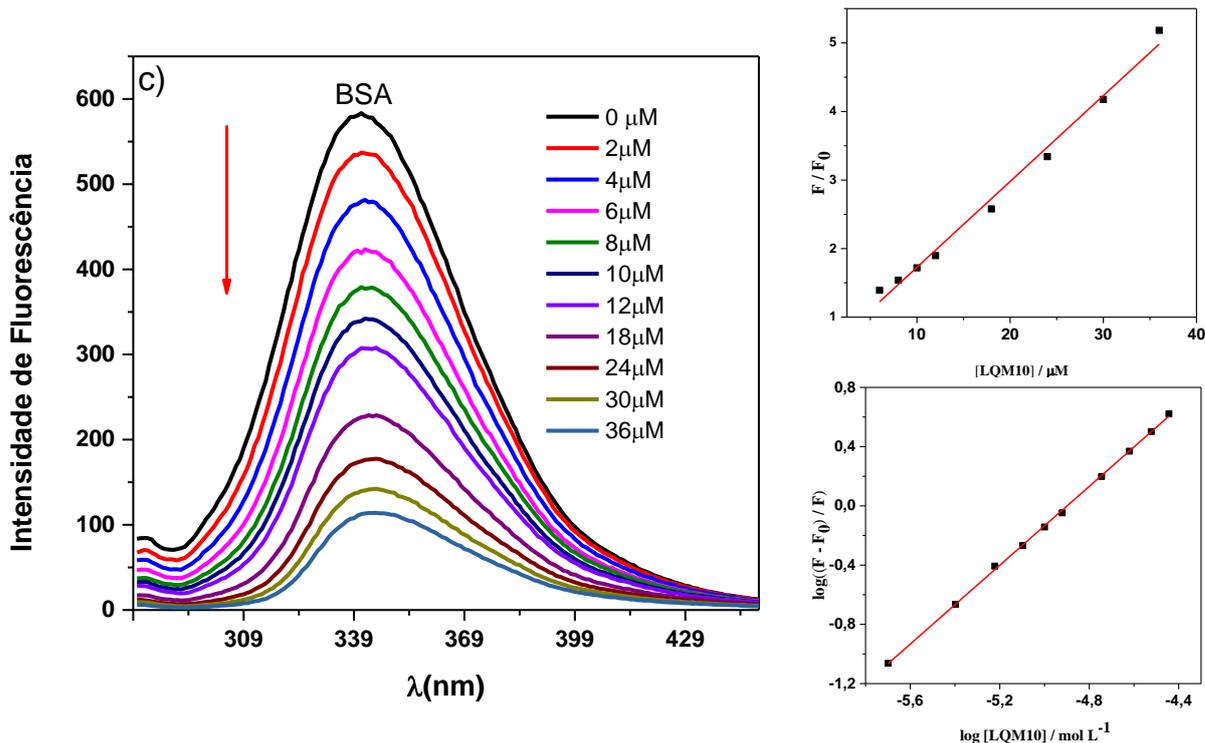
Tabela 6 - Constantes de interação e número de sítios de ligação para interação entre BSA com β LP, 6CN10 e LQM10.

Ligante	K_{sv}	r_{ksv}	K_b	r_{kb}	n
βlapachona	$6,00 \times 10^4$	0,983	$4,10 \times 10^3$	0,992	1,02
6CN10	$4,30 \times 10^4$	0,997	$1,69 \times 10^2$	0,997	1,35
LQM10	$1,21 \times 10^5$	0,995	$3,31 \times 10^6$	0,999	1,12

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Figura 37 - Espectro de fluorescência e cálculos de K_{sv} e K_b de BSA ($2 \mu\text{M}$) com adição de incrementos de a) βLP ; b) 6CN10 e c) LQM10 . Condições pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM).





Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

4.3 Parâmetros termodinâmicos

A partir da titulação da proteína com incrementos do ligante em diferentes temperaturas é possível determinar o tipo de *quenching* e parâmetros termodinâmicos do sistema. Redução de K_{sv} com aumento da temperatura indica processo de *quenching* estático. Todavia, caso ocorra aumento da constante, o *quenching* do tipo dinâmico é predominante (HAO *et al.*, 2017).

A Tabela 7 mostra que titulando BSA a 20°C, 27°C e 37°C, houve diminuição de K_{sv} para todas substâncias com aumento da temperatura, indicando que o mecanismo acontece por *quenching* estático. Este resultado confirma as avaliações da formação do complexo por UV-vis.

Além disso, os parâmetros termodinâmicos foram calculados (Tabela 7) possibilitando a determinação das forças intermoleculares presentes na interação. A equação de vant' Hoff possibilita o cálculo de ΔH e ΔS (FATHI *et al.*, 2019):

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Eq. (16)}$$

T é a temperatura em Kelvin (K) e R (8,314462 J mol⁻¹ K⁻¹), a constante universal dos gases. Estes parâmetros foram calculados a partir dos valores do coeficiente angular e linear do sistema $\ln K_b$ versus $1/T$. Os gráficos referentes a linearização da equação de vant' Hoff são apresentados na Figura 40. O valor de ΔG foi obtido empregando a equação a seguir (FATHI et al., 2019):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (17)}$$

De acordo com Ross e Subramanian (1981), entalpia e entropia menores que zero é o indicativo que forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio atuam predominantemente no sistema. Entalpia e entropia positivas resultam de interações hidrofóbicas; Entalpia negativa e entropia positiva, mostra que forças eletrostáticas atuam na interação. Os valores calculados para estes parâmetros são apresentados na Tabela 7.

Nesta tabela mostra que β LP apresentou $\Delta H = -31,60$ kJ mol⁻¹ e $\Delta S = +35,33$ J mol⁻¹ e LQM10 $\Delta H = -20,92$ kJ mol⁻¹ e $\Delta S = +54,95$ J mol⁻¹. Esses resultados indicam que forças eletrostáticas atuam predominantemente sobre o sistema. O átomo de oxigênio da carbonila, assim como as aminas presentes na estrutura da molécula, podem estar protonadas ocasionando as atrações de carga.

Os parâmetros para 6CN10 foram $\Delta H = -37,80$ kJ mol⁻¹ e $\Delta S = -24,44$ J mol⁻¹ indicando que a força predominante é forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Este resultado é coerente com a estrutura cíclica da molécula com forças de Van der Wals atuando na interação assim como o grupo nitro responsável pelas ligações de hidrogênio com a proteína.

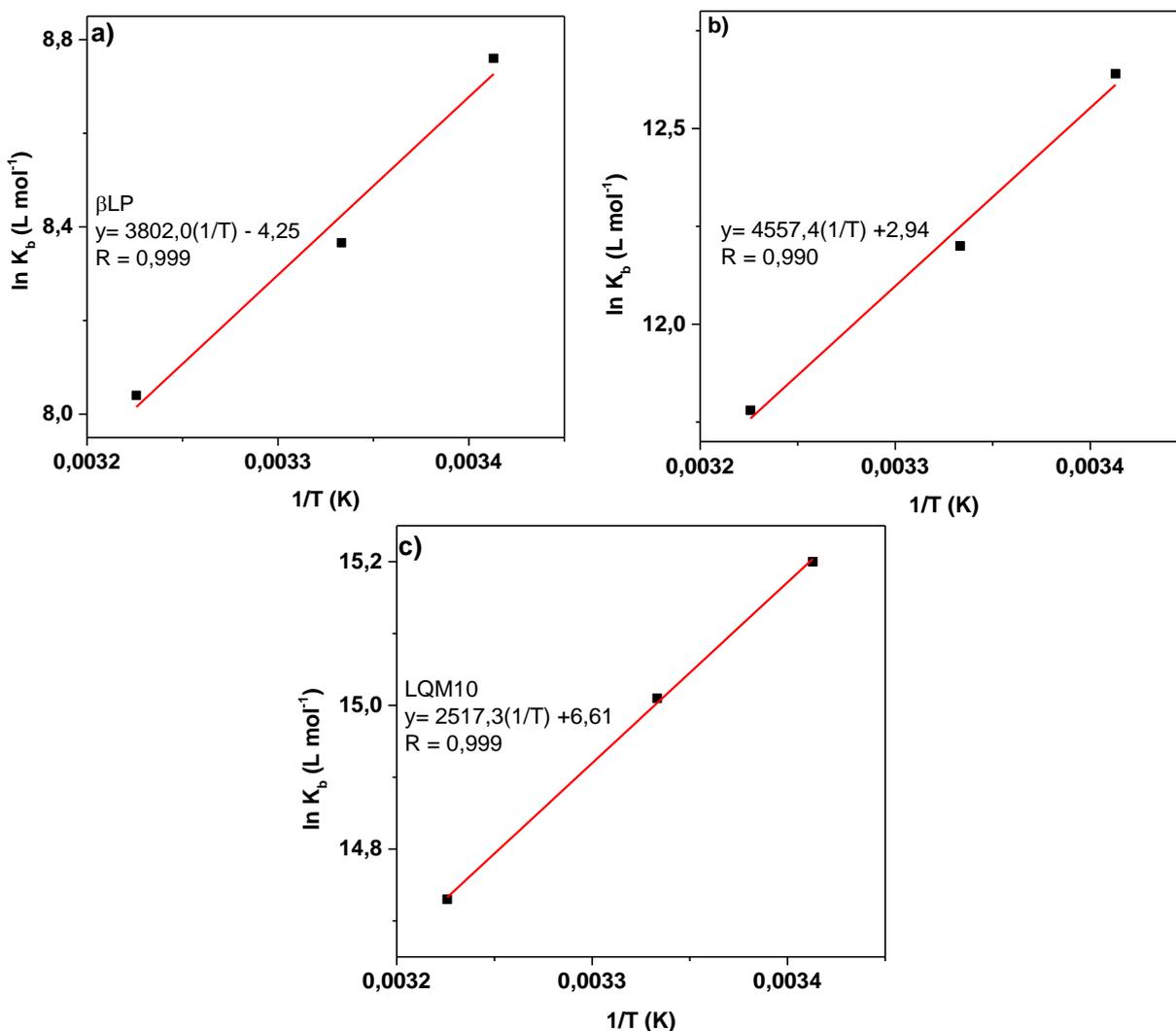
Além disso, todos os sistemas ocorreram com entropia menor que zero, indicando a espontaneidade das interações.

Tabela 7 - Parâmetros de ligação e de termodinâmicos para a interação entre BSA com β LP, 6CN10e LQM10 em diferentes temperaturas.

Ligante	T(K)	K_{sv} (10^4 L mol $^{-1}$)	K_b (10^5 L mol $^{-1}$)	ΔH kJ mol $^{-1}$	ΔS J mol $^{-1}$	ΔG kJ mol $^{-1}$
β LP	293 (20°C)	6,22	0,064			-21,25
	300 (27°C)	6,00	0,043	-31,60	+35,33	-21,00
	310 (37°C)	6,12	0,031			-20,65
6CN10	293 (20°C)	2,55	3,10			-30,64
	300 (27°C)	2,30	1,98	-37,80	-24,44	-30,47
	310 (37°C)	2,10	1,30			-30,23
LQM10	293 (20°C)	13,10	39,90		-	-37,02
	300 (27°C)	12,60	33,00	-20,92	+54,95	-37,40
	310 (37°C)	12,00	24,95			-37,95

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Figura 38 - Curva de Van't Hoff para a interação a) BSA- β LP; b) BSA- 6CN10 e c) BSA- β LP.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

4.4 Fluorescência Sincronizada

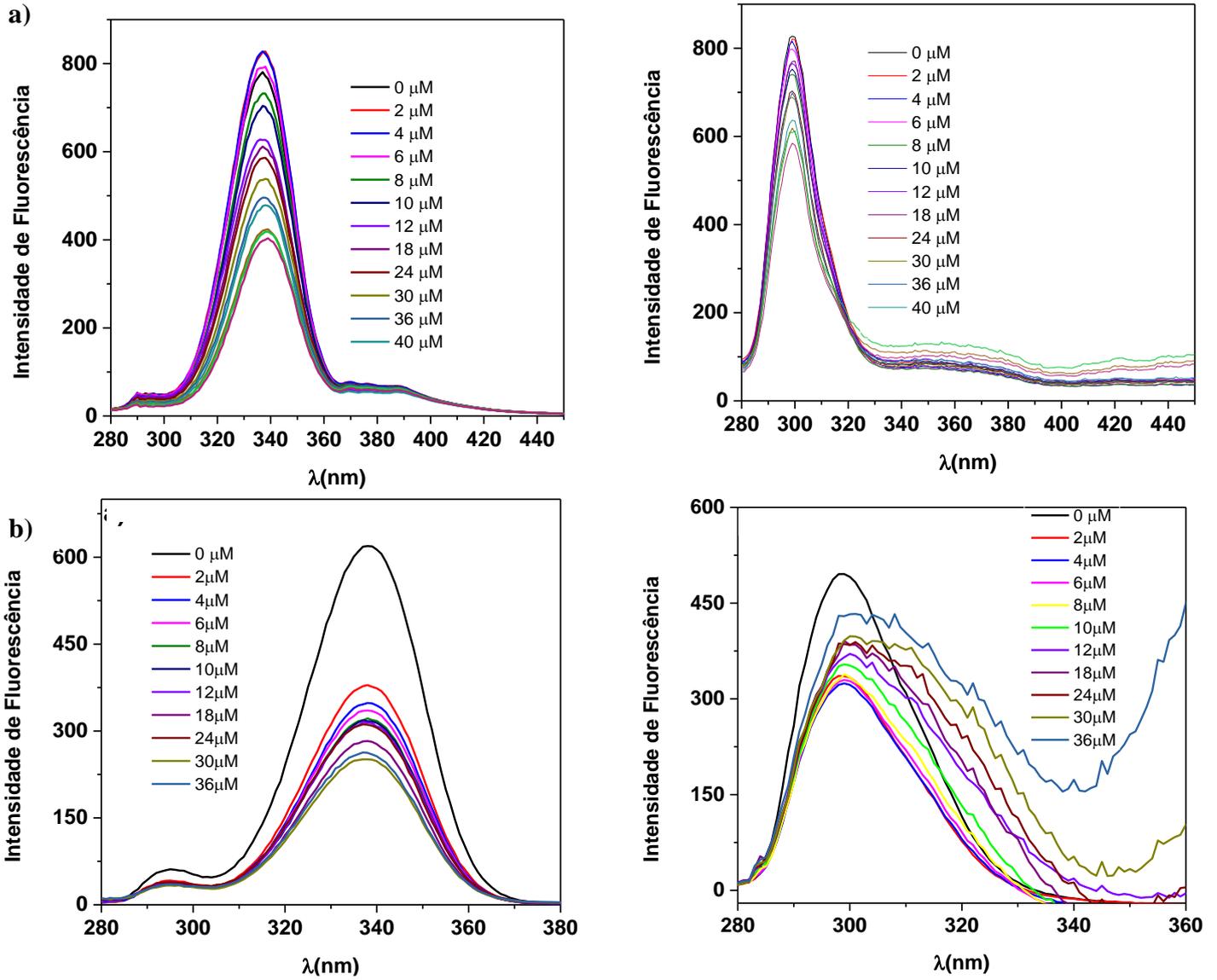
Aplicando titulação da BSA com os compostos e monitorando os resíduos de triptofano ($\Delta\lambda = 60$ nm) e tirosina ($\Delta\lambda = 15$ nm) separadamente, através da fluorescência sincronizada, foi possível verificar a influência dos resíduos para esta avaliação de interação. A Figura 41 mostra o espectro de titulação, BSA- β LP, BSA-6CN10 e BSA-LQM10, todos com máximo de emissão de 338 nm para triptofano e 298 nm para tirosina. De acordo com a Figura 41a, com adição de β LP, a intensidade de fluorescência da BSA diminuiu, porém, não houve mudanças no máximo de emissão quando se monitorou tirosina. Entretanto, um deslocamento de 2 nm, no máximo de emissão, para maiores comprimentos de onda foi observado para o triptofano seguido de redução do sinal de fluorescência ao interagir com β LP (Figura 41a), indicando que o microambiente próximo a este aminoácido se torna mais polar e mais acessível ao solvente (água) (HEA, et al., 2016). Além disso, com base na Tabela 8 o valor de K_{sv} para o triptofano ($1,36 \times 10^4$ L mol⁻¹) é maior em relação a tirosina ($0,46 \times 10^4$ L mol⁻¹). Em função do exposto, conclui-se que β LP está mais próxima da região que contém o resíduo de Trp durante a interação com a proteína.

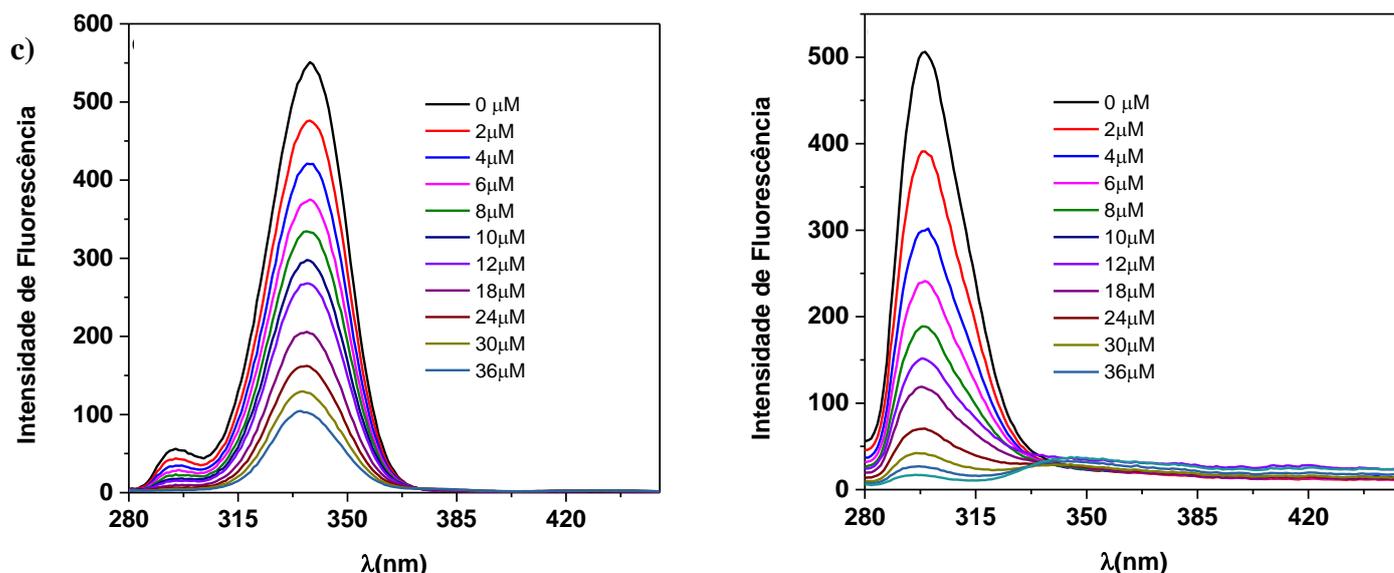
A Figura 41b referente a interação com o nitrocomposto, aplicando $\Delta\lambda = 60$ nm para triptofano, houve deslocamento do máximo de emissão em 0,8 nm para o azul (Tabela 8). Este deslocamento no comprimento de onda indica que o ligante altera o microambiente da proteína, tornando-o menos polar e conseqüentemente mais hidrofóbico. Além disso a estrutura da proteína torna-se mais fechada (CHENG *et al.*, 2021). Os deslocamentos para azul também foram observados no trabalho de Magdalena na investigação da interação entre as proteínas BSA e HSA e hemoglobina humana (HHB) em pH 7,4 com fármaco hemina, uma porfirina marrom que contém ferro utilizada no tratamento de ataques de profirias (MAKARSKA-BIALOKOZ, 2018).

K_{sv} para este resíduo foi de $3,80 \times 10^5$ L mol⁻¹. Entretanto, não foi possível determinar o valor da constante para o resíduo de tirosina, pois a titulação não obteve resposta linear. Com isso, o resíduo de triptofano é a sonda mais adequada para monitoramento da interação BSA-6CN10. De forma similar, a interação BSA-LQM10 (Figura 41c), com $\Delta\lambda = 60$ nm, mostrou um deslocamento no máximo de emissão de 2,6 nm para menores comprimentos de onda. Além disto, K_{sv} foi de $1,15 \times 10^5$ L mol⁻¹. Para tirosina a titulação forneceu deslocamento de 2,6 nm para menores comprimentos de onda com K_{sv} de $2,77 \times 10^5$ L mol⁻¹

(Tabela 8). Esta molécula, diferentemente das demais, interagiu mais próximo do resíduo de tirosina.

Figura 39 - Fluorescência sincronizada para o resíduos de tirosina ($\Delta\lambda= 15$ nm) e triptofano ($\Delta\lambda= 60$ nm) na interação a) BSA-6CN10 e b) BSA-LQM10 com adição de incrementos do ligante (0-36 μ M).





Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela 8 - Fluorescência sincronizada para a interação BSA-6CN10 e BSA-LQM10.

Ligante	$\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$ (nm)	K_{sv} (10^5 L mol ⁻¹)	r	$\Delta\lambda$ (nm)
βLP	60	1,36	0,981	0
	15	0,46	0,986	+2
6CN10	60	3,80	0,981	-0,8
	15	-	0,986	-
LQM10	60	1,15	0,990	-2,5
	15	2,77	0,992	-2,6

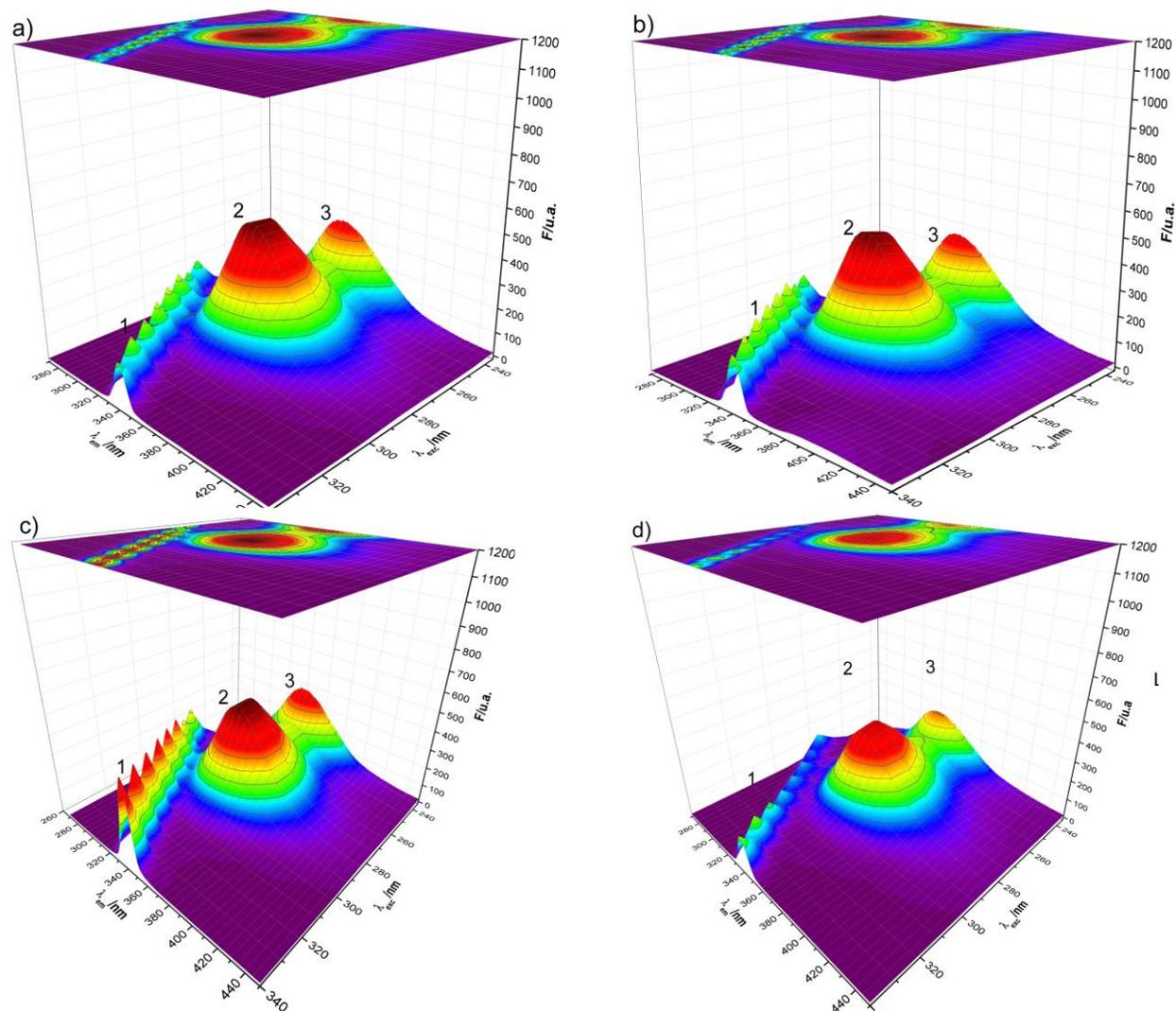
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.5 Fluorescência 3D

A fluorescência tridimensional é capaz de revelar mudanças conformacionais na estrutura proteica ocorridas a partir da interação com uma molécula (SIDDIQUI *et al.*, 2018). A Figura 42 mostra bandas em 3D características desta avaliação. Efeito espalhamento Rayleigh (banda 1) com comprimento de excitação igual ao de emissão ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$), resíduos aromáticos de tirosina e triptofano (banda 2, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 275/336$ nm) e a cadeia polipeptídica pela transição $\pi \rightarrow \pi^*$, devido a ligação da carbonila da ligação peptídica (banda 3, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 238/338$ nm) (WU *et al.*, 2021). De acordo com a Tabela 9, houve diminuição de fluorescência para todos os sistemas (BSA-βLP, BSA-6CN10 e BSA-LQM10) considerando a banda 2, referente ao sinal de dos resíduos aromáticos, indicando mudanças conformacionais

na proteína a partir da interação. A banda 3 não apresentou mudanças consideráveis, exceto a da interação com a molécula de guanilhidrazona. A maior mudança proteica, para as bandas 2 e 3, na estrutura da BSA foi provocada pelo LQM10, com diminuição do sinal de fluorescência de 25%. Esta maior mudança na estrutura da BSA está de acordo com a maior constante de ligação (K_b) entre todos os sistemas, em que é provável que uma ligação mais forte provoque maiores alterações na estrutura da macromolécula. Também houve deslocamento Stokes (Tabela 9) para as bandas 2 e 3, o que pode ser indícios que há mudanças na polaridade da proteína. Esta avaliação mostra que há mudanças conformacionais e de polaridade da proteína a partir da interação com os ligantes. De maneira similar, estudos de interação com base na fluorescência tridimensional entre piperaquina, fármaco antimalárico, e seus metabólitos com HSA mostrou que a partir da formação do complexo macromolécula-ligante ocorreu diminuição (valores não informados) nos picos característicos da proteína, indicando mudanças na estrutura secundária e terciária da proteína (MA *et al.*, 2019).

Figura 40 - Espectro de fluorescência tridimensional para BSA 2 μ M (a). Adição de b) β LP (50 μ M); c) 6CN10 (50 μ M) e d) LQM10 (50 μ M). Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM) a 27°C.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Tabela 9 - Espectro de fluorescência tridimensional para a interação BSA- β LP, BSA-6CN10 e BSA-LQM10.

Sistemas	Posição ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)				Intensidade de fluorescência	
	Trp+Tir	Stoke (nm)	Cadeia polipeptídica	Stokes (nm)	Trp + Tir	Cadeia Polipeptídica
BSA	275/337	62	238/340	102	507 (100%)	370 (100%)
BSA- β LP	275/341	66	238/338	100	482 (95,10%)	367 (99,20%)
BSA-6CN10	275/338	63	238/338	100	477 (94,10%)	385 (104,50%)
BSA-LQM10	275/337	62	238/338	100	384 (75,70%)	277 (75,00%)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo de interação simulando condições fisiológicas, ficou constatado, por UV-Vis, que há interação de β LP, 6CN10 e LQM10 com BSA, formando os complexos BSA- β LP, BSA-6CN10 e BSA-LQM10, respectivamente.

Todos os complexos são formados por *quenching* estático com formação de um complexo não fluorescente. O valor de K_b foi de $4,10 \times 10^3$, $1,69 \times 10^3$ e $3,31 \times 10^6$ para os sistemas BSA- β LP, BSA-6CN10 e BSA-LQM10, respectivamente, o que revela maior afinidade da proteína pelo LQM10. Em todos os sistemas a estequiometria ficou próxima de 1:1 (macromolécula-ligante).

De acordo com os parâmetros termodinâmicos, forças eletrostáticas governam as interações de β LP e LQM10 com a proteína. Já o nitrocomposto, majoritariamente, interage por forças da Van der Waals e ligações de hidrogênio.

Através da fluorescência sincronizada para avaliação dos resíduos que monitoram a interação, os valores de K_{sv} mostraram que para β LP e 6CN10, o resíduo mais próximo é o de triptofano, $1,36 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ e $3,80 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$, respectivamente. Contudo, para LQM10, o resíduo de tirosina mostrou-se uma sonda mais eficaz com $K_{sv} 2,77 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$.

A fluorescência tridimensional mostrou que há mudanças conformacionais na proteína a partir da interação com as moléculas. Sendo a maior mudança com adição de LQM10. Mostrando que quanto maior o valor de K_b maior mudanças na estrutura proteica.

6. PERSPECTIVAS

- Realizar estudos eletroquímicos das moléculas estudadas com BSA
- Realizar estudos de FRET
- Realizar estudos de competidores

7. REFERÊNCIAS

Banco de dados biológicos ,_https://www.sasbdb.org/_ com acesso em 02/08/2021 às 19h.

ABDULLAH, A.; MOHAMMED, A. Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. **International Conference on Hydraulics and Pneumatics**, n. January, p. 1–9, 2019.

ABRAHAM, I. et al. Recent Advances in 1,4-Benzoquinone Chemistry. v. 22, n. 3, p. 1–37, 2011.

AI, X. D.; OMPTON, R. G. C. Direct Electrodeposition of Gold Nanoparticles onto Indium Tin Oxide Film Coated Glass: Application to the Detection of Arsenic(III). **Analytical Sciences**, v. 22, n. April, p. 3212, 2006.

ALESSIO, P. et al. Combining SERRS and electrochemistry to characterize sensors based on biomembrane mimetic models formed by phospholipids. **RSC Advances**, v. 1, n. 2, p. 211–218, 2011.

ALMEIDA, A. K. A. **Síntese e caracterização Espectroeletróquímica de Derivados Eletrocromáticos e Fluorescentes de Polipirrol e Politiofeno**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2016.

ALVES MELO JR, M.; SAMUEL SOARES SANTOS, L.; DO CARMO GONÇALVES ANA FLÁVIA NOGUEIRA, M. Preparación de nanopartículas de plata y oro: un método simple para la introducción de la nanociencia en el laboratorio de Ensino. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

ANDO, T. High-speed atomic force microscopy and its future prospects. **Biophysical Reviews**, v. 10, n. 2, p. 285–292, 2018.

ANTONIO-ANTONIO, F. et al. PAMAM dendron-grafted poly(vinyl alcohol) via click reaction. **Materials Chemistry and Physics**, v. 275, p. 125215, 1 jan. 2022.

AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. **Drug Targeting in Anticancer Chemotherapy**. [s.l.: s.n.].

AYDIN, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. **Indium tin oxide (ITO): A promising material in biosensing technology**TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2017.

AZEVEDO DE BRITO, W. et al. Development and Validation of HPLC-DAD and UHPLC-DAD Methods for the Simultaneous Determination of Guanyldrazone Derivatives Employing a Factorial Design. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 9, p. 1–15, 2017.

BANISHEYKHOLESAMI, F.; HOSSEINI, M.; NAJAFPOUR DARZI, G. Design of PAMAM grafted chitosan dendrimers biosorbent for removal of anionic dyes: Adsorption isotherms, kinetics and thermodynamics studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 306–316, 30 abr. 2021.

BANSOD, B. K. et al. **A review on various electrochemical techniques for heavy metal ions detection with different sensing platforms**Biosensors and Bioelectronics, 2017.

BARBARA BALLARIN, DAVIDE BARRECA, MARIA CRISTINACASSANI, G. Goldnanoparticles-decoratedfluoroalkylsilanenano-assembliesforelectrocatalyticapplications.

Applied Surface Science, p. 1–19, 2016.

BOYD, B. J. et al. Successful oral delivery of poorly water-soluble drugs both depends on the intraluminal behavior of drugs and of appropriate advanced drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 137, p. 104967, 1 set. 2019.

BRETT, A. M.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica, Princípios, Métodos e Aplicações**. New York: Oxford University Press Inc., 1996.

BÜRGI, T. Properties of the gold-sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters. **Nanoscale**, v. 7, n. 38, p. 15553–15567, 2015.

BUTNARASU, C. et al. Interaction of squaraine dyes with proteins: Looking for more efficient fluorescent turn-on probes. **Dyes and Pigments**, v. 184, p. 108873, 1 jan. 2021.

BYADAGI, K. et al. Investigation of binding behaviour of procainamide hydrochloride with human serum albumin using synchronous, 3D fluorescence and circular dichroism. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 2, p. 103–109, 2017.

CANDIDO, A. C. L. et al. Electrochemical and spectroscopic characterization of the interaction between β -lapachone and PAMAM derivatives immobilized on surface electrodes. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 22, n. 5, p. 1581–1590, 2018.

CÂNDIDO, A. C. L. **ESTUDO ELETROQUÍMICO DA INTERAÇÃO DE QUINONA DE INTERESSE BIOLÓGICO E DENDRÍMERO PAMAM DE 2º E 3º GERAÇÃO**. [s.l.] UFAL, 2017.

CARVALHO, L. A. DE; ANDRADE, A. R. DE. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA APLICADA AO ESTUDO DAS REAÇÕES HETEROGÊNEAS EM ÂNODOS DIMENSIONALMENTE ESTÁVEIS. **Química Nova**, v. 29, p. 796–804, 2006.

CARVALHO, L. A. DE; ANDRADE, A. R. DE; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796–804, jul. 2006.

CASSAGNES, L. E. et al. Oxidative stress and neurodegeneration: The possible contribution of quinone reductase 2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 120, p. 56–61, 20 maio 2018.

CHANDRA, S. et al. An Undergraduate-Level Electrochemical Investigation of Gold Nanoparticles-Modified Physically Small Carbon Electrodes. **World Journal of Chemical Education**, v. 4, n. 5, p. 93–100, 2016.

CHEN, Z. et al. Fabrication of highly transparent and conductive indium-tin oxide thin films with a high figure of merit via solution processing. **Langmuir**, v. 29, n. 45, p. 13836–13842, 2013.

CHENG, W. et al. Interaction mechanism between resveratrol and ovalbumin based on fluorescence spectroscopy and molecular dynamic simulation. **LWT**, v. 146, p. 111455, 1 jul. 2021.

CHENG, Y. et al. Dendrimers as drug carriers: Applications in different routes of drug administration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008.

CHI, Q. et al. Interactions of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid with serum albumins by native mass spectrometry, fluorescence and molecular docking. **Chemosphere**, v. 198, p. 442–449, 1 maio 2018.

CHIEN, S. C. et al. Naturally occurring anthraquinones: Chemistry and therapeutic potential in autoimmune diabetes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. Figure 1, 2015.

CHINNADAYYALA, S. R. et al. Electrochemical impedance characterization of cell growth on reduced graphene oxide-gold nanoparticles electrodeposited on indium tin oxide electrodes. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 9, n. 2, 2019.

CIUCCI, F. **Modeling electrochemical impedance spectroscopy** *Current Opinion in Electrochemistry*, 2019.

COLOMBO, R. N. P. et al. Porous polymeric templates on ITO prepared by breath figure method for gold electrodeposition. **Electrochimica Acta**, 2015.

COSTENTIN, C.; SAVÉANT, J. M. Ohmic drop correction in electrochemical techniques. Multiple potential step chronoamperometry at the test bench. **Energy Storage Materials**, v. 24, p. 1–3, 1 jan. 2020.

CRESPI, F. Differential Pulse Voltammetry: Evolution of an In Vivo Methodology and New Chemical Entries, A Short Review. **Journal of New Developments in Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 20–28, 2020.

CZARNIK-KWAŚNIAK, J. et al. Glucoheptoamidated polyamidoamine PAMAM G3 dendrimer as a vehicle for succinate linked doxorubicin; enhanced toxicity of DOX against grade IV glioblastoma U-118 MG cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101424, 1 fev. 2020.

DANTAS, N. et al. Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpress NorA efflux pump. **Chemico-Biological Interactions**, 2018.

DE LIMA FRANÇA, C. C. et al. The electrochemical behavior of core-shell CdSe/CdS magic-sized quantum dots linked to cyclodextrin for studies of the encapsulation of bioactive compounds. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2533–2540, 2016.

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Quimica Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

DHIBI, O. et al. Effect of thin gold interlayer on the electrical and dielectrical behaviors of ITO/MEH-PPV/Al structures. **Microelectronic Engineering**, v. 129, n. C, p. 24–30, 2014.

DODANGEH, M. et al. Functionalization of PAMAM dendrimers with curcumin: Synthesis, characterization, fluorescent improvement and application on PET polymer. **Dyes and Pigments**, v. 174, p. 108081, 1 mar. 2020.

EL-MESSERY, T. M. et al. Spectroscopic studies of the interaction between isolated polyphenols from coffee and the milk proteins. **Surfaces and Interfaces**, v. 20, n. February, p. 100558, 2020.

ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold

nanoparticles: A review. **Talanta**, v. 184, p. 537–556, 1 jul. 2018.

ELEAMEN, G. R. A. et al. Improvement of solubility and antifungal activity of a new aminothiophene derivative by complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 1, p. 116–125, 2017.

FARMANZADEH, D.; GHADERI, M. A computational study of PAMAM dendrimer interaction with trans isomer of picoplatin anticancer drug. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 2018.

FATHI, F. et al. Kinetic and thermodynamic insights into interaction of albumin with piperacillin: Spectroscopic and molecular modeling approaches. **Journal of Molecular Liquids**, v. 296, p. 111770, 15 dez. 2019.

FENG, B. et al. A sensitive LSPR sensor based on glutathione-functionalized gold nanoparticles on a substrate for the detection of Pb²⁺ ions. **RSC Advances**, v. 8, n. 8, p. 4049–4056, 2018.

FENG, T. et al. Deposition of gold nanoparticles upon bare and indium tin oxide film coated glass based on annealing process. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 14, n. 1, p. 13–22, 2019.

FERNANDES, M. C. S.; PAULIN FILHO, P. I.; MORELLI, M. R. Análise da superfície de grês porcelanato por microscopia de força atômica. **Cerâmica**, v. 57, n. 342, p. 173–179, jun. 2011.

FOLKERTSMA, L. et al. Reference-Electrode Free pH Sensing Using Impedance Spectroscopy. **Proceedings**, v. 2, n. 13, p. 742, 2018.

FUKUMA, T.; GARCIA, R. Atomic- and Molecular-Resolution Mapping of Solid–Liquid Interfaces by 3D Atomic Force Microscopy. **ACS Nano**, v. 12, n. 12, p. 11785–11797, 13 nov. 2018.

G. ACRES, R. et al. Mechanisms of Aggregation of Cysteine Functionalized Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 19, p. 10481–10487, 5 maio 2014.

GANG, G. T. et al. Protection of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 against renal ischemia/reperfusion injury in mice. **Free Radical Biology and Medicine**, 2014.

GIANNATOU, E. et al. Deep learning denoising of SEM images towards noise-reduced LER measurements. **Microelectronic Engineering**, 2019.

GOLSHAN, M. et al. A review on synthesis, photophysical properties, and applications of dendrimers with perylene core. **European Polymer Journal**, v. 137, p. 109933, 15 ago. 2020.

GROCHOWSKA, K. et al. Functionalization of indium-tin-oxide electrodes by laser-nanostructured gold thin films for biosensing applications. **Applied Surface Science**, 2015.

H. MEDINA, S.; E. H. EL-SAYED, M. Dendrimers as Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Agents. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 3141–3157, 17 jun. 2009.

HAISS, W. et al. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from

- UV–Vis Spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215–4221, 26 abr. 2007.
- HAO, C. et al. Fluorescence quenching study on the interaction of ferroferric oxide nanoparticles with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 184, p. 191–197, 5 set. 2017.
- HARRISON, E. et al. Peptide functionalized gold nanoparticles: The influence of pH on binding efficiency. **Nanotechnology**, v. 28, n. 29, 2017.
- HU, Y. J. et al. Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method. **Journal of Molecular Structure**, v. 750, n. 1–3, p. 174–178, 2005.
- JALILI, N.; LAXMINARAYANA, K. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. **Mechatronics**, v. 14, n. 8, p. 907–945, 1 out. 2004.
- JIANG, J. et al. The effect of non-covalent interaction of chlorogenic acid with whey protein and casein on physicochemical and radical-scavenging activity of in vitro protein digests. **Food Chemistry**, v. 268, p. 334–341, 1 dez. 2018.
- JOHN R.GIUDICESSI, BA.MICHAEL J.ACKERMAN., 2013. Dendrimers as drug delivery vehicles: non-covalent interactions of bioactive compounds with dendrimers. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.
- KATHURIA, D. et al. Ring-chain isomerism in conjugated guanylhydrazones: Experimental and theoretical study. **Tetrahedron**, 2018.
- KHATUN, S. et al. Calorimetric, spectroscopic and molecular modelling insight into the interaction of gallic acid with bovine serum albumin. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 122, p. 85–94, 1 jul. 2018.
- KLEIN, T.; BUHR, E.; GEORG FRASE, C. TSEM: A Review of Scanning Electron Microscopy in Transmission Mode and Its Applications. **Advances in Imaging and Electron Physics**, v. 171, p. 297–356, 1 jan. 2012.
- KOLOTYLO, M. et al. Synthesis of sulfonimide-based dendrimers and dendrons possessing mixed 1 → 2 and 1 → 4 branching motifs. **Tetrahedron Letters**, v. 60, n. 4, p. 352–354, 24 jan. 2019.
- KONDRATYEVA, Y. O. et al. Chronoamperometric and coulometric analysis with ionophore-based ion-selective electrodes: A modified theory and the potassium ion assay in serum samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 310, p. 127894, 1 maio 2020.
- LAÍÑO MARTA, E.DÍAZ-GARCÍAJOSEFA, A. G. C. Fluorescence | Multidimensional Fluorescence Spectrometry. **Encyclopedia of Analytical Science**, p. 301–308, 2019.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. [s.l: s.n.].
- LEE, J. Electrochemical Sensing of Oxygen Gas in Ionic Liquids on Screen Printed Electrodes. n. October, p. 251, 2014.
- LI, J. et al. Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimer mediated delivery of drug and pDNA/siRNA for cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 546, n. 1–2,

p. 215–225, 30 jul. 2018.

LI, X. Y. et al. Synthesis of a IAP antagonist analogue and its binding investigation with BSA/HSA. **Journal of Molecular Structure**, v. 1251, p. 131989, 5 mar. 2022.

LI, Y. et al. A poly(amidoamine) dendrimer-based drug carrier for delivering DOX to gliomas cells. **RSC Advances**, v. 7, n. 25, p. 15475–15481, 2017.

LIU, X. et al. Enhanced photocatalytic properties of α -SnWO₄ nanosheets modified by Ag nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 490, p. 46–52, 2017.

LÓPEZ, L. I. L. et al. Naphthoquinones: Biological Properties and Synthesis of Lawsone and Derivatives — a Structured Review. **Vitae**, v. 21, n. 3, p. 248–258, 2014.

LV, L. et al. PVP-coated gold nanoparticles for the selective determination of ochratoxin A via quenching fluorescence of the free aptamer. **Food Chemistry**, v. 249, p. 45–50, 30 maio 2018.

MA, R. et al. Spectroscopic methodologies and molecular docking studies on the interaction of antimalarial drug piperazine and its metabolites with human serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 222, p. 117158, 5 nov. 2019.

MAKARSKA-BIALOKOZ, M. Interactions of hemin with bovine serum albumin and human hemoglobin: A fluorescence quenching study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 193, p. 23–32, 15 mar. 2018.

MANOUCHEHRI, F. et al. Experimental, computational and chemometrics studies of BSA-vitamin B6 interaction by UV–Vis, FT-IR, fluorescence spectroscopy, molecular dynamics simulation and hard-soft modeling methods. **Bioorganic Chemistry**, v. 68, p. 124–136, 1 out. 2016.

MARQUES, G. C. **APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (EIE) NA INVESTIGAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO BIODIESEL DE DENDÊ (*Elaeis guineensis*)**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, 2011.

MEI, FANGSHENG; YUAN, TIECHUI; CHU, AIMIN; LI, R. Comparative study on the microstructure and properties of 10 wt%- and 35wt%- tin doped indium oxide materials.pdf. **Journal of the European Ceramic Society**, 2019.

NAN, Z. et al. Interaction of graphene oxide with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 210, p. 348–354, 5 mar. 2019.

NAZEM-BOKAEE, H. et al. Probing pore structure of virus filters using scanning electron microscopy with gold nanoparticles. **Journal of Membrane Science**, v. 552, p. 144–152, 15 abr. 2018.

NOEL, G. et al. Nano- and micro-mechanical properties of wheat grain by atomic force microscopy (AFM) and nano-indentation (IIT) and their relationship with the mechanical properties evaluated by uniaxial compression test. **Journal of Cereal Science**, v. 90, n. September, p. 102830, 2019.

- OLIVEIRA, M. E. F. A. G. et al. Evaluation of acute toxicity of β -lapachone associated with chitosan as a cytoprotective agent. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 54, n. 5, p. 279–287, 2018.
- OLSON, J. et al. Chem Soc Rev Optical characterization of single plasmonic nanoparticles. **Chem Soc Rev**, p. 40–57, 2015.
- OZKARTAL, A. Characterization of the ITO/p-Si/Al contacts produced by thermal evaporation. **Vacuum**, 2019.
- P. BALDWIN, R.; RAVICHANDRAN, K.; K. JOHNSON, R. A cyclic voltammetry experiment for the instrumental analysis laboratory. **Journal of Chemical Education**, v. 61, n. 9, 1 set. 1984.
- PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A brief review about concepts. **Revista Virtual de Quimica**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.
- PANG, W. et al. Preparation of Curcumin–Piperazine Coamorphous Phase and Fluorescence Spectroscopic and Density Functional Theory Simulation Studies on the Interaction with Bovine Serum Albumin. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, p. 3013–3024, 3 ago. 2017.
- PARK, J. S. et al. β -Lapachone increases phase II antioxidant enzyme expression via NQO1-AMPK/PI3K-Nrf2/ARE signaling in rat primary astrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, 2016.
- PARK, S. et al. Beta-lapachone attenuates immobilization-induced skeletal muscle atrophy in mice. **Experimental gerontology**, 2019.
- PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013–1020, 2009.
- PINK, J. J. et al. Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during β -lapachone-mediated apoptosis. **Experimental Cell Research**, 2000.
- PRASAD, A. R. et al. Investigation on Bovine Serum Albumin (BSA) binding efficiency and antibacterial activity of ZnO nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 240, p. 122115, 15 jan. 2020.
- PUTHONGKHAM, P.; VENTON, B. J. Recent advances in fast-scan cyclic voltammetry. **Analyst**, v. 145, n. 4, p. 1087–1102, 2020.
- RABBANI, G. et al. Biophysical Study on the Interaction between Eperisone Hydrochloride and Human Serum Albumin Using Spectroscopic, Calorimetric, and Molecular Docking Analyses. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 1656–1665, 17 abr. 2017.
- RÀFOLS, C. et al. Molecular interactions between warfarin and human (HSA) or bovine (BSA) serum albumin evaluated by isothermal titration calorimetry (ITC), fluorescence spectrometry (FS) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 150, p. 452–459, 20 fev. 2018.
- RAJI, K. et al. Neem seed derived green C-dots: A highly sensitive luminescent probe for aqueous Au³⁺ ions and nurtures green gold recovery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 641, p. 128523, 20 maio 2022.

RAMALINGAM, V. Multifunctionality of gold nanoparticles: Plausible and convincing properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2019.

RAMU, A. G. et al. A facile and green synthesis of CuO/NiO nanoparticles and their removal activity of toxic nitro compounds in aqueous medium. **Chemosphere**, v. 271, p. 129475, 1 maio 2021.

RIBEIRO, D.V.; SOUZA, C. A. C.; ABRANTES, J. C. C. Uso da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) para monitoramento da corrosão em concreto armado. **RIEM - IBRACON Structures and Materials Journal**, v. 8, n. 4, 2015.

ROLIM, T.; CANCINO, J.; ZUCOLOTTO, V. A nanostructured genosensor for the early diagnosis of systemic arterial hypertension. **Biomedical Microdevices**, v. 17, n. 1, 2015.

RUIZ-BARRERA, O. et al. Nitro-treatment of composted poultry litter; effects on Salmonella, E. coli and nitrogen metabolism. **Bioresource Technology**, v. 310, p. 123459, 1 ago. 2020.

SANTANA, C. C. et al. Evaluation of guanylhydrazone derivatives as inhibitors of Candida rugosa digestive lipase: Biological, biophysical, theoretical studies and biotechnological application. **Bioorganic Chemistry**, 2019.

SANTOS, J. C. N. et al. Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1032–1040, 1 jul. 2018.

SEPÚLVEDA-CRESPO, D. et al. **Polyanionic carbosilane dendrimer-conjugated antiviral drugs as efficient microbicides: Recent trends and developments in HIV treatment/therapy** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2015.

SIDDIQUI, G. A. et al. Probing the binding of phenolic aldehyde vanillin with bovine serum albumin: Evidence from spectroscopic and docking approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 203, p. 40–47, 5 out. 2018.

SILVA, M. P. G. DA et al. Electrochemical investigation of the toxicity of a new nitrocompound and its interaction with β -cyclodextrin and polyamidoamine third-generation. **Electrochimica Acta**, v. 251, p. 442–451, 2017.

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**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2018.

SKOOG, WEST, HOLLER, C. **Fundamentos de Química Analítica**. 8^o ed. São Paulo: Thomson, [s.d.].

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; DE ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486–495, 2016.

SPYROPOULOS-ANTONAKAKIS, N. et al. Selective aggregation of PAMAM dendrimer nanocarriers and PAMAM/ZnPc nanodrugs on human atherosclerotic carotid tissues: a photodynamic therapy for atherosclerosis. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2015.

STANKEVIČIUS, E. et al. Engineering electrochemical sensors using nanosecond laser treatment of thin gold film on ITO glass. **Electrochimica Acta**, 2019.

STAROWICZ, Z. et al. The tuning of the plasmon resonance of the metal nanoparticles in terms of the SERS effect. **Colloid and Polymer Science**, v. 296, n. 6, p. 1029–1037, 2018.

SUN, A. et al. Two novel phenanthraquinones with anti-cancer activity isolated from *Bletilla striata*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2016.

SUN, D. et al. Voltammetric aptamer based detection of HepG2 tumor cells by using an indium tin oxide electrode array and multifunctional nanoprobe. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 9, p. 3487–3496, 22 set. 2017.

SURYAWANSHI, V. D. et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 1, p. 56–63, 1 fev. 2016.

SYMONS, P. Quinones for redox flow batteries. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 29, p. 100759, 1 out. 2021.

TAGHAVI POURIANAZAR, N.; MUTLU, P.; GUNDUZ, U. Bioapplications of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers in nanomedicine. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 4, 2014.

URAM, Ł. et al. Cellular uptake of glucoheptoamidated poly(amidoamine) PAMAM G3 dendrimer with amide-conjugated biotin, a potential carrier of anticancer drugs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2017.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. John Wiley ed. New Jersey: [s.n.].

WANI, T. A. et al. Evaluation of competitive binding interaction of neratinib and tamoxifen to serum albumin in multidrug therapy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 227, p. 117691, 15 fev. 2020.

WAZIR, M. B. et al. Dendrimer assisted dye-removal: A critical review of adsorption and catalytic degradation for wastewater treatment. **Journal of Molecular Liquids**, v. 315, p. 113775, 1 out. 2020.

WEI, W. et al. Electron-beam irradiation induced optical transmittance enhancement for Au/ITO and ITO/Au/ITO multilayer thin films. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 33, n. 10, p. 1107–1112, 2017.

WORMELL, P. Absorption Spectroscopy: Relationship of Transition Type to Molecular Structure. In: **Encyclopedia of Biophysics**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 35–38.

WU, X. et al. Investigation of interactions between zein and natamycin by fluorescence spectroscopy and molecular dynamics simulation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 327, p. 114873, 1 abr. 2021.

XAVIER, J. A. et al. Unveiling the relevance of the redox character of nitroaromatic and nitroheteroaromatic compounds as potential medicines. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 29, p. 100740, 1 out. 2021.

XIAO, W. et al. Influence of ligands property and particle size of gold nanoparticles on the protein adsorption and corresponding targeting ability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 538, n. 1–2, p. 105–111, 1 mar. 2018.

YADAV, A.; SHARAN, P.; KUMAR, A. Surface plasmonic resonance based five layered structure-biosensor for sugar level measurement in human. **Results in Optics**, v. 1, p. 100002, 1 nov. 2020.

YADAV, B. C. et al. Fabrication and characterization of nanostructured indium tin oxide film and its application as humidity and gas sensors. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 27, n. 5, p. 4172–4179, 2016.

YANG, L. et al. A red-emitting water-soluble fluorescent probe for biothiol detection with a large Stokes shift. **Chinese Chemical Letters**, v. 30, n. 3, p. 563–565, 1 mar. 2019.

YANG, M. et al. A new approach to characterising the porosity of particle modified electrodes: Potential step chronoamperometry and the diffusion indicator. **Applied Materials Today**, v. 25, p. 101249, 1 dez. 2021.

ZAHEER, Z.; KOSA, S. A.; AKRAM, M. Interactions of Ag⁺ ions and Ag-nanoparticles with protein. A comparative and multi spectroscopic investigation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 335, p. 116226, 1 ago. 2021.

ZEA, M. et al. Electrochemical sensors for cortisol detections: Almost there. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 132, p. 116058, 1 nov. 2020.

ZHANG, K. et al. Electrodeposition of gold nanoparticle arrays on ITO glass as electrode with high electrocatalytic activity. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 3, p. 1338–1341, 2013a.

ZHANG, K. et al. Electrodeposition of gold nanoparticle arrays on ITO glass as electrode with high electrocatalytic activity. **Materials Research Bulletin**, 2013b.

ZHANG, Y. et al. Chitosan coated on the layers' glucose oxidase immobilized on cysteamine/Au electrode for use as glucose biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 60, p. 271–276, 2014.

ZOSKY, C. G. **Handbook of Electrochemistry**. 1^o ed. [s.l: s.n.].

ZUBER, A. et al. Detection of gold nanoparticles with different sizes using absorption and fluorescence based method. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, 2016.