

## Funcionalização da superfície de pontos quânticos calcôgenetos (CdSe) com lipossomas furtivos de pH sensível: estratégia para liberação controlada de fármacos

### Calcogenic quantum dots surface functionalization (CdSe) with pH sensitive stealth liposomes: strategy for controlled drug release

#### RESUMO

**Caio César Soares**  
[Caio8135@gmail.com](mailto:Caio8135@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil.

**Luís Fernando Cabeça**  
[luiscabeca@utfpr.edu.br](mailto:luiscabeca@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil.

**Fernando de Moura Sommer**  
[Fernando.sommer@hotmail.com](mailto:Fernando.sommer@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil.

Os sistemas de liberação de fármacos “Drugs delivery systems”, controlam tanto a taxa de liberação dos fármacos quanto ao sítio a ser liberado, apresentando inúmeras vantagens quando comparados com outros sistemas convencionais. Entre as moléculas e sistemas estudados para o encapsulamento de ativos, os lipossomas são sistemas transportadores eficientes de biomoléculas. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento dos lipossomas furtivos (LF) de pH sensível através da funcionalização das nanopartículas de ponto quântico (CdSe) para o desenvolvimento de lipossomas teranósticos (sistemas para imagem e tratamento). Para a caracterização dos lipossomas teranósticos (SPC, DDAB, CHEMS, TWEEN-80 e DSPE-PEG-2000 a uma razão molar 20:25:49:1:5), foram realizadas medidas de fotoluminescência para verificar a funcionalização dos pontos quânticos e medidas de espalhamento dinâmico de luz para confirmar a sensibilidade do lipossoma à variação do pH. Os resultados mostraram a funcionalização do ponto quântico em LF porém o lipossoma não apresentou sensibilidade a variação de pH.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lipossomas furtivos. Lipossomas pH sensível. Sistema de liberação. Pontos Quânticos (CdSe).

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



#### ABSTRACT

The drugs delivery systems can control both the drug release and the site of action, showing countless advantages compared to other conventional systems. Among the molecules and systems studied for the encapsulation, the liposomes are the most efficient carrier systems for biomolecules. The objective of this study was the development of pH sensitive stealth liposomes (LF) through the functionalization of nanoparticles of quantum dot (CdSe) for the development of theranostic liposomes (imaging and treatment systems). For the characterization of theranostic liposomes (SPC, DDAB, CHEMS, TWEEN-80 e DSPE-PEG-2000 at a molar ratio 20:25:49:1:5), photoluminescence measurements were performed to verify quantum dots functionalization and dynamic light scattering measurements to confirm liposomes sensitivity to pH variation. The results showed the functionalization of the quantum dots in LF, however the liposome showed no sensitivity to pH variation.

**KEYWORDS:** Stealthy liposomes. Sensitive pH liposomes. Delivery Systems. Quantum Dots (CdSe)

## INTRODUÇÃO

Ao longo dos tempos, a utilização da maioria dos compostos terapêuticos tem sido sempre limitada pela posologia, retenção ou degradação do ativo, pequena solubilidade e, principalmente, pelos efeitos adversos provenientes da dosagem necessária para se atingir a ação terapêutica desejada. Estas dificuldades impulsionaram pesquisas no sentido de desenvolver sistemas capazes de transportar o ativo terapêutico até o alvo específico para diminuir os efeitos indesejáveis e aumentar a eficiência, com decréscimo da dose administrada.

Entre as moléculas e sistemas estudados na química supramolecular os lipossomas são sistemas transportadores eficientes de biomoléculas (LASIC, et al., 1995). Lipossomas mais eficientes com longo tempo de duração no sistema circulatório dão origem aos lipossomas furtivos (LF) (lipossomas com superfície modificada com polímeros – PEG) (BOERMAN, et al., 2000). Os LF ainda podem apresentar especificidade de interação dos lipossomas com as células-alvo através do preparo dos lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada, os quais podem apresentar melhor eficiência em regiões tumorais que apresentam pH menor que o sistema circulatório (FATTAL et al., 2004). As vesículas lipossomais podem ainda ser modificadas para facilitar simultaneamente o diagnóstico e terapia, são os chamados lipossomas teranósticos. Agentes para bioimagem tais como os pontos quânticos “Quantum Dots” podem ser encapsulados na parte hidrofóbica do lipossoma ou ligados covalentemente em sua superfície (MUTHUA, et al., 2012). Portanto, o objetivo central do trabalho é a funcionalização de nanopartículas de pontos quânticos CdSe nas vesículas de lipossomas furtivos pH sensível.

## METODOLOGIA

### PREPARAÇÃO DO LIPOSSOMA FURTIVO DE PH SENSÍVEL PARA A FUNCIONALIZAÇÃO DE PONTO QUÂNTICO, UTILIZANDO O MÉTODO DE INJEÇÃO

As vesículas lipossomais foram preparadas através do método de injeção (Wang, et al., 2011). Primeiramente foi preparado o lipossoma furtivo de pH sensível contendo fosfatidilcolina de soja (SPC), brometo de diododecildimetilamônio (DDAB), hemisuccinato de colesterol (CHEMS), monooleato de polioxietilenossorbitano (TWEEN-80) e polietilenoglicol DSPE-PEG-2000 a uma razão molar de 20:25:49:1:5. Em um béquer de 10 mL adicionou-se 0,00315475 g de DDAB, 0,004769 g de CHEMS, 24,6 µL de T-80, 70,46 µL de SPC e 23,68 µL DSPE-PEG-2000. Os componentes foram solubilizados em clorofórmio. Em seguida, foi adicionado 300 µL de etanol, 50 µL de seleneto de cádmio (CdSe 0,8 µM). Essa amostra foi injetada em 2,6 mL de uma solução tampão de fosfato de sódio variando o pH (7,4; 7,0; 6,6; 6,2; 5,8; 5,0). As soluções foram aquecidas sob agitação à temperatura de 60 ° C por uma hora. Em seguida as amostras foram extrusadas em um mini extrusor Avanti Polar com membrana de policarbonato de 400 nm.

### PREPARAÇÃO DO LIPOSSOMA FURTIVO DE PH SENSÍVEL PARA A FUNCIONALIZAÇÃO DE PONTO QUÂNTICO, UTILIZANDO O MÉTODO DE FORMAÇÃO DO FILME LIPÍDICO

Para a preparação dos lipossomas furtivos foram utilizados: fosfatidilcolina de soja (SPC), brometo de diododecildimetilamônio (DDAB), hemisuccinato de colesterilo (CHEMS), monooleato de polioxietilenossorbitano (TWEEN-80) e polietilenoglicol DSPE-PEG-2000 a uma razão molar de 20:25:49:1:5. Os componentes foram solubilizados em clorofórmio juntamente com CdSe 0,8  $\mu\text{M}$  e posteriormente o solvente foi retirado por evaporação à temperatura ambiente para obtenção de um filme lipídico (HAERI et al., 2013). Em seguida, os lipídeos foram hidratados com solução tampão 7,4 e agitado no vortex. A mistura foi transferida para um mini extrusor Avanti Polar com membrana de policarbonato de 400 nm.

### ENSAIO DE FOTOLUMINESCÊNCIA

A fim de confirmar a manutenção da fluorescência dos pontos quânticos após seu encapsulamento na bicamada lipídica, foi realizada a técnica de fotoluminescência, que consiste na excitação da amostra por meio de um *laser*, com uma angulação de aproximadamente 30°. Para o teste foi utilizado amostras de lipossoma furtivo juntamente com o ponto quântico (CdSe) e lipossoma furtivo de pH sensível com o ponto quântico (CdSe).

A técnica foi realizada no laboratório DFMnano da UTFPR Londrina.

### DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA PARTÍCULA DE LIPOSSOMA FURTIVO DE PH SENSÍVEL

O diâmetro hidrodinâmico (DH) foi determinado utilizando um Zetasizer NanoPlus (NanoPlus Particle Size Analyzer) do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. As formulações foram dispersas em água ultrapura e as medidas físicas foram realizadas a 25,0 °C.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

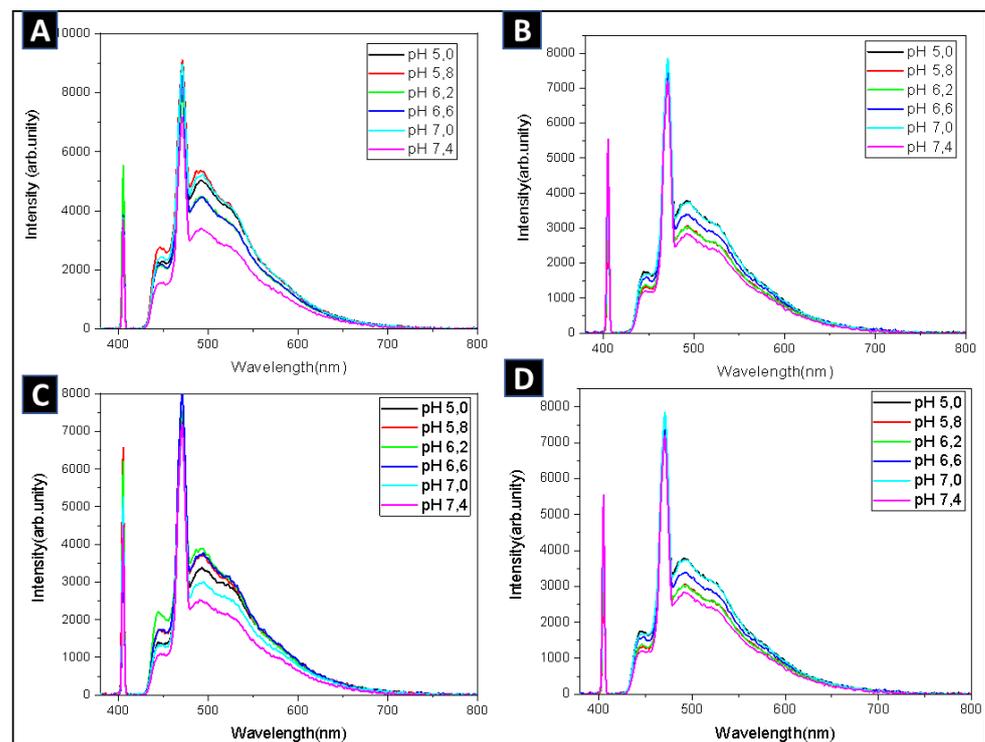
### PREPARAÇÃO DO LIPOSSOMA FURTIVO DE PH SENSÍVEL PARA A FUNCIONALIZAÇÃO DE PONTO QUÂNTICO, UTILIZANDO O MÉTODO DE INJEÇÃO

O primeiro teste realizado foi a funcionalização do CdSe nas vesículas lipossomais (fosfatidilcolina de soja (SPC), brometo de diododecildimetilamônio (DDAB), hemisuccinato de colesterilo (CHEMS), monooleato de polioxietilenossorbitano (TWEEN-80) e polietilenoglicol DSPE-PEG-2000 a uma razão molar de 20:25:49:1:5). Em virtude do ponto quântico ser insolúvel em água optou-se por utilizar o método de injeção etanólica para preparação dos lipossomas (WANG, et al., 2011). Partindo de 10 mM de concentração de lipossoma e 0,8  $\mu\text{M}$  de CdSe.

Desse modo foram preparadas amostras de lipossomas em solução tamponada variando o pH (tampão fosfato 7,4; 7,0; 6,6; 6,2) e (tampão acetato 5,8; 5,0). As amostras foram levadas para análise de fotoluminescência (Figura 1). Essa análise foi realizada de 30 em 30 minutos depois do preparo e observou-se que a maior intensidade de emissão, em geral, foi para o pH 5,0 e que a menor intensidade foi encontrada para o pH 7,4. Isso pode ser interpretado de modo que

para pH maiores ocorre uma maior encapsulação e em pH menores uma menor encapsulação. Em compensação, quando as nanopartículas estão encapsuladas há uma diminuição da intensidade relacionada com um ambiente menos propício a emissão. Isso indica também que o lipossoma estudado não se tratava de um lipossoma do tipo pH sensível, pois esperava-se uma variação da intensidade com o passar do tempo. Em contrapartida foi possível comprovar a funcionalização do ponto quântico (CdSe).

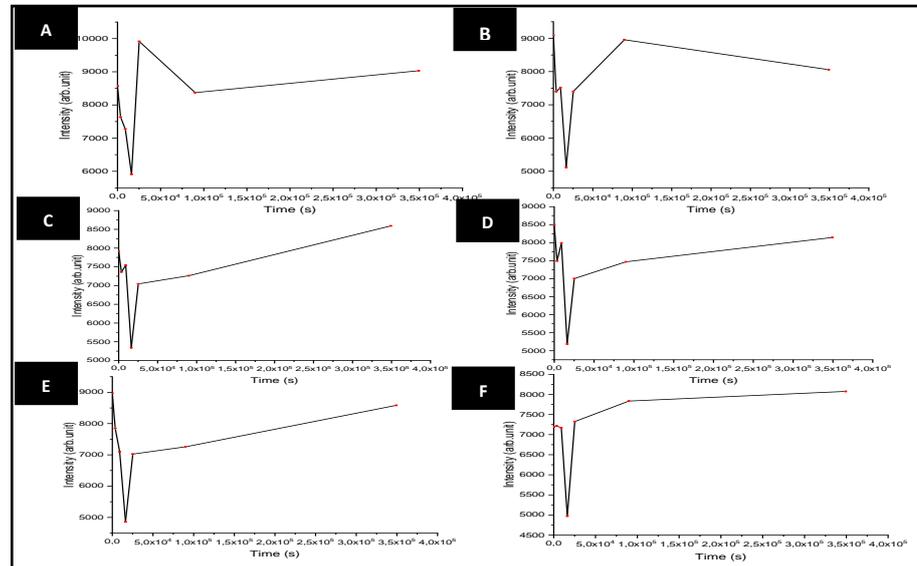
**Figura 1.** Absorção óptica do lipossoma furtivo pH sensível/CdSe para os pHs (7,4; 6,6;6,2; 5,8; 5,0). Experimento realizado em (A) 0 hora; (B) 30 minutos; (C) 1 hora; e (D) 1 hora e 30 minutos após o preparo.



Fonte: Autoria própria.

Para verificar se a formulação lipossomal era formado por lipossomas furtivos de pH sensível, um novo teste foi realizado utilizando fotoluminescência com intervalos de medidas com tempos menores (Figura 2). A Figura 2 mostra o mesmo perfil de liberação para todos os pHs: uma diminuição da intensidade de emissão nas primeira horas, seguido de um aumento da mesma. Esperava-se que a intensidade de emissão variasse somente para os pHs menores que 6,2 (lipossomas pH sensível rompem-se em pHs ácidos) e uma estabilidade da emissão em pH neutro. Para solucionar esta inconsistência uma nova rota de preparação foi realizada utilizando um novo método de preparo.

**Figura 2.** Intensidade (unid.arb) por tempo (s) para a comprovação da quebra do lipossoma furtivo de pH sensível. Experimento realizado variando os pHs em que (A) pH 5,0; (B) pH 5,8; (C) pH 6,2;(D) pH 6,6; (E) pH 7,0; e (F) pH 7,4.



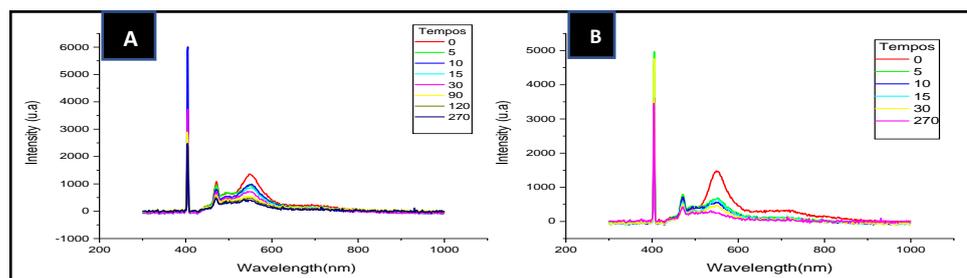
Fonte: Autoria própria (2019).

### PREPARAÇÃO DO LIPOSSOMA FURTIVO DE PH SENSÍVEL PARA A FUNCIONALIZAÇÃO DE PONTO QUÂNTICO, UTILIZANDO O MÉTODO DE FORMAÇÃO DO FILME LIPÍDICO

O segundo teste realizado foi a funcionalização do CdSe nas vesículas lipossomais (fosfatidilcolina de soja (SPC), brometo de diododecildimetilamônio (DDAB), hemisuccinato de colesterilo (CHEMS), monooleato de polioxietilenossorbitano (TWEEN-80) e polietilenoglicol DSPE-PEG-2000 a uma razão molar de 20:25:49:1:5), utilizando o método de formação do filme lipídico. Partindo de 10 mM de concentração de lipossoma e 100  $\mu$ L de CdSe.

Realizou-se análises de fotoluminescência (tempo de análise de 5 em 5 minutos) utilizando somente os pHs 7,4 e 5,0. Observa-se na Figura 3 que com o passar do tempo ocorreu uma diminuição da intensidade de emissão nos dois pHs. Esse comportamento poderia ser explicado como o processo de liberação natural do CdSe do lipossoma e devido à baixa solubilidade da nanopartícula teríamos uma menor intensidade de emissão. Entretanto, essas conclusões devem ser mais estudadas em função da complexidade do sistema.

**Figura 3.** Absorção óptica do lipossoma furtivo pH sensível/CdSe. Experimento realizado de 5 em 5 minutos evidenciando os tempos com maior significância (A) pH 7,4; (B)pH 5,0.



Fonte: Autoria própria (2019).

Para comprovar que os lipossomas estudados se tratava de um sistema lipossoma furtivo de pH sensível, foram realizados experimentos acerca do diâmetro hidrodinâmico (DH) da nanopartícula (Tabela 1). No qual observou-se que o tamanho do lipossoma não variou com o tempo para os pHs 5,0 e 7,4. Em contrapartida, a partir dos resultados foi possível constatar que não ocorreu a quebra dos lipossomas em pH baixo, e que o sistema investigado não representava um sistema lipossomal de pH sensível.

**Tabela 1.** Resultados obtidos do diâmetro hidrodinâmico (DH) para a amostra de lipossoma furtivo de pH sensível, extrusados com membrana de 400 nm. Temperatura de análise 25°C.

Tempo (s)	DH (nm) para pH 5,0	DH (nm) para pH 7,4
0	218,0	301,0
10	215,0	290,0
20	214,0	-
30	220,0	-
40	217,0	-

Fonte: Autoria própria (2019).

## CONCLUSÕES

Conclui-se que através dos resultados obtidos foi possível comprovar a funcionalização das nanopartículas de CdSe, utilizando o método de injeção e o método de formação do filme lipídico. Entretanto, não se obteve sucesso no preparo dos lipossomas furtivos de pH sensível. Nova formulação deve ser testada para o seu desenvolvimento.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR pela Bolsa de Iniciação Científica e pela infraestrutura que foi disponibilizada para a realização dos testes em laboratório. Em contrapartida agradeço a CNPq e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- [1] BOERMAN, O.C.; LAVERMAN, P.; OYEN, W.J.G.; CORSTENS, F.H.M.; STORM, G. *Progress in Lipid Research*, 2000, 39, 461.
- [2] FATTAL, E.; COUVREUR, P.; DUBERNET, C. "Smart" delivery of antisenseoligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 931-946, 2004.
- [3] HAERI, A.; SADEGHIAN, S.; RABBANI, S.; ANVARI, M.S.; LAVASANIFAR, A.; AMINI, M.; SIMIN, D. Sirolimus-loaded stealth colloidal systems attenuate neointimal hyperplasia after balloon injury: a comparison of phospholipid micelles and liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.455, p. 320–330, 2013.
- [4] LASIC, D.; MARTIN, F. *Stealth liposomes / edited by (1995)*. BOCA RATON, CRC. LOMMENS, P., SMET, P.F. Photoluminescence properties of Co<sup>2+</sup>-doped ZnO nanocrystals. *Journal of Luminescence*, 20016, 118(2), 245-250.
- [5] MUTHUA, M.S.; KULKARNI, S.A.; RAJU, A.; FENG, SI-S. Theranostic liposomes of TPGS coating for targeted co-delivery of docetaxel and quantum dots. *Biomaterials*, 2012, 33, 3494-3501.
- [6] WANG, Y.; CHEN, L. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7 (2011).