UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Preparação, caracterização e avaliação do potencial citotóxico *in vitro* de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato encapsulando quercetina em células de câncer de bexiga

Letícia Bueno Silva

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Preparação, caracterização e avaliação do potencial citotóxico *in vitro* de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato encapsulando quercetina em células de câncer de bexiga

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Letícia Bueno Silva

Orientadora: Prof. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E
PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Letícia Bueno

Preparação, caracterização e avaliação do potencial citotóxico *in vitro* de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato encapsulando quercetina em células de câncer de bexiga. Ribeirão Preto, 2016. 105 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Gaspari, Priscyla Daniely Marcato.

1.Câncer de bexiga. 2. Quercetina. 3. Carreadores lipídicos nanoestruturados 4.Entrega sítio específica 5. Folato

FOLHA DE APROVAÇÃO

Letícia Bueno Silva

Preparação, caracterização e avaliação do potencial citotóxico *in vitro* de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato encapsulando quercetina em células de câncer de bexiga

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Prof. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico às pessoas mais especiais de
minha vida, à Minha Mãe Magda e à
minha irmã Thalita, à minha avó
Ermelinda e à toda Família Bueno.*

AGRADECIMENTOS

À Deus que em sua infinita misericórdia sempre me conduziu e iluminou meu caminho.

À Professora Doutora Priscyla Daniely Marcato Gaspari por toda dedicação e amor ao seu trabalho de orientadora, apoio, motivação, amizade, conhecimento compartilhado e confiança a mim depositada.

À minha mãe Magda e à minha irmã Thalita por todo amor e carinho dedicados e por apoiarem minha carreira acadêmica e valorizarem meu trabalho.

Aos meus amigos Thais Priscilla Pivetta, Ivana Carvalho, Robson Amaral, Ana Carolina Bachur, Caroline Botteon, Mariza Miranda e Juliana Barcellos pela amizade sincera, vivências, apoio nas horas decisivas e por tornarem esta etapa ainda mais especial para mim.

Ao técnico Luis Henrique Cenzi pela ajuda e apoio dentro do laboratório e amizade.

À família Nanobiolab.

À Professora Doutora Kamilla Swiech pela acolhida em seu laboratório, confiança e por toda a colaboração.

Ao técnico Fernando Fernandes pela ajuda e apoio dentro do laboratório de Cultivo de Células e Bioprocessos.

À técnica Mariana por toda gentileza e apoio e ao Laboratório de Controle de Qualidade por disponibilizar o HPLC.

Ao Professor Doutor Flávio Emery, ao técnico Murilo de Paula e ao Doutor Lucas Resende pela colaboração e contribuição para produção do Pluronic funcionalizado.

À técnica Ivana Borin do departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras pelas análises de Microscopia de Força Atômica.

Ao Henrique Diniz e ao Laboratório de tecnologia farmacêutica pela contribuição nas análises de DSC.

À técnica Patrícia pela ajuda com o experimento de liberação e ao Laboratório de Sistemas de liberação pelas análises de DLS.

À FAPESP pela bolsa concedida. Processo: 2013/24308-4

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista dos seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa!”

Albert Einstein

RESUMO

SILVA, L. B. **Preparação, caracterização e avaliação do potencial citotóxico *in vitro* de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato encapsulando quercetina em células de câncer de bexiga.** 2016. 105f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Câncer de bexiga (CB) é a segunda doença mais prevalente do trato urinário. Atualmente as principais terapias para o CB apresentam baixa eficácia, altas taxas de recorrência e vários efeitos adversos. Assim, avalia-se o potencial de novas moléculas para a terapia do CB. Quercetina (QT) é um flavonóide com propriedades inibidora da proliferação celular e apoptótica que são interessantes para o tratamento do câncer, porém é um composto instável e fotossensível, o que inviabiliza sua administração na forma livre. Desta forma, o encapsulamento da QT em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) funcionalizados com folato (CLN-F) pode ser um sistema efetivo de entrega de QT em células de CB que poderá superar os desafios da terapia intravesical do CB. O encapsulamento da QT pode aumentar a estabilidade da QT, sua permeação pelo urotélio, internalização em células tumorais, seu tempo de residência na bexiga e sua eficácia farmacológica. Os objetivos deste trabalho foram preparar, caracterizar e avaliar a citotoxicidade de QT livre e encapsulada em CLN e CLN-F em células de CB. O CLN e CLN-F foram preparados pelo método de emulsão e sonicação. A funcionalização do CLN foi realizada pela reação do estabilizante Pluronic F68 com folato (PF68F). Esta funcionalização foi avaliada por espectroscopia de ressonância magnética Nuclear (RMN) unidimensional de ^1H . Os CLNs foram caracterizados quanto ao diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ), cristalinidade, eficiência de encapsulamento (EE) e morfologia. Além disso, foi avaliado o perfil de liberação da QT, a atividade antioxidante e a citotoxicidade da QT livre e encapsulada. A funcionalização foi confirmada pelos espectros de RMN que apresentaram sinais atribuídos ao PF68 e ao folato. O diâmetro, Pdl e o PZ dos CLN foram 176,5 nm, 0,124 e -11,4 mV, respectivamente. O CLN-F apresentou 197,9 nm de diâmetro, 0,160 de Pdl e -17,5mV de PZ. O encapsulamento da QT não alterou significativamente estes parâmetros para ambas as partículas. Obteve-se uma alta eficiência de encapsulamento da QT, para os dois carreadores (~98%), devido, provavelmente, ao baixo valor de índice de recristalização (~28) dos CLNs. Os CLN apresentam forma esférica, estabilidade por 330 dias e um perfil de liberação sustentada da QT. O IC_{50} do CLN-F-QT (83,4 $\mu\text{g/mL}$) foi menor que o IC_{50} do CLN-QT (94,9 $\mu\text{g/mL}$) provavelmente devido ao aumento da internalização causada pela funcionalização das partículas com folato. Os CLN-QT e CLN-F-QT apresentaram alta atividade antioxidante. Os resultados obtidos sugerem que o CLN-F-Q é um sistema com potencial para a futura terapia do CB, pois apresenta tamanho menor que 200 nm, baixo Pdl, alta estabilidade, EE e atividade antioxidante, liberação sustentada além de ser citotóxico para as células RT4.

Palavras-chave: câncer de bexiga, quercetina, carreadores lipídicos nanoestruturados, entrega sítio específica, folato.

ABSTRACT

SILVA, L. B. **Preparation, characterization and cytotoxic potential evaluated in bladder cancer cells of nanostructured lipid carriers functionalized with folate encapsulated quercetin**. 2016. 105f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Bladder cancer (BC) is the second most prevalent tumor of urinary tract. Currently the main BC therapies have low effectiveness, high recurrence rate and several adverse effects. Thus, new molecule have been investigate to CB therapy. Quercetin (QT) is a flavonoid with interesting properties for cancer therapy such as inhibition of cancer cell proliferation and apoptosis. However, QT is an unstable and photosensitive compound. Therefore, QT encapsulated in nanostructure lipid carriers (NLC) functionalized with folate (F-NLC) might be an alternative targeting system of QT for tumor cell and can be strategy to overcome intravesical CB therapy challenges. The QT encapsulation can improve QT stability, increase its permeation in the urothelium and uptake in tumor cells, increase retention time in the bladder and enhancing its pharmacological efficacy. Aims of this study were preparation, characterization of NLC-QT and F-NLC-QT and cytotoxic evaluation of these particles in BC cells. NLC and F-NLC were prepared by ultrasonication method. NLC were funcionalized by conjugated between surfactant Pluronic and folate (PL68F). This conjugation was characterized by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). The particles were characterized regarding to size, polydispersity index (Pdl), zeta potential (ZP), crystallinity, encapsulation efficiency (EE) and morphology. Furthermore, stability, release profile, cytotoxicity and antioxidant activity of QT encapsulated or not in NLC, were evaluated. RMN spectrums confirmed the PF68 functionalization, exhibiting peaks attributed to PF68 and folate. Size, Pdl and ZP of NCL were respectively 176.5 nm, 0.124 and -11.4, whereas F-NLC showed 197.9 nm of size, 0.160 of Pdl and ZP of -17.5mV. The QT encapsulation did not affect these physical parameters. Low values of crystalization index (~28) might promote high EE of quercetin (~98%). NLC shows spherical shape, sustained release profile of QT and were stable for 330 days. IC₅₀ of NLC-QT (87.4 µg/mL) was smaller thanthe IC₅₀ of F-NLC-QT (94.9 µg/mL). This difference might be explained by the increase of NLC uptake by endocytosis mediated by folate receptor. NLC-QT and F-NLC-QT showed high antioxidant activity. Therefore, our results suggest that QT-F-NLC is a carry system with potential for future BC therapy that show size smaller than 200 nm, low Pdl, high long-term stability, high EE and antioxidant activity, sustained release and cytotoxic to CB cells (RT4).

Key words: Bladder cancer, quercetin, nanostructured lipid carriers, active targeting, folate.

LISTA DE FIGURA

Figura 1- Classificação clínica do câncer de bexiga de acordo com o tipo de célula que origina o tecido tumoral.	1
Figura 2- Estrutura molecular da quercetina.	7
Figura 3- Esquematização estrutural das nanopartículas: (A) CLN imperfeito, (B) CLN amorfo, (C) múltiplo CLN.	11
Figura 4- Esquema do método de preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados por emulsão e sonicação.	23
Figura 5- Representação esquemática da reação de funcionalização do Pluronic F68 com folato.	25
Figura 6- Cromatograma do padrão de quercetina (QT) na concentração de 1,25 µg/mL.	33
Figura 7- Linearidade do método analítico de quantificação de quercetina (QT) por CLAE (Faixa 0,25-1,25 µg/mL).	34
Figura 8- Linearidade do método analítico de quantificação de quercetina (QT) por CLAE (Faixa 5-25 µg/mL).	34
Figura 9- Cromatograma do filtrado de CLN vazia.	35
Figura 10- Cromatograma do filtrado de CLN-F vazia.	36
Figura 11- Cromatograma de tampão fosfato (pH 7,4) acrescido de 0,5% de Tween 80 usado em ensaio de liberação <i>in vitro</i> .	36
Figura 12- Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para os fatores tipo de lipídeo (A), porcentagem de estabilizante (B) e relação diâmetro do béquer e altura do líquido submetido ao processo de sonicação (C) e interações entre A e B (AB), entre B e C (BC) e entre A, B e C (ABC) para a resposta diâmetro de partículas.	38
Figura 13- Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para os fatores tipo de lipídeo (A), porcentagem de estabilizante (B) e relação diâmetro do béquer e altura do líquido submetido ao processo de sonicação (C) e interações entre A e B (AB), entre B e C (BC) e entre A, B e C (ABC) para a resposta índice polidispersão (Pdl) de partículas.	38
Figura 14- Perfil de distribuição de tamanho das partículas preparadas com o lipídio SS e com 1% de Pluronic F68 (experimento 2) (curva em	

verde) e das partículas preparadas com o lipídeo MM e com 1,0% de Pluronic F68 (experimento 1) (curva em vermelho).	40
Figura 15- Perfil de distribuição de tamanho para as partículas preparadas com o lipídeo SS e com: 1% de Pluronic F68 (experimento 2) (curva em vermelho) e com 1,5% de Pluronic F68(experimento 4) (curva em verde).	42
Figura 16- Perfil de distribuição de tamanho das partículas preparadas com o lipídeo SS, com 1% de Pluronic F68 preparadas com: béquer de forma alta (experimento 2) (curva em vermelho) e béquer de forma baixa (experimento 6) (curva em verde).	42
Figura 17- Valores de diâmetro e índice de polispersão (Pdl) de CLN vazias preparadas com o lipídeo SS e com 1% de Pluronic F68 em função do tempo.	43
Figura 18- Valores de potencial zeta (PZ) de CLN vazias preparadas com o lipídeo SS e com 1% de Pluronic F68 em função do tempo.	44
Figura 19- Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para os fatores tipo de óleo (A), tempo de sonicação (B) e interações entre tipo de lipídeo e tempo de sonicação (AB) para a resposta diâmetro de partículas.	45
Figura 20- Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para os fatores tipo de óleo (A), tempo de sonicação (B) e interações entre tipo de lipídeo e tempo de sonicação (AB) para a resposta índice de polidispersão (Pdl).	45
Figura 21- Perfil de distribuição de tamanho das partículas preparadas com o lipídeo SS, com 1% de Pluronic F68 com: Miglyol 810 (experimento 1) (curva em vermelho) e com óleo de coco (experimento 2) (curva em verde).	47
Figura 22- Perfil de distribuição de tamanho das partículas preparadas com o lipídeo SS, com 1% de Pluronic F68 e com óleo de coco e pelo período de 10 minutos de sonicação (experimento 2) (curva em verde) e 15 minutos de sonicação (experimento 4) (curva em vermelho).	48
Figura 23- Reação de funcionalização do Pluronic F68 com folato. (A) Etapa de ativação do ácido fólico com 1,1' carbonildiimidazol. (B) Etapa de esterificação.	51
Figura 24- Estrutura química de Pluronic F68 funcionalizado com ácido fólico (PL68F).	52

Figura 25- Espectro de absorção UV-vis de Pluronic não funcionalizado (linha preta) e funcionalizado (linha vermelha)	53
Figura 26- Valores de diâmetro e índice de polidispersão (Pdl) de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) vazios (barra preta, linha azul), carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) (barra branca, linha vermelha) e CLN funcionalizados com folato contendo quercetina (CLN-F-QT) (barra preta e linha roxa) em função do tempo	55
Figura 27- Valores de potencial zeta de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) vazios, carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) e CLN funcionalizados com folato contendo quercetina (CLN-F-QT) em função do tempo	56
Figura 28- Distribuição de tamanho de partículas em 3D por análise de rastreamento de nanopartículas. (A) Carreadores lipídicos nanoestruturados vazio (CLN), (B) Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT), (C) Carreadores lipídicos Nanoestruturados funcionalizados com folato (CLN-F), (D) Carreadores lipídicos Nanoestruturados funcionalizados com folato contendo quercetina (CLN-F-QT)	57
Figura 29- Morfologia 2D de carreadores lipídicos nanoestruturados por Microscopia de Força Atômica	58
Figura 30- Morfologia 3D de carreadores lipídicos nanoestruturados por Microscopia de Força Atômica	59
Figura 31- Termogramas de Pluronic F68, Lipídeo de ésteres cetílicos (SS) e quercetina (QT).	60
Figura 32- Termogramas de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) vazio (linha preta), carreadores lipídicos nanoestruturados com quercetina (CLN-QT) (linha azul), carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato (CLN-F) (linha vermelha) e carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato com quercetina (CLN-FQT) (linha verde).	61
Figura 33- Perfil de liberação de quercetina(QT) a partir de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).	64

- Figura 34- Viabilidade de células de câncer de bexiga superficial (RT4) tratadas com carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (A) não funcionalizados e funcionalizados (CLN-F) (B) por 24h. Os experimentos foram conduzidos em triplicata 66
- Figura 35- Viabilidade de células de câncer de bexiga superficial (RT4) tratadas com quercetina (QT) livre e quercetina encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) não funcionalizados e funcionalizados (CLN-F) por 24h. Os experimentos foram conduzidos em triplicata. ***p <0,001 para CLN-F-QT em relação a CLN-QT e QT em todas as concentrações estudadas, ***p <0,001 para CLN- QT em relação a QT e QT e **p <0,05 para CLN-QT em relação a QT 67
- Figura 36- Reação de auto-oxidação do pirogalol 68
- Figura 37- Cinética da reação de auto-oxidação do Pirogalol (curva em preto) e da mistura com Vitamina C (curva em azul) 68
- Figura 38- Cinética da reação de auto-oxidação do Pirogalol do controle positivo com Vitamina C (curva em vermelho), da quercetina livre à 640 µg (curva em roxo), da quercetina livre à 320 µg (curva em cinza), quercetina encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN-Q) (curva azul) e quercetina encapsulada em carreadores lipídicos funcionalizados com folato (CLN-F-Q) (curva em magenta). 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Variáveis fixadas na preparação dos CLN.	21
Tabela 2- Níveis e fatores do planejamento experimental 2 ³ .	22
Tabela 3- Níveis e fatores do planejamento 2 ² .	22
Tabela 4- Modelos cinéticos aplicados ao perfil de liberação de quercetina por carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).	29
Tabela 5- Exatidão (%) e Precisão (DPR) do método analítico de quantificação.	35
Tabela 6- Matriz do Planejamento Fatorial 2 ³ .	37
Tabela 7- Análise estatística de variância para variável resposta diâmetro do planejamento fatorial 2 ³ .	39
Tabela 8- Análise estatística de variância para variável resposta índice de polidispersão (Pdl) do planejamento fatorial 2 ³ .	39
Tabela 9- Matriz do Planejamento Fatorial 2 ² .	45
Tabela 10- Análise estatística de variância para variável resposta diâmetro do planejamento fatorial 2 ² .	46
Tabela 11- Análise estatística de variância para variável resposta índice de polidispersão (Pdl) do planejamento fatorial 2 ² .	46
Tabela 12- Valores de diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulamento (EE) de CLN preparados com diferentes quantidades de quercetina (QT).	49
Tabela 13- Aspecto macroscópico das dispersões de CLN preparadas com diferentes quantidades de quercetina (QT).	50
Tabela 14- Dados dos espectros de RMN de ¹ H obtidos para o Pluronic funcionalizado com folato (PF68F) em DMSO-d ₆ e dados da literatura	52
Tabela 15- Valores de diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ), e eficiência de encapsulamento (EE%) de CLN, CLN-QT e CLN-F-QT e seus desvios padrão (DP)	54
Tabela 16- Valores de diâmetro (nm) e concentração de partículas por mL (CLN/mL)	57
Tabela 17- Valores de entalpia, ponto de fusão e índice de recristalização (IR) do lipídeo ésteres cetílicos (SS), CLN preparadas com 1% de SS, 1%	

de Pluronic F68 e 0,25% de óleo de coco) com e sem QT e CLN-F (CLN funcionalizado com folato) com e sem quercetina (QT).	62
Tabela 18- Solubilidade da quercetina (QT) em tampão fosfato (pH 7,4) acrescido ou não do tensoativo Tween 80.	63
Tabela 19- Coeficientes de correlação (R^2) calculados pelos modelos matemáticos cinéticos de Ordem zero, Primeira Ordem, Korsmeyer-Peppas, Higuchi e Hixson-Crowell.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BC	Câncer de Bexiga
RTU	Ressecção Transuretral
BCG	Bacili Calmette-Guerin
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
RLs	Radicais Livres
O ²⁻	ânion superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
OH-	Radical hidroxil
NOX	NADPH oxidase
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
IL-8	Interleucina 8
MMP-2	Metaloproteinase da matriz 2
QT	Quercetina
μM	micromol/litro
BK _{+Ca}	Receptores de potássio cálcio dependentes
NLS	Nanopartículas Lipídicas sólidas
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CLN-QT	Carreadores lipídicos nanoestruturados encapsulando quercetina
Vitamina E	Acetato de tocoferol
AF	Ácido fólico
RF	Receptor de Folato
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
EE	Eficiência de Encapsulamento
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas
AFM	Microscopia de força atômica
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
mL/min	Mililitros/ minuto
μL	Microlitro
nm	Nanômetro
mm	Milímetro

$\mu\text{g/mL}$	Micrograma/mililitro
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção
CLN-F	Carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato
Tween 80	Polissorbato 80
μm	Micrometros
MM	Miristato de Miristila
SS	Mistura de esteres cetílicos
PdI	Índice de polidispersão
PF68F	Pluronic F68 funcionalizados com folato (PF68F)
FDA	Food and drug administration
DMSO	Dimetilsulfóxido
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
CLN-F-QT	Carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato e encapsulando quercetina
IR	Índice de recristalização
rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro Bovino Fetal
CO_2	Dióxido de carbono
NaCl	Cloreto de sódio
IC_{50}	50% da concentração inibitória máxima
THIS	Aminometano
R^2	Coeficiente de correlação
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
PZ	Potencial Zeta
DP	Desvio Padrão
PPO	Polioxipropileno
[QT]	Concentração de quercetina

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Carcinoma de bexiga urinária	1
1.2 Carcinoma de bexiga urinária: Espécies Reativas de oxigênio e Angiogênese	4
1.3 Quercetina	6
1.4 Nanopartícula Lipídicas Sólidas	10
1.5 Funcionalização de Nanopartículas e Ácido Fólico (AF)	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Geral	16
2.2 Específicos	16
3. MATERIAIS	17
4. MÉTODOS	18
4.1 Validação do método analítico de quantificação de quercetina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	18
4.1.1 Condições Cromatográficas	18
4.1.2 Construção das curvas de calibração e linearidade	18
4.1.3 Precisão e exatidão	19
4.1.4 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)	19
4.1.5 Seletividade	20
4.1.5.1 Seletividade para determinação da eficiência de encapsulamento	20
4.1.4.2 Seletividade para ensaio de liberação in vitro em células de	

difusão de Franz	20
4.2 Preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados	21
4.2.1 Planejamento fatorial	21
4.2.2 Planejamento fatorial 2 ³	21
4.2.3 Planejamento fatorial 2 ²	22
4.3 Preparação de Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)	23
4.4 Distribuição de tamanho das partículas e Potencial Zeta	23
4.5 Avaliação da quantidade de quercetina (QT) encapsulada	24
4.6 Determinação da Eficiência de Encapsulamento (EE%) por método indireto	25
4.7 Funcionalização do Pluronic F68 com ácido fólico	25
4.7.1 Reação de funcionalização	25
4.7.2 Identificação do Pluronic F68 funcionalizado com ácido fólico	26
4.7.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensional de ¹ H.	26
4.7.2.3 Espectrofotometria UV-VIS para pesquisa de PL68F	26
4.8 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	27
4.9 Microscopia de força atômica (AFM)	27
4.10 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	27
4.11 Ensaio de liberação <i>in vitro</i> em células de difusão de Franz	27
4.11.1 Determinação do coeficiente de solubilidade de Quercetina	28
4.11.2 Ensaio do perfil de liberação <i>in vitro</i>	28
4.12 Estudos de Citotoxicidade em células de linhagem de câncer de bexiga (RT4)	29
4.12.1 Cultivo das Células	29
4.12.2 Ensaio de captura do corante vermelho neutro (análise da integridade lisossomal)	30
4.12 Avaliação da atividade antioxidante da quercetina livre e encapsulada <i>in vitro</i> pelo método de auto-oxidação do pirogalol e sequestro de radicais superóxidos	31
4.12.1 Preparação de controles e amostras	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33

5.1 Validação do método analítico de quantificação de quercetina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	33
5.2 Avaliação da influência de fatores no processo de produção e propriedades físicas dos carreadores por planejamento fatorial	36
5.2.1 Planejamento fatorial 2^3	37
5.2.1.1 Avaliação do fator: tipo de lipídeo	39
5.2.1.2 Avaliação do fator: concentração de estabilizante	40
5.2.1.3 Avaliação do fator: diâmetro do béquer (relação diâmetro do béquer/ altura do líquido)	42
5.2.1.4 Estabilidade do CLN escolhido no planejamento fatorial 2^3	43
5.2.2 Planejamento Fatorial 2^2	44
5.2.2.1 Avaliação do fator: tipo de óleo	46
5.2.2.2 Avaliação do fator: tempo de sonicação	48
5.3 Avaliação da quantidade de quercetina encapsulada	49
5.4 Funcionalização do Pluronic F68 com folato (PF68F)	50
5.5 Caracterização físico-química dos CLN e CLN-F otimizados	53
5.5.1 Avaliação das propriedades física e estabilidade de CLN e CLN-F com e sem QT	53
5.5.1.1 Determinação de diâmetro e potencial zeta	53
5.5.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	56
5.5.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)	58
5.5.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	59
5.6 Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	62
5.6.1 Determinação do coeficiente de solubilidade de quercetina em meio receptor de ensaio de liberação <i>in vitro</i> .	62
5.6.2 Ensaio de perfil de liberação <i>in vitro</i> em células de difusão do tipo Franz de quercetina por carreadores lipídicos nanoestruturados	63
5.7 Ensaio de captura do corante vermelho neutro (análise da integridade lisossomal)	65
5.8 Avaliação da atividade antioxidante da quercetina livre e encapsulada <i>in vitro</i> pelo método de auto-oxidação do pirogallol e sequestro de radicais superóxidos	67

6.	CONCLUSÃO	70
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	APÊNDICES	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de bexiga urinária (CB)

O carcinoma da bexiga urinária (CB) é a segunda doença maligna mais comum do trato urinário (BABJUK et al., 2013), acomete mais homens que mulheres e tem como principal fator de risco o tabagismo. Nos Estados Unidos estima-se o aparecimento de 76960 novos casos e 16390 óbitos (American Cancer Society, 2016) em 2016. Segundo o Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA, 2016) este tipo de câncer resultou em 3462 óbitos em 2013 e estima-se o aparecimento de 9670 novos casos.

O câncer de bexiga é classificado de acordo com o tipo celular que originou o tecido tumoral, sendo o carcinoma de células transicionais o mais incidente (90%), enquanto o carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma são pouco incidentes (Figura 1) (GUHASARKAR AND BANERJEE, 2011).

O estadiamento do CB depende da extensão, do grau de comprometimento dos tecidos da bexiga. Quando o tumor se restringe aos tecidos de revestimento é denominado superficial ou não músculo invasivo, estes incluem: o câncer In situ ou Tis que se desenvolve na camada mucosa, Ta que acomete o epitélio transicional e o T1 em que tumor se estende até lâmina própria (WEINTRAUB et al., 2014; BABJUK, 2016). Entretanto, quando agride as camadas mais profundas da bexiga como a muscular é dito invasivo (T2, T3, T4). 80% da incidência de CB é superficial (WANG, 2016) e em 15-25% dos casos de tumor não músculo invasivo eventualmente evoluem para o estágio invasivo (MORGAN AND CLARK, 2010). Além disso, 50% dos tumores não músculo invasivos recorrem em 4 anos.

Figura 1- Classificação clínica do câncer de bexiga de acordo com o tipo de célula que origina o tecido tumoral

O tratamento do câncer de bexiga depende do grau de evolução da doença. Em casos mais avançados, pode-se optar pela cistectomia parcial ou radical que compreendem a retirada parcial ou completa da bexiga. Em casos superficiais os tratamentos mais comumente utilizados são: a ressecção transuretral (RTU), a quimioterapia e imunoterapia com bacilo Calmette-Guerin (BCG). Entretanto, nenhuma destas terapias é efetiva no tratamento do CB, pois não previnem a progressão nem a recorrência da doença (SU et al., 2016), sendo as taxa de recorrência de 70% para tratamentos com uso exclusivo de RTU (SHIMADA et al., 2011), 70% para Imunoterapia e de até 80% para pacientes tratados com quimioterápicos.

Morales et al. (1976) foram pioneiros em comprovar o sucesso no tratamento do CB superficial com BCG. Desde então, a Imunoterapia foi considerada o tratamento de primeira escolha para o CB de alto risco que apresenta os melhores resultados com aprovação do US FDA (BABJUK et al., 2013; TOMLINSON et al., 2015). A terapia se caracteriza pela instilação intravesical do BCG. Segundo Schamhart et al. (2000), após a instilação de BCG, a parede vesical apresenta infiltrado celular granulomatoso, envolto por linfócitos e granulócitos que induzem a resposta imune de longa duração que pode persistir por mais de 1 ano. No entanto, o uso de organismos vivos e atenuados pode causar efeitos colaterais e dificuldade em prever resposta. Sem mencionar que os efeitos colaterais estão presentes em mais de 90% dos casos de pacientes tratados com BCG. Tais efeitos vão desde sintomas irritativos leves no trato urinário, a efeitos graves como septicemia e óbito do paciente (DIAS et al., 2016).

Por isso, tratamentos alternativos utilizando quimioterápicos como doxorrubicina e/ou cisplatina por via endovenosa ou intravesical têm sido utilizados apesar das altas taxas de recorrência após este tratamento (cerca de 80%).

Os tumores superficiais se localizam em uma região pouco vascularizada da bexiga, próxima a superfície do urotélio, devido a isso a administração sistêmica de fármacos é inviável sendo a administração local ou intravesical considerada ideal (TSALLAS et al., 2011). A terapia intravesical tem como vantagens a diminuição da dose a ser administrada e dos efeitos colaterais sistêmicos causados pela distribuição dos fármacos pelo organismo quando administrados pela via endovenosa, uma vez que os mesmos são inespecíficos. Devido a isso, a via endovenosa requer a administração de doses altas do fármaco para garantir que mesmo atinja o local de ação na concentração necessária para o efeito farmacológico desejado (HSU et al., 2013).

A estrutura anatômica da bexiga permite fácil acesso para administração local por meio de cateter (Intravesical), o acesso direto permite maior exposição do tecido tumoral ao fármaco, aspecto este relevante em se tratando de fármacos que induzem resistência (GUHASARKAR AND BANERJEE, 2010). Adicionalmente, a quantidade de fármaco administrado pode ser facilmente controlada (ADIYAT et al., 2010). Entretanto, devido ao preenchimento e esvaziamento periódico da bexiga o fármaco instilado possui baixo tempo de residência na mesma, sendo constantemente removidos. Além disso, o fármaco pode ser diluído pelo conteúdo presente na bexiga (WEINTRAUB et al., 2014). Atualmente, as formulações convencionais administradas pela esta via são mantidas na bexiga urinária durante 2 horas e a exposição urotelial ao fármaco perdura até a primeira micção após a instalação. Desta forma, várias administrações são necessárias, o que pode ocasionar dor e infecções locais, as quais podem agravar com o aumento do número de administrações.

Outro desafio para a efetividade dos fármacos administrados por via intravesical na bexiga é a baixa permeabilidade do urotélio que se deve a estrutura celular dos mesmo. O urotélio apresenta em sua composição superficial células guarda-chuva (altamente diferenciadas) que são caracterizadas pela sua alta resistência transepitelial (10000 a $75000 \Omega \text{ cm}^2$) e sua permeabilidade não é alterada significativamente, mesmo em caso de câncer na bexiga ou cistite intersticial. O urotélio é, portanto, uma eficiente barreira, sendo altamente

impermeável para todas as substâncias presentes na urina e para muitos fármacos (MUGABE, et al., 2012).

Em função dos obstáculos da administração local, algumas estratégias têm sido desenvolvidas, como por exemplo, o uso da nanotecnologia que possibilita a acumulação de fármaco de forma específica no estroma tumoral e a internalização dos mesmos pelas células cancerosas, através da veiculação de agentes terapêuticos nanoencapsulados com ação sítio seletiva o que minimiza a internalização inespecífica e os efeitos adversos nocivos (MASTER et al., 2012). Ademais, as nanoestruturas podem apresentar liberação sustentada do fármaco, aumentar sua penetração pelo urotélio e seu tempo de permanência na bexiga, o que possibilita diminuir o número de administrações (ALI et al., 2011).

Aliado a isso, na busca por terapias alternativas, outra estratégia para aumentar a eficácia terapêutica do tratamento de CB e que tem ganhado destaque é a utilização de produtos naturais provenientes de metabolismo secundário de plantas. Dentre estes compostos está a quercetina que apresenta propriedades interessantes para o combate do câncer como ação antioxidante, apoptótica, inibidora da proliferação celular entre outras (SU et al., 2016).

1.2 Carcinoma de Bexiga Urinária: Espécies Reativas de Oxigênio e Angiogênese

A incidência de doenças relacionadas a processos cancerígenos no organismo envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) vem recebendo especial atenção nos últimos anos (SABHARWAL et al., 2014; BAYRAKTAR et al., 2010). EROs ou radicais livres (RLs) são moléculas altamente instáveis e reativas que possuem par(es) de elétron(s) desemparelhados, que em condições normais são incorporados às moléculas antioxidantes naturais, destacando o complexo glutadiona-redutase (SEN, 1995). Além disso, essa configuração eletrônica dos EROS permite a sua interação com macromoléculas biológicas podendo causar alterações nos componentes celulares como, por exemplo, proteína, DNA e lipídio (BROWN-BORG et al., 1999). Dentre as espécies radicalares causadoras de danos à célula tem-se: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($OH^\cdot$) (STEPANIC et al., 2016).

Uma elevada produção das espécies reativas de oxigênio ou um desequilíbrio entre a disponibilidade dos antioxidantes para neutralizar essas espécies podem levar ao estresse oxidativo, em que ocorre aumento das defesas antioxidantes enzimáticas e aumento da produção de radicais livres, causando danos e morte celular (JACKSON, 2005). EROs são consideradas carcinógenos efetivos podendo participar da iniciação, progressão e metástase das neoplasias (SABHARWAL et al., 2014).

Elevadas quantidades de H_2O_2 são produzidas e excretadas pelas células tumorais, confirmando sua importância na propagação e invasão tumorais. As enzimas NADPH oxidases (NOX) são as principais fontes de EROs celular (SHIMADA et al., 2011). A redução do oxigênio molecular dependente da NOX é responsável por gerar EROs na célula, na forma de O_2^- , o qual é dismutado para formar H_2O_2 (SABHARWAL et al., 2014; STEPANIC et al., 2016). Estudos demonstraram que baixos níveis de EROs geradas por NOX podem atuar como mediadores da inflamação, apoptose, proliferação celular e angiogênese em vários cânceres humanos (SHIMADA et al., 2011). Shimada et al. (2009) identificaram que a geração de H_2O_2 por NOX1 aumentou a resistência à apoptose de células uroteliais cancerosas humanas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e concluíram que a geração de EROs através de NOX1 desempenhou um importante papel na progressão do CB.

EROs aumentam nas células tumorais a produção de fatores angiogênicos, como a interleucina 8 (IL-8) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e a secreção de metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2), uma gelatinase que auxilia o crescimento de vasos sanguíneos no interior do microambiente tumoral (GIBELLINI et al., 2011). A angiogênese é definida como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes e possui um papel importante no crescimento e desenvolvimento, cicatrização de feridas e na tumorigênese (SHIBUYA & CLAEISSON-WELSH, 2006). O VEGF estimula todos os aspectos da função endotelial como proliferação, migração, produção de óxido nítrico e permeabilidade da camada de células endoteliais. Além disso, a ação do VEGF protege o endotélio da apoptose (WALTENBERGER, 2009).

Desta forma, atualmente há uma busca por antioxidantes que possam ser efetivos na terapia do câncer. Estudos em cultura de células e em modelos animais revelam que flavonóides, como por exemplo, a quercetina, exercem efeitos

preventivos positivos na carcinogênese e em desordens neurodegenerativas devido, essencialmente, à sua atividade antioxidante, a sua capacidade de afetar a expressão de várias enzimas desintoxicantes (ex. lipoxigenase, ciclo-oxigenase, iNOS, monoxigenase, xantina oxidase e NADH oxidase) e a sua capacidade para modular a cascata de sinalização de proteínas. Os flavonóides podem interferir em estágios específicos do processo de carcinogênese e pode inibir a proliferação celular e induzem a apoptose em diversos tipos de células cancerosas (GILBELLINI et al., 2011; SRIVASTAVA et al., 2015). Pook et al. (2002) demonstraram que células tumorais do CB que foram tratadas com BCG combinado com o antioxidante N-acetilcisteína causou significativa redução de EROs e aumento da citotoxicidade nas células cancerosas.

1.3 Quercetina

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroflavona) (QT), é um flavonóide da classe dos flavonóis amplamente distribuído em frutas e vegetais sendo encontrada na maçã, alho, chá preto e vinho tinto dentre outros (YAN et al., 2016). Tal composto revela muitas propriedades tais como: antioxidantes, anti-inflamatória, antibacteriana, anticarcinogênica, anti-hipertensiva e antiviral (NISHIMURO et al., 2015).

Adicionalmente a quercetina demonstrou, em alguns estudos, propriedades apoptótica, inibidora da proliferação de células tumorais (SRIVASTAVA et al., 2015) com ação dose dependente, podendo ser considerada um fármaco promissor no tratamento do câncer. Ademais este composto mostrou atividade em vários tipos de câncer como mama, ovário, cólon, estômago, fígado bexiga e na leucemia (ORSOLIC et al., 2016). Estudos sugerem ainda que a quercetina pode ter atividade pró-apoptótica específicas em células tumorais, não apresentando efeitos nocivos em células normais tais como HEK 293T (células de linhagem embrionárias do tecido epitelial renal humanas) e MEF-1 (células de linhagem de fibroblasto murino) (SRIVASTAVA et al., 2015) e células do sistema imune, pois a ação deste flavonóide é maior em células que se multiplicam rapidamente (SAK, 2014).

As propriedades antioxidantes da quercetina incluem a eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROS), inibição da peroxidação lipídica, quelação de íons metálicos e modulação da resposta antioxidante celular (SUGANTHY et al.,

2016). No entanto, a eliminação de radicais livres é a principal via antioxidante e deve-se à presença dos grupos hidroxila e dos orbitais π conjugados (Figura 2) que são doadores de hidrogênio ou elétrons para íon superóxidos (OH^-) ou para H_2O_2 (ALRAWAIQ et al., 2014).

Figura 2- Estrutura molecular da quercetina.

Dentre os mecanismos atribuídos a atividade antitumoral está o mecanismo de apoptose desencadeado pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), ação sobre proteínas de estresse oxidativo, perturbações em microtúbulos celulares, ativação de capases e reativação da proteína p53 selvagem, além da capacidade de regulação do ciclo celular modulando a função de proteínas importantes como a p21, p27 que levam a inibição da progressão do tumor (SUGANTHY et al., 2011). Evidências crescentes sugerem que os flavonóides, em particular, o resveratrol e a quercetina, podem contribuir para a remodelação da cromatina e assim interferir com alterações epigenética que são importantes na progressão do câncer (GIBELLINI et al., 2011).

Estudos realizados em modelos *in vivo* observaram que a reconstituição da atividade de p53 selvagem pode levar à morte de células tumorais e a regressão de tumores já estabelecidos. A proteína p53 (p53 selvagem) desempenha um papel fundamental na regulação do ciclo celular normal e processo apoptótico (ERILL et al, 2004). Alterações nesta proteína levam à perda de sua função de supressão tumoral (ERILL et al, 2004; KUO et al., 2004). Kuo et al. (2004) verificaram um aumento na

expressão da proteína p53 selvagem quando células de câncer de pulmão A549 foram expostas a quercetina (20-60 μ M). Para o estudo em células de câncer de ovário SKOV-3 (REN et al., 2015) e em células de câncer de mama MCF-7 (DENG et al., 2013) o resultado foi semelhante, a quercetina diminuiu a expressão da p53 mutante, induziu a apoptose e interrompeu o ciclo celular das células em G1/G0 inibindo, assim a progressão tumoral. A quercetina apresentou-se citotóxica e induziu interrupção do ciclo celular em S e apoptose em ensaios *in vitro* e *ex vivo* com células de linhagem leucêmicas (CEM, K562 e Nalm6) e células de linhagem de câncer de mama (T47D e da EAC). Os mecanismos delineados neste estudo mostraram que a apoptose em células Nalm6 está relacionada não somente com o aumento da expressão da p53 selvagem, mas com a ativação de caspase 3 e caspase 9 (SRIVASTAVA et al., 2015). Srivastava et al. (2015) também mostrou que QT diminuiu de adenocarcinoma de mama em camundongos albinos.

Ma et al. (2006) verificaram que a quercetina mostrou alta inibição do crescimento de linhagens celulares de câncer da bexiga (T24, EJ, J82) através da indução da apoptose, inibição da viabilidade celular e interrupção do ciclo celular em G0/G1. O estudo demonstrou que a quercetina induziu a apoptose das células estudadas pela redução da expressão da proteína p53 mutante. A mutação do gene da p53 ocorre em 50% a 70% das neoplasias e tem sido relacionada com a resistência às terapias anticâncer. Tal mutação confere vantagens de promoção da sobrevivência do tecido tumoral ao exercer efeitos anti-apoptóticos (KIM et al., 2009). Desta forma, restaurar a função da p53 selvagem e ou reduzir a expressão da p53 mutante é um mecanismo promissor na busca de terapias seletivas contra o câncer. Neste contexto, o uso de flavonóides como a quercetina tem sido investigado como uma terapia alternativa para diferentes cânceres como, por exemplo, o câncer de bexiga (ORSOLIC et al., 2016).

Outros estudos na literatura mostram outras possíveis vias de atuação da quercetina na redução da progressão do câncer como, por exemplo, o estudo realizado por Rockenbach et al. (2011) que descreve que a quercetina inibiu a proliferação de células cancerígenas de bexiga T24. Neste estudo observou-se que a quercetina inibiu o ecto-5'-NT/CD73 responsável pela regulação do AMP e da adenosina extracelular as quais mediam a sinalização celular em condições patológicas, incluindo a regulação de proliferação tumoral. O nível de AMP

hidrolisado pelo ecto-5'-NT/CD73 em células T24 tratadas com quercetina foi superior ao nível apresentado por células T24 não tratadas (controle).

Outro mecanismo molecular relativo à atividade anticarcinogênica da QT foi descrito em células de carcinoma de bexiga humano (linhagem 253J) e está relacionada ao aumento dos íons Ca^{2+} e ativação de canais de K^+ , levando à hiperpolarização da membrana, influxo de K^+ , ativando os receptores de potássio (BK_{Ca}) que levam a apoptose ou inibem a proliferação das células cancerosas (ZHAO et al., 2012).

Yang et al., (2016) mostraram que a quercetina diminuiu a viabilidade de células de linhagem de câncer de cólon-retal HT29, levando ao encolhimento celular, condensação da cromatina e colapso do núcleo. Além disso, as células tiveram seu ciclo interrompido em S e a expressão de P-Akt-Thr308 e CSN6 diminuiu, resultando na alteração dos níveis de proteínas responsáveis pelo mecanismo de apoptose como Bax, Bcl-2 e p53 e aumento da apoptose celular. Sendo que os níveis de Bax e p53 aumentaram enquanto Bcl-2 diminuiu.

Su et al. (2016) foram pioneiros em descrever que a quercetina apresenta potencial anticarcinogênico em células de câncer de bexiga (T24, UMUC3, MB49) pela potente ativação de via de sinalização AMPK. O AMPK desempenha uma função importante relacionada com a regulação do metabolismo celular, homeostase e apoptose.

Outros estudos foram realizados em células de câncer de bexiga e demonstraram que a quercetina causou danos ao DNA, diminuiu a viabilidade e o número de colônias de células T24 tratadas com concentrações na faixa de 1 a 50 mM durante um curto período de 2 h (ORSOLIC et al., 2016).

Apesar da alta atividade da quercetina frente a diferentes cânceres, o uso farmacológico desta molécula é limitado, pois a quercetina apresenta baixa solubilidade em água 0,00215 $\mu\text{g/mL}$ a 25,6°C (SRINIVAS et al., 2010), o que dificulta a sua administração em solução salina e limita a sua permeação e biodisponibilidade (AZUMA et al., 2002). Além disso, a quercetina é um flavonóide instável e fotossensível que pode ser degradada pela radiação UVA e formar produtos que podem exibir efeitos pró-apoptóticos (MAIANI, 2012). Dessa forma, a aplicação clínica deste flavonóide se torna restrita. Entretanto, o encapsulamento da quercetina em nanocarreadores possibilita a sua administração em meio aquoso e mantém a sua atividade biológica (CHEN-YU et al., 2012).

No contexto da terapia intravesical para CB a administração deste flavonóide em nanopartículas pode aumentar sua permeação no urotélio, seu tempo de retenção e promover maior estabilidade, obtendo, assim, resultados terapêuticos relevantes no tratamento de CB pela via intravesical. Dentre os carreadores estudados, destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas por sua alta estabilidade e alta capacidade de incorporação de moléculas lipofílicas.

1.4 Nanopartículas Lipídicas Sólidas

Esforços significativos têm sido empregados no desenvolvimento de tecnologias para sistemas de liberação sustentada. Micelas, lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas e NLS têm sido estudadas para este sistema com intuito de manter o efeito do fármaco no tecido alvo, solubilizar fármacos lipofílicos, aumentar a penetração cutânea de moléculas, melhorar a estabilidade física e química de agentes terapêuticos, minimizar os efeitos colaterais e reduzir a toxicidade (SCHWARZ et al., 2012). Dentre os carreadores coloidais, as NLS são as mais promissoras, visto que combinam as vantagens das partículas sólidas e dos lipossomas em seu desenvolvimento. Dentre as vantagens, pode-se citar a alta estabilidade, alta capacidade de encapsulamento, baixo custo de produção. As NLS são biodegradáveis, biocompatíveis, formam filmes lipídicos e tem alta capacidade de carrear fármacos lipofílicos com controle da sua liberação (NASERI et al., 2015).

As NLS são formadas por lipídios sólidos à temperatura corporal, e estabilizadas por tensoativos. Os lipídios utilizados na preparação de NLS são triglicerídeos, mistura de glicerídeos ou ceras. As NLS podem ser preparadas por diferentes técnicas como, por exemplo, microemulsão à quente, emulsificação e evaporação de solvente, difusão de solvente, *nanospray-drying* e homogeneização à alta pressão (MARCATO, 2009).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) fazem parte da segunda geração de nanopartículas lipídicas, sucedendo as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Estes carreadores (CLN) foram desenvolvidos com o intuito de melhorar a eficiência de encapsulamento e minimizar a expulsão do ativo das partículas durante a estocagem, o que, em geral, ocorria com as NLS (NASERI et al., 2015). Os CLN dividem-se em três diferentes estruturas, o primeiro modelo, conhecido como “CLN imperfeito” (Figura 3A) consiste em uma mistura de glicerídeos compostos por

diferentes ácidos graxos. Essa mistura aumenta a distância entre as cadeias de ácidos graxos dos glicerídeos ocasionando imperfeições no cristal. Essas imperfeições geram mais espaço para acomodar o ativo, aumentando assim a eficiência do encapsulamento. O segundo modelo, chamado de “CLN amorfo” (Figura 3B), é composto pela mistura de lipídios sólidos com lipídios líquidos (óleo). Essa estrutura evita a expulsão do ativo das partículas durante a estocagem, já que o processo de cristalização do lipídio da forma polimórfica α para a forma polimórfica β não ocorre nessas condições. O terceiro modelo é chamado de “múltiplo CLN” (Figura 3C). Este carreador é formado pela dispersão de alta quantidade de óleo em lipídio sólido. A solubilidade das moléculas de óleo no lipídio sólido é excedida levando a uma separação de fase e formação de nanocompartimentos de óleo dentro da matriz lipídica sólida (ÜNER et al., 2007; NASERI et al., 2015).

Figura 3- Esquematização estrutural das nanopartículas: (A) CLN imperfeito, (B) CLN amorfo, (C) múltiplo CLN.

Na literatura, NLS e CLN têm sido investigadas como carreadores de quimioterápicos, visando o tratamento de diferentes cânceres incluindo o câncer de bexiga.

O antineoplásico etoposídeo encapsulado em NLS, preparados com o lipídio sólido tripalmitina, foi administrado por via subcutânea próximo ao tumor em modelo de linfoma de Dalton em ratos. Neste estudo foi observada uma redução dos efeitos tóxicos sistêmicos, maior internalização do fármaco encapsulado em relação ao administrado na forma livre e o acúmulo das nanopartículas no local da administração, levando ao efeito prolongado da terapia (HARIVARDHAN REDDY et

al., 2005).

Subedi et al (2009) encapsularam doxorrubicina em NLS preparadas com o lipídios caprato de glicerila e curdlana. Nanopartículas com diâmetro de 199 nm e eficiência de encapsulamento de 67,5% foram obtidas. Nos estudos *in vitro* em células de câncer de mama resistentes ou não à doxorrubicina (MCF7/ADR & MCF7) foi observado que os NLS vazias não apresentaram toxicidade, entretanto, a doxorrubicina encapsulada em NLS foi mais citotóxica em células resistentes do que a doxorrubicina livre indicando uma grande vantagem no encapsulamento deste quimioterápico (SUBEDI et al., 2009).

Carreadores lipídicos sólidos preparados com mistura de lipídeos Crodamol SS® e Crodamol GTCC® e PEG funcionalizado com folato e polipeptídeos sensíveis ao microambiente tumoral (TMSP) carreando docetaxel apresentaram alta citotoxicidade e internalização em células KB (célula de carcinoma de células escamosas bucal), HT-1080 (células de fibrosarcoma humano), MCF-7 (células de adenocarcinoma de mama) and A549 (células de adenocarcinoma de pulmão) quando comparados com o fármaco livre. Além disso, os NLC apresentaram alta eficiência de encapsulamento (>95%) e liberação sustentada do fármaco (GAO et al., 2013).

Quercetina (QT) foi encapsulada em carreador lipídico nanoestruturado CLN e sua atividade foi avaliada em células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Os CLN foram preparados com os lipídios sólidos gliceril tridecanoato e gliceril tripalmitato e com o lipídio oleoso foi utilizado o acetato de tocoferol (Vitamina E). Neste estudo foi verificado que CLN-QT aumentou significativamente a citotoxicidade sendo este efeito dose dependente (1-50 μ M) e induziu apoptose (na concentração de 20 μ M de QT) nas células MCF-7 e MDA-MB-231. Os autores indicaram que o aumento da citotoxicidade e da apoptose pode estar relacionado com o aumento da absorção de QT pelas células cancerosas quando esta está encapsulada nos CLN. Desta forma, estes estudos demonstram o grande potencial das NLS no carregamento de moléculas com atividade anticancer como a quercetina (SUN et al., 2014).

Varshosaz et al. (2014) mostrou que nanopartículas lipídicas sólidas preparadas com colesterol encapsulando quercetina apresentaram maior citotoxicidade (IC_{50} = 50 μ M) em relação ao fármaco livre (IC_{50} = 96 μ M) quando

avaliadas em ensaio *in vitro* de MTT na faixa de concentração de 1-50 μ M em ensaio *in vitro* em células de hepatocarcinoma (Hep2). As células neste estudo foram encubadas por 48 h com o tratamento de QT livre e encapsulada.

1.5 Funcionalização de Nanopartículas e Ácido Fólico (AF)

Pesquisadores têm buscado mecanismos adicionais aplicados aos nanocarreadores que possibilitem a internalização tumor específica. Para tanto, métodos estão sendo propostos e testados para direcionar os fármacos de forma mais direta às células cancerígenas, resultando em uma maior eficácia, toxicidade reduzida, minimizando os efeitos adversos e danos ao sistema imune e a perda de células de tecidos de rápida renovação. Uma das estratégias para direcionar fármacos à células tumorais é a funcionalização da superfície de nanopartículas. Esta funcionalização é realizada adicionando à superfície das partículas moléculas como proteínas, peptídeos, carboidratos entre outras moléculas que irão interagir com receptores exclusivamente expressos ou superexpressos (“upregulation”) na superfície das células tumorais e que são pouco expressos ou expressos insignificamente em células normais (SAMADIAN et al., 2016; LI et al. 2015; NAKAMURA et al., 2014).

Os receptores mais promissores são os de endocitose mediada que na presença de seu ligante desencadeiam a endocitose, levando a internalização da partícula nas células alvo (NOGUEIRA et al., 2016). Após a internalização destas partículas ocorre a liberação do fármaco, através da degradação intracelular dos nanocarreadores. Um exemplo destes receptores é o receptor de folato (RF) que tem sido identificado como um marcador tumoral, visto que se apresenta superexpresso nas células tumorais (SAMADIAN et al., 2016). O folato é um componente importante para a síntese das bases nitrogenadas que compõem o DNA (GHAZNAVI et al. 2015). Por isso, células cancerígenas apresentam superexpressão de RF para compensar a alta demanda de folato para a rápida produção de DNA e crescimento celular (SAMADIAN et al., 2016).

Yang et al. (2016) demonstrou que lipossomas com carga superficial positiva funcionalizadas com folato carreando o PEDF (fator derivado do epitélio pigmentado) apresentaram efeito tumoral superior que lipossomas com mesma carga superficial não funcionalizadas em células de câncer de colo de útero (HeLa). O PEDF é

glicoproteína com propriedades antitumoral relacionadas com a apoptose. Neste estudo, o aumento do efeito anticarcinogênico foi relacionado com a entrega sítio-específica via receptores de folato (RF).

Muralidharan et al. (2016) estudaram a entrega sítio-específica de siRNA-HuR. HuR é uma proteína de ligação ao RNA (HuR) que regula a expressão de RNAm cujas proteínas estão relacionadas com a proliferação de células tumorais. Neste estudo, foi verificado que nanopartículas poliméricas funcionalizadas com folato foram eficientes na entrega de siRNA-HuR via receptores de folato (RF) além de apresentar atividade antitumoral específica em células tumorais de pulmão (H1299) quando comparadas com células normais de fibroblasto humano (CCD16). Este efeito antitumoral em células H1299 está relacionado ao silenciamento da HuR pelo siRNA-HuR.

Varshosaz et al. (2012) utilizaram nanopartículas lipídicas sólidas de monoestearato de glicerila funcionalizadas com ácido fólico para carrear sinvastatina no tratamento de leucemia mielóide crônica. O estudo mostrou que o direcionamento das partículas foi muito mais eficiente comparando-se com o nanocarreador lipídico não funcionalizado. Além disso, a funcionalização do nanocarreador com folato aumentou de forma significativa o efeito citotóxico da sinvastatina na linhagem celular K562 em comparação com a sinvastatina na forma livre. Ademais, as nanopartículas funcionalizadas carreando sinvastatina apresentaram efeito sinérgico com a doxorrubicina, o que possibilita a diminuição da dose deste quimioterápico, minimizando seu efeito cardiotoxico.

Wu et al. (2010) utilizaram carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com ácido fólico e polietilenoglicol (PEG) no carregamento de paclitaxel visando o tratamento de câncer. A formulação nanoestruturada mostrou maior atividade antitumoral em relação à formulação usual de paclitaxel em modelo *in vitro* em células S-180. Nos experimentos *in vivo* os animais tratados com paclitaxel encapsulado em NLS-PEG-folato exibiram maior taxa de inibição do tumor (45%) comparado com os animais tratados com paclitaxel livre (37%).

Estudo utilizando células de carcinoma de bexiga urinária T24 demonstrou que conjugados de PEG com folato para a entrega de doxorrubicina apresentaram maior internalização e maior efeito citotóxico que o fármaco livre e o conjugado sem folato (YU et al., 2016). Este estudo mostrou ainda que a internalização foi dependente da quantidade de ácido fólico adicionada ao conjugado e que a distribuição do mesmo

na superfície do conjugado é importante para que ocorra maior interação com os receptores de endocitose mediada RF.

Portanto, os receptores de folato são um alvo terapêutico com potencial para entrega específica de fármacos em células de câncer de bexiga. Diante disso, carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizadas com folato veiculando quercetina são um sistema carreador interessante para a terapia do CB. Este sistema pode aumentar a estabilidade da QT, sua internalização em células tumorais e sua eficácia farmacológica. Cabe ressaltar que até o presente momento não há na literatura estudos sobre a utilização de carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com folato, carreando quercetina para a terapia do câncer de bexiga.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade *in vitro* em células de câncer de bexiga de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato encapsulando quercetina, visando explorar o potencial biológico deste flavonóide para futuro tratamento de câncer de bexiga pela via intravesical.

2.2 Específicos

1. Estudar a influência de variáveis independentes no processo de sonicação e nas propriedades físicas dos carreadores
2. Funcionalizar o estabilizante Pluronic com folato e caracterizar o mesmo;
3. Preparar carreador lipídico nanoestruturado (CLN) funcionalizados com folato e não funcionalizado com e sem quercetina pelo método de emulsão e sonicação;
4. Avaliar a quantidade máxima de quercetina que pode ser encapsulada nos carreadores desenvolvidos
5. Caracterizar os CLN com e sem quercetina quanto ao diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta por espalhamento de luz dinâmico (DLS);
6. Avaliar a estabilidade ao longo do tempo dos CLN armazenados a 4°C;
7. Avaliar a eficiência de encapsulamento da quercetina;
8. Caracterizar as partículas por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA);
9. Caracterizar as partículas por microscopia de força atômica (AFM);
10. Caracterizar as partículas por calorimetria exploratória diferencial (DSC);
11. Avaliar o perfil de liberação da quercetina pelo CLN;
12. Avaliar a citotoxicidade *in vitro* em células de câncer de bexiga (RT4) da quercetina (QT) livre e encapsulada e nanocarreadores vazios,
13. Avaliar a atividade antioxidante de QT livre e encapsulada *in vitro* pelo método da auto-oxidação do pirogalol.

3. MATERIAIS

1. Metanol, LOT. V14C17, J.T. BAKER, EUA
2. Acetonitrila, J.T. BAKER, EUA
3. Ácido acético, (HPLC), lot. 0000059109, J.T. BAKER, EUA
4. Quercetina $\geq 95\%$ (HPLC), lot. SLBD8415V, Sigma-Aldrich, EUA
5. Miristato de Miristila (Lipídeo MM), CRODA, Brasil
6. Mistura de cetil ésteres (Lipídeo SS), CRODA, Brasil
7. Poloxamer 188(Pluronic® F68), lot. MKBR8023V, Sigma-Aldrich, EUA
8. Óleo de coco, Lot. 91031614, COPRA, Brasil
9. Miglyol® 810, Brasquin, Brasil
10. Polissorbato 80 (Tween®80), Sigma-Aldrich, EUA
11. McCoy 5A Medium, Sigma-Aldrich, EUA
12. Penicilin-Streptomycin, Sigma-Aldrich, EUA
13. Trypsin- EDTA solution 10X, Sigma- Aldrich, EUA
14. Trypan blue solution, Sigma- Aldrich, EUA
15. PBS 10X, lot. SLBN4784V, Sigma-Aldrich, EUA
16. Neutral red, MERCK, Brasil
17. Álcool etílico, lot. 191407, Synth, Brasil
18. Ácido acético glacial, lote. 180536, Synth, Brasil
19. Cloreto de cálcio, LOT. 160231, Synth, Brasil
20. Cloreto de cácio, lot. 159256, Synth, Brasil
21. L-Ascorbic acid, lot. SZBE2190V, Sigma-Aldrich, EUA
22. Pyrogallol, lot. BCBK8578V, Sigma-Aldrich, EUA
23. TRIS AMINOMETANO, lot. 171971, Synth
24. Folic Acid, lot. 081m1546V, Sigma-Aldrich, EUA

4. MÉTODOS

4.1 Validação do método analítico de quantificação de quercetina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O método analítico de quantificação de quercetina pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência é uma adaptação do método utilizado por Ang et al. (2014). A validação deste método analítico foi conduzida segundo as recomendações da RE 899 da ANVISA (ANVISA, 2003). As figuras de mérito analisadas foram: linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e seletividade. Este método foi desenvolvido para a quantificação de quercetina presente em amostras de ensaios de determinação da eficiência de encapsulamento por método indireto de ultrafiltração e ensaio de liberação *in vitro* de QT por carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) em células de difusão de Franz.

4.1.1 Condições cromatográficas

O equipamento utilizado para as análises foi Shimadzu LC-10AT com detector SPD-M20AUV-VIS (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e coluna cromatográfica C18 ACE Generix (4.6 mm Å, 250 mm). A temperatura do forno foi de 30 °C e a fase móvel foi composta por acetonitrila e solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) na proporção de 35: 65 em modo de eluição isocrática com fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e as análises foram realizada no comprimento de onda de 370 nm. O tempo de análise foi de 12 minutos e o composto foi eluído no tempo de retenção de 6,6 minutos.

4.1.2 Construção das curvas de calibração e linearidade

Duas curvas de calibração foram construídas a partir de uma solução mãe de QT em metanol na concentração de 50 µg/mL. Para a primeira curva, na faixa de concentração de 0,25- 1,25 µg/mL prepararam-se soluções de QT com 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25 µg/mL em triplicata. Para a segunda curva, na faixa de

concentração de 5- 25 µg/mL foram preparadas em triplicata as seguintes soluções: 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL. As soluções para a construção das curvas de calibração foram preparadas em água deionizada (MilliQ, Milipore®) que é o solvente fraco da fase móvel para que o mesmo não interferisse no tempo de retenção da quercetina. As curvas foram ditas lineares quando apresentaram coeficiente de correlação (R^2) com valor superior a 0,99.

4.1.3 Precisão e Exatidão

A precisão de um método está relacionada, com a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostragens múltiplas. Enquanto a exatidão está relacionada com a proximidade de um valor obtido pelo método e o valor real ou verdadeiro (ANVISA, 2003). Para a determinação da precisão intra-corrida e exatidão foram analisadas três concentrações em triplicata para cada curva, sendo elas: 0,25; 0,75; 1,25 µg/mL para a primeira curva e 10, 20 e 25 µg/mL para a segunda curva.

A precisão foi determinada pela equação 1 e a exatidão foi determinada pela equação 2:

$DPR = \frac{DP}{CMD}$ (1), onde DP é o desvio padrão e CMD, concentração média determinada.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média amostral}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

4.1.3 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

Limite de quantificação é a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão nas condições experimentais estabelecidas. Limite de detecção é a menor quantidade de um analito que pode ser detectada e não necessariamente quantificada nas condições experimentais estabelecidas. Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) foram determinados pelas equações 3 e 4.

$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$ (3), em que *DPa* é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y e *IC* é a inclinação a partir das curvas construídas com as concentrações citadas

$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$ (4), em que *DPa* é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y e *IC* é a inclinação a partir das curvas construídas com as concentrações citadas.

4.1.4 Seletividade

A seletividade é uma figura de mérito que esta relacionada com a especificidade e é definida pela capacidade de um método de medir exatamente um dado composto em presença de outros componentes (ANVISA, 2003).

4.1.4.1 Seletividade para determinação da eficiência de encapsulamento (EE%)

A seletividade do método analítico de quantificação para avaliação da EE% foi realizada pela análise da presença de interferentes em amostras de carreadores vazios. Para tanto, as amostras de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) vazios e de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizado (CLN-F) vazios foram ultra-filtradas por 10 minutos a 5000g em filtro Microcon com corte de massa molar 10 kDa (Millipore). O sobrenadante foi injetado e analisado por CLAE. O método foi considerado seletivo ao não apresentar interferentes em concentrações quantificáveis no tempo de retenção de 6,6 minutos.

4.1.4.2 Seletividade para ensaio de liberação *in vitro* em células de difusão de Franz

O tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) acrescido de 0,5% de Tween® 80 foi avaliado quanto a sua influência no método analítico de quantificação de quercetina em ensaio de liberação *in vitro*. Para isto, o tampão foi filtrado em filtro 0,22 µm e depois foi analisado por CLAE. O método foi considerado seletivo quando não há interferentes em concentrações quantificáveis no tempo de retenção de 6,6 minutos.

4.2 Preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados

4.2.1 Planejamento fatorial

O planejamento fatorial determina a influência de fatores avaliados e suas interações em um dado processo utilizando um número mínimo de experimentos (GAMBHIRE et al., 2011). A avaliação das variáveis contribui, ainda, para a escolha da melhor combinação de fatores para a produção de carreadores com características desejadas ou interessantes ao estudo. A influência de alguns fatores no processo de produção e nas propriedades físicas dos carreadores preparados no presente trabalho foi estudada por dois planejamentos fatoriais sequenciais. Os experimentos foram conduzidos de acordo com a abordagem proposta por Neto et al. (2010).

Nos dois planejamentos realizados os fatores foram avaliados aleatoriamente em dois níveis (nível inferior (-) e nível superior (+)), sendo realizadas 2 réplicas de cada experimento ou de cada observação. Além disso, fatores não estudados que poderiam interferir no processo foram fixados como descrito na Tabela 1.

Tabela 1- Variáveis fixadas na preparação dos CLN

Variáveis fixadas	
Altura da ponta do sonificador	6 cm de profundidade com relação ao béquer
Concentração de Lipídeo SS	1% (m/v)
Concentração de óleo	0,2% (m/v)
Volume de fase aquosa	25 mL

4.2.2 Planejamento fatorial 2³

Para a primeira avaliação foi realizado um planejamento 2³ com os seguintes fatores: tipo de lipídeo (Miristato de Miristila, MM, ou Mistura de ésteres cetílicos, SS), porcentagem de estabilizante (1,0 ou 1,5%) e diâmetro do béquer (relação diâmetro do béquer/altura do líquido) como descrito na tabela 2. As variáveis resposta ou variáveis dependentes escolhidas foram: diâmetro e índice de

polidispersão (Pdl) das partículas. Todas as possíveis combinações dos fatores escolhidos resultaram em 8 diferentes experimentos ($2^3=8$) realizados em duplicata.

Tabela 2- Níveis e fatores do planejamento experimental 2^3 .

Níveis do planejamento		Nível inferior	Nível superior
Fatores	Codificação	-	+
Tipo de lipídeo	A	MM ^a	SS ^b
[Pluronic F68]	B	1,0	1,5
Diâmetro do béquer	C	3,5 cm	4,0 cm

^aMiristato de miristila, ^b ésteres cetílicos

4.2.3 Planejamento fatorial 2^2

Para o planejamento fatorial 2^2 , os fatores escolhidos foram: tipo de óleo (Miglyol® 810 ou Óleo de coco) e tempo de sonicação (10 ou 15 minutos) e as variáveis resposta foram: diâmetro e índice de polidispersão (Pdl) (Tabela 3). Este planejamento experimental originou 4 experimentos ($2^2=4$) com combinações diferentes dos fatores avaliados, realizados em duplicata.

Tabela 3-Níveis e fatores do planejamento 2^2

Níveis do Planejamento		Nível inferior	Nível superior
Fatores	Codificação	-	+
Tipo de óleo	A	Mygliol	Óleo de Coco
Tempo de sonicação (min)	B	10	15

A análise de variância realizada no software Minitab 17 foi utilizada para avaliação dos dados do planejamento, determinação da influência das variáveis e suas interações no processo de produção das nanopartículas. Os testes foram avaliados para um p com nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$). Equações de regressão foram geradas para demonstrar a contribuição de cada um dos fatores estudado para prever as variáveis resposta dos dois planejamentos fatoriais.

4.3 Preparação de Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

As nanopartículas foram preparadas pelo método de emulsão e sonicação. Para tanto, a fase aquosa foi composta pelo estabilizante Pluronic® F68 ou Pluronic funcionalizado com folato (PL68F) na concentração de 1 % (m/v). A fase oleosa apresentou em sua composição uma mistura de 1% (m/v) de lipídeo SS (lipídeo sólido a temperatura corpórea) e óleo de coco na concentração de 0,2% (m/v) acrescida ou não de 5 mg de quercetina. Ambas as fases foram aquecidas a 60°C (10°C acima da temperatura de fusão do lipídeo sólido) e, em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa. Este sistema foi sonicado por 10 minutos em sonicador de ponta (Sonics VCX 750, ponta de 13 mm, amplitude de 40%) sem controle de temperatura. Após o processo de sonicação a dispersão de nanopartículas foi resfriada em banho de água fria até atingir 25°C, obtendo assim, os CLN. A figura 4 mostra o esquema de preparação de nanocarreadores.

Figura 4- Esquema do método de preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados por emulsão e sonicação.

4.4 Distribuição de tamanho das partículas e Potencial Zeta

O diâmetro médio (z-average) e o índice de polidispersão (Pdl) dos CLN foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando o aparelho NanoSize ZS (Malvern). Enquanto a carga superficial das nanopartículas (potencial zeta) foi avaliada por espalhamento de luz eletroforético utilizando o mesmo equipamento. Todas as análises foram feitas com amostras diluída em solução de KCl (Synth) 1mM a 25°C. A estabilidade das dispersões também foi avaliada por estes métodos pelo período de 330 dias mantendo as amostras a 4°C. Utilizou-se como sistema conservante, para essas amostras, a mistura de metilparabenos (0,15% (m/v)) e propilparabenos (0,05% (m/v)). A mistura dos parabenos é amplamente usada para a preservação de cosméticos e produtos farmacêuticos. Além de ser muito usada em formulações farmacêuticas parenterais (KOKOLETSI et al., 2005).

4.5 Avaliação da quantidade de quercetina (QT) encapsulada

O estudo da quantidade de quercetina a ser encapsulada foi realizado visando encapsular a quantidade máxima de fármaco no carreador preparado. As quantidades de quercetina avaliadas foram: 5, 8, 10 e 12 mg. As dispersões foram analisadas quanto ao diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ), eficiência de encapsulamento (EE) e quanto à homogeneidade. O diâmetro e índice de polidispersão foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), enquanto a carga superficial das nanopartículas (potencial zeta) foi mensurada por espalhamento de luz eletroforético; ambos utilizando o aparelho NanoSize ZS (Malvern). A eficiência de encapsulamento foi determinada pelo método descrito na seção 4.1. A homogeneidade da dispersão foi avaliada a olho nu pelo período de 15 dias. As dispersões de nanopartículas foram consideradas não homogêneas pela presença de aglomerados e precipitados e/ou pela ocorrência de separação de fase.

4.6 Determinação da Eficiência de Encapsulamento (EE%) por método indireto

A eficiência de encapsulamento foi determinada por método indireto. Para isso, 500 µL de dispersão de nanopartículas contendo QT foram adicionados ao sistema

de filtração Microcon com corte molar de 10kDa e, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 5000g. A quercetina livre ou não encapsulada foi quantificada no filtrado e depois subtraída da quantidade total de QT adicionada na dispersão durante o processo de preparação das nanopartículas ([QT]_{inicial}), obtendo-se, assim, a concentração de quercetina encapsulada ([QT]_{encap.}). O método utilizado para quantificação foi a cromatografia líquida de alta eficiência como descrito no seção 4.1. A EE% foi calculada segundo a equação 9:

$$EE\% = \frac{[QT]_{\text{encapsulada}}}{[QT]_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (9)$$

4.7 Funcionalização do Pluronic F68 com ácido fólico

4.7.1 Reação de funcionalização

A metodologia utilizada para a funcionalização do Pluronic F68 (PF68F) com ácido fólico (AF) foi descrita por Lin et. al. (2009). Para tanto, 87,58 mg de ácido fólico e 35,32 g 1,1'- carbonildiimidazol foram pesados em balão de fundo redondo de 25 mL e dissolvidos em 3 mL de DMSO seco. A reação permaneceu ao abrigo da luz sob agitação magnética e atmosfera inerte de N₂ por um dia (etapa de ativação de ácido fólico). Após este período, 0,62 g de Pluronic F68, previamente seco em dessecador de auto vácuo, foram diluídos em 1 mL de DMSO e adicionados à reação. A reação foi mantida ao abrigo da luz, sob atmosfera de N₂ e agitação por 24 h (etapa de esterificação). Posteriormente, o produto foi submetido à diálise com água deionizada por 3 dias, usando membrana de acetato de celulose (Fisher, MWCO 3500). A água foi trocada em intervalos de 6 h. Após a etapa de diálise, o Pluronic funcionalizado foi recuperado por liofilização. A figura 5 mostra o esquema da reação de funcionalização. Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Química dos Heterociclos da FCFRP em colaboração com o Prof. Dr. Flávio da Silva Emery.

Figura 5- Representação esquemática da reação de funcionalização do Pluronic F68 com folato.

4.7.2 Identificação do Pluronic F68 funcionalizado com ácido fólico

4.7.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensional de ^1H

A reação de funcionalização do Pluronic com ácido fólico foi confirmada por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensional de ^1H . O espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H foi determinado em espectrômetro Bruker–Advance DRX500, operando em 500 MHz. A amostra foi preparada em solvente deuterado: DMSO- d_6 . A análise foi realizada no Departamento de Química da FFCLRP/USP.

4.7.2.1 Espectrofotometria UV-VIS para pesquisa de PL68AF

Amostras de Pluronic F68 e Pluronic funcionalizado com folato foram preparadas em água destilada na concentração de 1,5% (m/v) e analisadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV 25/50) em modo varredura. Tais amostras foram analisadas em triplicata.

4.8 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A análise de rastreamento de nanopartículas foi realizada no equipamento NanoSight NS300 (Malvern, Reino Unido) equipado com laser vermelho (642 nm) e software NTA 3.1. As amostras de CLN e CLN-F-QT foram diluídas em água deionizada (1:1000) antes da análise. Os CLN-F e CLN-F-QT também foram diluídos em água deionizada nas proporções de 1: 250 e 1: 500 respectivamente. Para cada amostra foram coletados 5 vídeos.

4.9 Microscopia de força atômica (AFM)

A morfologia das nanopartículas foi determinada por microscopia de força atômica usando microscópio de varredura Shimadzu (modelo SPM-9600) que operou em modo tapping à temperatura ambiente. Para esta análise foram utilizadas pontas de silício (PPP-NCHR) de comprimento de $125 \pm 10 \mu\text{m}$, frequência de ressonância de $204 \pm 497 \text{ kHz}$ e constante de força de 10-130 N/m. A dispersão de CLN foi gotejada sobre a mica recém-clivada e seca com jato de argônio antes da análise.

4.10 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A cristalinidade das nanopartículas foi avaliada por DSC. Os termogramas foram obtidos em um Calorímetro (Shimadzu DSC-50) usando porta-amostra padrão de alumínio selado. As análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio (fluxo de $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), na faixa de temperatura de 15 a $+360^\circ\text{C}$ (taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$). O índice de recristalização (IR%) foi calculado pela equação 10 (SHAH et al., 2010):

$$\text{IR}\% = \{ \Delta H_{\text{CLN}} / (\Delta H_{\text{LIPIDEO PURO}} \times \text{fração de fase lipídica}) \} \times 100 \quad (10)$$

4.11 Ensaio de liberação *in vitro*

4.11.1 Determinação do coeficiente de solubilidade de Quercetina

O coeficiente de solubilidade foi determinado com o intuito de estabelecer as condições sink e a escolha do meio receptor do ensaio de liberação de quercetina *in vitro*. O meio do compartimento receptor foi determinado por ensaios prévios de solubilidade da quercetina. Os meios estudados foram: tampão fosfato pH 7,4 contendo 0%; 0,5%, 2% e 5% (m/v) de Tween 80.

Neste ensaio, QT em excesso (25 mg) foi adicionada a 15 mL de meios receptores testados. Este sistema foi submetido à agitação magnética por 24 horas, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Ao término de 24 horas, a amostra foi filtrada em filtro com corte de 0,22 μm e analisada por CLAE, nas condições cromatográficas descritas no seção 4.1. Os cálculos das quantidades de quercetina foram realizados segundo as equações das curvas de calibrações construídas.

A partir da análise da amostra contendo QT determinou-se a quantidade máxima de QT que pode ser solubilizada no meio receptor de escolha sem que ocorra saturação.

4.11.2 Ensaio do perfil de liberação *in vitro* em células de difusão de Franz

Os estudos de liberação *in vitro* de CLN-QT foram realizados em células de difusão do tipo Franz em sistema de coleta automatizado no aparelho Hanson.

O sistema foi composto de compartimento doador (0,3 mL) com área de liberação de 1,77 cm^2 separado por membrana de acetato de celulose (Millipore®, MWCO 4000-6000) do compartimento receptor contendo 7,0 mL de meio receptor e mantido a 37°C sob agitação magnética (600rpm). O meio receptor foi composto de tampão fosfato pH 7,4 (0,1M) acrescido de 0,5% de Tween 80.

O compartimento doador foi preenchido com 0,3 mL de CLN-QT e ocluído para evitar evaporação. O sistema foi mantido a 37°C sob agitação magnética (600 rpm). Em intervalos pré-determinados (4-6h), durante o período de 72h, amostras de 1mL de meio receptor foram coletadas e para manter o volume do compartimento receptor constante o volume foi repostado imediatamente por meio receptor fresco. 102 coletas foram realizadas ao longo de 72h e, em seguida, analisadas por CLAE.

O perfil de liberação de quercetina pelos carreadores lipídicos nanoestruturados foi testado quanto ao modelo cinético de liberação envolvido. Para

tanto, cálculos matemáticos foram realizados como descrito na Tabela 4 (COSTA et al., 2000). O modelo cinético escolhido foi o que apresentou maior valor de coeficiente de correlação linear (R^2).

Tabela 4- Modelos cinéticos aplicados ao perfil de liberação de quercetina em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).

Modelos cinéticos	Equações Matemáticas
Ordem zero ^a	$Q_t = Q_0 + K_0 t^*$
Primeira ordem ^b	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t^*$
Korsmeyer- Peppas ^c	$Q_t/Q_\infty = K_k t^{n^*}$
Higuchi ^d	$Q_t = K_H \sqrt{t^*}$
Hixson-Crowell ^e	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_s t^*$

*Em que: Q_t : quantidade de fármaco liberado no tempo t

Q_0 : quantidade de fármaco inicial

^a K_0 : constante da cinética de ordem zero;

^b K_1 : constante de primeira ordem;

^c Q_t/Q_∞ : fração de fármaco que foi liberada no tempo t / quantidade liberada do fármaco quando t é infinito, n : expoente de liberação difusional que sugere o mecanismo de transporte.

^d K_H : constante de dissolução de Higuchi;

^e K_s : constante da relação superfície-volume

4.12 Estudos de Citotoxicidade em células de linhagem de câncer de bexiga (RT4)

4.12.1 Cultivo das Células

Neste estudo foram utilizadas células de linhagem de câncer de bexiga RT4 do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em cultura contínua, através de repiques periódicos até atingirem a confluência de 80%. O cultivo foi realizado em meio McCoy5A contendo 1% de antibiótico (Penicilina-Streptomicina), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). As células foram desprendidas usando solução de tripsina 1X em PBS 1X (Trypsin- EDTA solution 10X) e contadas para cultivo e plaqueamento em câmara de Neubauer usando uma alíquota homogeneizada da suspensão celular com quantidade equivalente de solução de Azul de Tripán (0,4% v/v). A incubação foi realizada em estufa (COM-

19AIC (UV), Panasonic) a 37 °C sob atmosfera úmida e com 5% de CO₂. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultivo de Células e Bioprocesso da FCFRP em colaboração com a Profa. Dra. Kamilla Swiech Antonietto.

4.12.2 Ensaio de captura do corante vermelho neutro (análise da integridade lisossomal)

O ensaio de captura do corante vermelho neutro utilizado é uma adaptação da metodologia descrita por Borenfreund et al. (1984). O método proporciona estimativa quantitativa do número de células viáveis, é um dos testes de viabilidade mais utilizados e possui muitas aplicações biomédicas e ambientais. O mecanismo de determinação da viabilidade baseia-se na incorporação do corante pelos lisossomos das células viáveis que, sendo fracamente catiônicos, penetram membranas e se ligam a tensoativos aniônicos ou grupos fosfatos presentes na matriz lisossomal (REPETTO et al., 2008).

Para o ensaio de citotoxicidade, o plaqueamento foi realizado inoculando 5 x 10⁴ células/mL em cada poço da placa (96 poços). As células foram incubadas à 37°C por 24 h e, posteriormente, tratadas com diferentes concentrações de QT livre, CLN-QT, CLN-F-QT, CLN e CLN-F. As concentrações avaliadas foram: 113, 100, 90, 80, 70, 60, 40 e 20 µg de QT/mL para QT livre, CLN-QT e CLN-F-QT. O carreador vazio CLN foi adicionado na faixa de concentrações de 6,65x10¹² a 1,89x10¹¹ CLN /mL. O carreador CLN-F foi utilizado na concentrações de 9,45x10¹¹ a 1,67x10¹⁰ CLN-F/ mL.

Após 24 h ou 48h o meio de cultura contendo QT livre ou carreadores foi removido e as placas foram lavadas com PBS 1X. Posteriormente, foi adicionado meio McCoy 5A completo acrescido de vermelho neutro na concentração de 50 µg/mL. Em seguida, as células foram incubadas por 3h, tempo necessário para a incorporação do corante pelos lisossomos das células RT4 viáveis. Após este período, o meio foi retirado cuidadosamente e foram adicionados 200 µL da solução de fixação (formaldeído 1% / carbonato de cálcio 1% / 49% água deionizada). Posteriormente, a solução de fixação foi descartada e todos os poços lavados com 200 µL de solução salina (0,9% NaCl). Em seguida, 200µL de solução reveladora (Etanol 50%/ ácido acético glacial 1% / água deionizada) foram adicionados aos poços. As placas foram, por fim, agitadas em um agitador de placas por 10 min e as

absorvâncias das soluções presentes nos poços foram medidas em Microplate reader (Molecular Devices- SPECTRAmax/Plus384) a 540 nm (BORENFREUND et al., 1984). Para a determinação dos valores de IC_{50} foi utilizado o software *Graph Pad Prism* versão 5.01.

4.13 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* da quercetina livre e encapsulada pelo método de auto-oxidação do pirogalol e sequestro de radicais superóxidos

O método de sequestro de radicais superóxidos para determinação da atividade antioxidante *in vitro* é uma adaptação da metodologia descrita por Chen-yu et al. (2012).

O pirogalol sofre auto-oxidação em meio levemente alcalino e os produtos desta oxidação, radicais superóxidos, apresentam absorção na região do comprimento de onda de 325 nm. Na presença de compostos antioxidantes a reação de auto-oxidação diminui ou cessa. Como controle positivo foi utilizada a vitamina C, que é um poderoso agente antioxidante, inibindo 100% da reação de auto-oxidação.

4.13.1 Preparação de controles e amostras

Controle Negativo: 4,5 mL de tampão THIS 50 mM, 1 mL de álcool etílico, , 0,15 mL de pirogalol (25 mM) e 3,2 mL de água destilada

Controle positivo: 4,5 mL de tampão THIS 50 mM, 1 mL de álcool etílico, 0,15 mL de pirogalol (25 mM) e 3,2 mL de Vitamina C na concentração de 1,135 mM.

As amostras foram preparadas para que a quantidade de quercetina adicionada fosse equivalente à massa adicionada de vitamina C.

Quercetina livre: 1 mL solução de quercetina livre na concentração de 2,11 mM preparada em álcool etílico foi misturado a 4,5 mL de tampão THIS 50 mM, 1 mL de álcool etílico, 3,2 mL de água destilada e 0,15 mL de pirogalol (25 mM).

Amostras de partículas: 2,8 mL de CLN-Q ou CLN-F-Q foram misturados a 17,1 mL de tampão THIS 50mM, 1 mL de álcool etílico, 12,2 mL de água destilada e 0,57 mL de pirogalol (25 mM).

Os controles e as amostras foram rapidamente homogeneizados, incubadas por 30 segundos a 25°C, e analisadas em espectrofotômetro (T70/T70 UV-VIS Spectrophotometers, PG Instruments) no comprimento de onda de 325 nm em modo cinética por 20 minutos.

1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do método analítico de quantificação de quercetina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O método de eluição isocrática com fase móvel composta por acetonitrila e solução de ácido acético 1% (v/v) na proporção de 35:65 foi eficiente em eluir a quercetina com pico definido no tempo de retenção de 6,6 minutos (Figura 6). Tal método já havia sido descrito por Ang et al. (2014) de eluição isocrática para separação de QT usando como fase móvel a mistura de acetonitrila: água ácida (ANG et al., 2014).

Figura 6- Cromatograma de padrão de quercetina (QT) na concentração de 1,25 µg/mL

As curvas de calibração médias foram construídas em triplicata para a quantificação de QT por CLAE para duas faixas de trabalho. Para a primeira curva analítica média construída na faixa linear entre 0,25-1,25µg/ml, a equação da reta foi: $y = -1934,3 + 27429,4x$ e o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,9913 (Figura 7). Para a segunda curva média estabelecida com faixa linear de 5-25µg/ml, a equação da reta foi: $y = -239469,29 + 80342,96x$ e o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,9965 (Figura 8). Ambas as curvas apresentaram linearidade segundo a ANVISA (2003) ($R^2 > 0,99$). As duas curvas com diferentes faixas de concentração foram construídas para quantificar amostras distintas de QT oriundas dos diversos tempos de coleta do ensaio do perfil de liberação em células de difusão do tipo Franz e também em amostras de eficiência de encapsulamento.

Figura 7- Linearidade do método analítico de quantificação de quercetina (QT) por CLAE (Faixa 0,25-1,25 µg/mL).

Figura 8- Linearidade do método analítico de quantificação de quercetina (QT) por CLAE (Faixa 5-25 µg/mL)

A tabela 5 apresenta os resultados de precisão e exatidão. Os valores de precisão, calculados pela determinação do desvio padrão relativo, não ultrapassaram 5%, ficando, assim dentro do valor preconizado pela RE899 da ANVISA (2013).

Os valores de recuperação média variaram entre 99-105% que está dentro do preconizado pela UNITED States Pharmacopeia 2007. Portanto, o método é preciso e exato.

Os valores de limite de detecção e quantificação para a primeira curva foram 0,04 µg/mL e 0,15 µg/mL, respectivamente. Para a segunda curva os limites de detecção e de quantificação foram 1,10 µg/mL e 3,67 µg/mL, respectivamente.

Tabela 5. Exatidão (%) e Precisão (DPR) do método analítico de quantificação

[QT] Teórica (µg/mL)	[QT] Média (µg/mL)	Desvio Padrão (DP)	Precisão DPR (%)	Exatidão (%)
0,25	0,252	0,003	1,22	100,85
0,75	0,718	0,030	4,12	95,74
1,25	1,304	0,028	2,12	104,31
10	9,910	0,030	0,34	99,08
15	14,99	0,050	0,31	99,93
20	20,27	0,100	0,51	101,35

A seletividade do método foi determinada através da análise por CLAE da presença de interferentes na formulação vazia não funcionalizada (CLN) e funcionalizada (CLN vazia) e no tampão fosfato, usado no ensaio de perfil de liberação. O método analítico foi seletivo para a quantificação de quercetina, pois para todas as amostras analisadas não houve pico cromatográfico no tempo de retenção de 6,6 minutos e, portanto, não há interferentes tanto nas formulações de CLN (Figura 9) e CLN-F (Figura 10) como no tampão (Figura 11).

Figura 9- Cromatograma do filtrado de CLN vazia.

Figura 10- Cromatograma do filtrado de CLN-F vazia.

Figura 11- Cromatograma de tampão fosfato (pH 7,4) acrescido de 0,5% de Tween 80 usado em ensaio de perfil de liberação *in vitro*.

5.2 Avaliação da influência de fatores no processo de produção e propriedades físicas dos carreadores por planejamento fatorial

A influência de alguns fatores no processo de sonicação e nas propriedades físicas dos carreadores preparados foi estudada por dois planejamentos fatoriais sequenciais. O planejamento fatorial determina a influência de fatores avaliados e suas interações em um dado processo utilizando um número mínimo de experimentos (GAMBHIRE et al., 2011). Ademais, no contexto de desenvolvimento de nanopartículas, o planejamento contribui para a escolha da melhor combinação de fatores que resulta em carreadores com características desejadas ou interessantes ao estudo.

Para o trabalho em questão as características desejadas aos carreadores foram: menor diâmetro, baixo índice de polidispersão (Pdl) e distribuição monomodal de tamanho. A escolha do melhor carreador foi baseada na análise estatística de variância da influência das variáveis independentes estudadas.

5.2.1 Planejamento fatorial 2^3

Para o planejamento fatorial 2^3 , 8 experimentos aleatórios foram realizados em duplicata. Os experimentos distinguem entre si pela composição das dispersões de nanopartículas e pelo tipo de béquer utilizado no preparado das partículas como descrito na seção 4.2 da metodologia e nas tabelas 6 e 7.

A Tabela 6 mostra as oito diferentes combinações aleatórias dos fatores estudados e as médias de duas observações para as variáveis resposta diâmetro e Pdl.

Tabela 6- Matriz do Planejamento Fatorial 2^3 .

Ensaio	Tipo de lipídeo	% de Pluronic	Diâmetro do béquer	Diâmetro* (nm)	Pdl*
1	-	-	-	155,85	0,23
2	+	-	-	163,05	0,15
3	-	+	-	144,05	0,25
4	+	+	-	136,60	0,19
5	-	-	+	155,05	0,19
6	+	-	+	159,40	0,15
7	-	+	+	142,15	0,27
8	+	+	+	163,70	0,18

*Média de dois experimentos

As figuras 12 e 13 mostram os resultados da análise estatística de variância para um valor de p com nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$). Nos gráficos de Pareto, os fatores que apresentam efeito significativo nas variáveis respostas ultrapassam a linha tracejada que representa o valor de 2,306 ($p=0,05$). Portanto,

nenhum dos fatores estudados apresentou influência significativa ($p > 0,05$) na variável resposta diâmetro das nanopartículas preparadas. No entanto, os fatores tipo de lipídeo e concentração de estabilizante influenciaram de forma significativa a variável resposta Pdl ($p < 0,05$). Ademais, os fatores estudados não apresentaram interações entre si. Estes dados foram confirmados pelas tabelas 7 e 8.

Figura 12- Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para os fatores tipo de lipídeo (A), porcentagem de estabilizante (B) e relação diâmetro do bécquer e altura do líquido submetido ao processo de sonicação (C) e interações entre A e B (AB), entre B e C (BC) e entre A, B e C (ABC) para a resposta diâmetro de partículas.

Figura 13- Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para os fatores tipo de lipídeo (A), porcentagem de estabilizante (B) e relação diâmetro do bécquer e altura do líquido submetido ao processo de sonicação (C) e interações entre A e B (AB), entre B e C (BC) e entre A, B e C (ABC) para a resposta índice polidispersão (Pdl) de partículas.

Tabela 7- Análise estatística de variância para variável resposta diâmetro do planejamento fatorial 2^3 .

Fatores avaliados e suas interações	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de f	Valor de p
A	164,4806	1	164,4806	0,6756	0,4349
B	548,7306	1	548,7306	2,2538	0,1717
C	107,6406	1	107,6406	0,4421	0,5248
A*B	1,6256	1	1,6256	0,0067	0,9369
A*C	170,9556	1	170,9556	0,7022	0,4264
B*C	219,7806	1	219,7806	0,9027	0,3699
A*B*C	253,6056	1	253,6056	1,0416	0,3373
Error	1947,7850	8	243,4731		

Tabela 8- Análise estatística de variância para variável resposta índice de polidispersão (Pdl) do planejamento fatorial 2^3 .

Fatores e suas interação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de f	Valor de p
A	0,0195	1	0,0195	44,0424	0,0002
B	0,0084	1	0,0084	18,9837	0,0024
C	0,0003	1	0,0003	0,6327	0,4493
A*B	0,0002	1	0,0002	0,3666	0,5616
A*C	0,0000	1	0,0000	0,0317	0,8631
B*C	0,0003	1	0,0003	0,5955	0,4625
A*B*C	0,0010	1	0,0010	2,2020	0,1761
Error	0,0035	8			

5.2.1.1 Avaliação do fator: tipo de lipídeo

Os tipos de lipídeos utilizados neste planejamento fatorial foram Miristato de Miristila (MM) e Mistura de ésteres cetílicos (SS).

O lipídeo sólido a temperatura corpórea Miristato de Miristila é amplamente utilizado no preparo de nanoestruturas sendo principalmente empregado na produção de nanopartículas lipídicas sólidas (RUI BECK et al., 2011; ISLAN et al., 2016; RIDOLFI et al., 2012). Assim como o lipídeo MM o lipídeo SS é descrito na literatura como comumente utilizado no preparo de nanopartículas lipídicas sólidas (SUTARIYA et al., 2015; DURÁN et al., 2014). Devido a isso, tais lipídeos sólidos foram selecionados para preparo dos carreadores deste estudo.

Avaliando os resultados apresentados na Tabela 6 em relação ao tamanho dos carreadores preparados com os lipídeos SS e MM, observa-se que o diâmetro médio destes carreadores variam entre 142 e 163 nm e que estes são muito semelhantes.

Além disso, como discutido anteriormente o fator tipo de lipídeo não influenciou de forma significativa ($p=0,4349$, Tabela 7) a variável resposta diâmetro dos carreadores. Devido a isso, não foi possível escolher ou excluir experimentos avaliando somente a resposta diâmetro.

Segundo a Tabela 6, o Pdl das formulações variou de 0,15 a 0,27. O índice de polidispersão (Pdl) é indicativo da homogeneidade ou não das dispersões de nanopartículas sendo que valores de Pdl inferiores a 0,3 indicam baixa polidispersão com faixa estreita de distribuição de tamanho de partícula, sendo, portanto, considerada ideal (UNER et al., 2004; TOMASINA et al., 2013; MARCATO et. al., 2008). Desta forma, analisando-se a Tabela 6 verifica-se que todas as formulações preparadas com o lipídeo SS apresentaram Pdl inferior a 0,2 (experimentos 2, 4, 6 e 8), enquanto apenas uma formulação preparada com o lipídeo MM (experimento 5) apresentou Pdl nesta faixa. No entanto, o perfil de distribuição de tamanho foi bimodal para todos os carreadores preparados com o lipídeo MM (experimentos 1,3,5,7) (Figura 14). Este perfil bimodal é característico de distribuições mais polidispersas. Devido a isso, as formulações preparadas com o lipídeo MM não foram consideradas adequadas. Portanto, o lipídeo SS foi escolhido para compor o CLN deste trabalho.

Figura 14- Perfil de distribuição de tamanho das partículas preparadas com o lipídio SS e com 1% de Pluronic F68 (experimento 2) (curva em verde) e das partículas preparadas com o lipídeo MM e com 1,0% de Pluronic F68 (experimento 1) (curva em vermelho).

5.2.1.2 Avaliação do fator: concentração de estabilizante

As concentrações do estabilizante eletroestérico Pluronic avaliadas foram de 1 e 1,5%.

O Pluronic F68 (poloxamer 188) é um tensoativo amplamente utilizado na preparação de nanopartículas aprovado pelo FDA. Estudos revelam que este estabilizante pode estar relacionado com o aumento da internalização de nanoestruturas por células de câncer de mama (YAN et al., 2010) e ainda com a sensibilização de tecido tumorais multidrogas resistentes (MOGHIMI, HUNTER, 2000). Além disso, este estabilizante contribui para a preparação de nanopartículas lipídicas com faixa estreita de tamanho e alta estabilidade ao longo do tempo. Devido a isso, o Pluronic F68 foi escolhido para compor os CLN.

Sabe-se que a escolha e a concentração de tensoativo ou estabilizante tem um papel significativo na qualidade e propriedades de superfície de carreadores lipídicos. A melhor escolha do sistema estabilizante contribui para uma maior estabilidade prevenindo, de forma eficiente, a agregação das partículas (ÜNER et al., 2004). Além disso, quantidades muito baixas de tensoativo podem não conferir estabilidade à partícula, ao passo que, uma quantidade muito alta pode gerar uma instabilidade termodinâmica intrínseca no sistema levando a uma alta adsorção do tensoativo na superfície das partículas e consequente agregação (FREITAS E MÜLLER, 1999; GOPPERT and MÜLLER, 2005). Todos estes fatores tornam relevante à avaliação da melhor concentração de tensoativo para a formulação de interesse.

A análise estatística deste fator mostrou que o mesmo afetou significativamente ($p=0,0024$, $p<0,05$ - Tabela 8) o Pdl das nanopartículas. Além disso, de acordo com o perfil de distribuição de tamanho de partícula (Figura 15), o aumento da concentração do estabilizante ocasionou o alargamento da banda de distribuição, o que é característico de uma formulação mais polidispersa. Este resultado foi confirmado pelos valores de Pdl, visto que as partículas preparadas com o lipídeo SS e com 1% de Pluronic F68 apresentaram menores valores de índice de polidispersão em relação às partículas preparadas com 1,5% (Tabela 6). Desta forma, a concentração de 1% de estabilizante foi escolhida para os demais experimentos deste trabalho. Devido a isso, a estabilidade desta preparação foi avaliada com o tempo, visto que além de obter um carreador com tamanho pequeno e baixa polidispersão, o intuito deste estudo é, ainda, obter um carreador estável. A estabilidade desta formulação é apresentada na seção 5.2.1.4.

Figura 15. Perfil de distribuição de tamanho para as partículas preparadas com o lipídeo SS e com: 1% de Pluronic F68 (experimento 2, Tabela 6) (curva em vermelho) e com 1,5% de Pluronic F68 (experimento 4, Tabela 6) (curva em verde).

5.2.1.3 Avaliação do fator: diâmetro do béquer (relação diâmetro do béquer/ altura do líquido)

Os diâmetros de béquer avaliados foram 3,5 cm (menor) e 4,0 cm (maior). Trata-se de um fator interessante para ser avaliado, visto que, alterando o diâmetro do béquer, altera-se a área disponível para a propagação das ondas emitidas pelo sonificador e para o processo de cavitação que ocorre durante a sonicação da amostra (TAUROZZI et al., 2011).

A análise estatística de variância mostrou que o fator diâmetro do béquer não apresenta efeito significativo ($p=0,5248$, $p>0,05$ - Tabela 7) nas variáveis resposta diâmetro e Pdl. Ademais a Figura 16 indica que não houve alteração no perfil de distribuição de tamanho das partículas preparadas com béquer de menor (experimento 2) e maior diâmetro (experimento 6). Como ao fazer uso de um béquer com menor diâmetro, no processo de sonicação, tem-se um aumento da altura do líquido e, conseqüentemente, ampliação da área exposta às ondas emitidas pelo sonificador (TAUROZZI et al., 2011), o béquer de 3,5 cm de diâmetro foi o escolhido.

Figura 16- Perfil de distribuição de tamanho das partículas preparadas com o lipídeo SS, com 1% de Pluronic F68 preparadas com: béquer de forma alta (experimento 2, Tabela 6) (curva em vermelho) e béquer de forma baixa (experimento 6, Tabela 6) (curva em verde).

Em função de todos os experimentos discutidos acima, a formulação escolhida foi a composta por 1% do lipídeo SS, 1% de estabilizante Pluronic F68 e preparada no béquer de menor diâmetro. Esta formulação foi escolhida por ter apresentado diâmetro abaixo de 200 nm, baixa polidispersão (abaixo de 0,3) e distribuição de diâmetro monomodal.

5.2.1.4 Estabilidade do CLN escolhido no planejamento fatorial 2³

A estabilidade física do carreador escolhido foi avaliada quanto ao diâmetro, Pdl e potencial zeta. Estas partículas foram armazenadas em refrigerador a 4 °C durante o período de 50 dias. As figuras 17 e 18 abaixo mostram que as partículas contendo 1% de estabilizante Pluronic apresentaram alta estabilidade com baixa variação de diâmetro, Pdl e potencial zeta ao longo de 50 dias. Portanto, a formulação com 1% satisfaz os critérios do carreador de interesse, pois apresenta alta estabilidade além de apresentar baixo Pdl e perfil de distribuição de tamanho monomodal e com banda estreita como discutido na seção 5.2.1.2.

Figura 17- Valores de diâmetro e índice de polispersão (Pdl) de CLN vazias preparadas com o lipídeo SS e com 1% de Pluronic F68 em função do tempo.

Figura 18- Valores de potencial zeta (PZ) de CLN vazias preparadas com o lipídeo SS e com 1% de Pluronic F68 em função do tempo.

5.2.2 Planejamento Fatorial 2²

O carreador escolhido no estudo acima foi usado como base para o planejamento fatorial 2². Neste planejamento avaliaram-se outros dois fatores quando a sua influência no diâmetro e PDI de carreadores lipídicos nanoestruturados, sendo eles: tipo de óleo (Miglyol® 810 ou óleo de Coco) e tempo de sonicação (10 e 15 minutos), como descrito na Tabela 9.

A Tabela 9 mostra a distribuição dos fatores nos dois níveis estudados, suas possíveis combinações aleatórias e as médias de duas observações para cada uma das variáveis resposta.

Tabela 9- Matriz do Planejamento Fatorial 2².

Experimento	Tipo de óleo	Tempo de sonicação	Diâmetro (nm)*	Pdl*
1	-	-	171,85	0,14
2	+	-	171,10	0,15
3	-	+	174,95	0,11
4	+	+	171,60	0,17

*Média de dois experimentos

Para os dois fatores abordados neste planejamento fatorial foram realizadas análises estatística de variância. Nos gráficos de Pareto as barras referentes aos fatores que influenciam as variáveis resposta significativamente ultrapassam a linha tracejada no valor de 2,776 ($p=0,05$). As figuras 19 e 20 indicam, portanto, que nenhum dos fatores estudados apresentou influência significativa ($p>0,05$ - Tabela 10) sobre a variável resposta diâmetro de partículas e não houve interações destes fatores entre si. Contudo, o fator tipo de óleo influenciou a variável resposta Pdl ($p<0,05$ - Tabela 11) como será discutido abaixo.

Figura 19- Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para os fatores tipo de óleo (A), tempo de sonicação (B) e interações entre tipo de lipídeo e tempo de sonicação (AB) para a resposta diâmetro de partículas.

Figura 20- Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para os fatores tipo de óleo (A), tempo de sonicação (B) e interações entre tipo de lipídeo e tempo de sonicação (AB) para a resposta índice de polidispersão (Pdl).

Tabela 10- Análise estatística de variância para variável resposta diâmetro do planejamento fatorial 2^2 .

Fatores e suas interações	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos Quadrados	Valor de f	Valor de p
A	8,2013	1	8,2013	5,6805	0,0757
B	6,3013	1	6,3013	4,3645	0,1049
A*B	3,5113	1	3,5113	2,4320	0,1939
Error	5,7750	4	1,4438		

Tabela 11- Análise estatística de variância para variável resposta índice de polidispersão (Pdl) do planejamento fatorial 2^2

Fatores e suas interações	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos Quadrados	Valor de f	Valor de p
A	0,0023	1	0,0023	10,4330	0,0320
B	0,0000	1	0,0000	0,0939	0,7745
A*B	0,0012	1	0,0012	5,2301	0,0841
Error	0,0009	4	0,0002		

5.2.2.1 Avaliação do fator: tipo de óleo

Os óleos, líquidos a temperatura corpórea, utilizados foram: Miglyol e Óleo de Coco. Estes dois lipídeos líquidos foram escolhidos, pois muitos trabalhos têm empregado o Miglyol na produção de CLN (ZAMIRI et al., 2016; DOUNG et al., 2009;

BAHARI et al., 2016) e o Óleo de coco foi descrito como um dos mais comumente utilizados para o preparação destes sistemas (SUTARIYA et al., 2015; ÜNER et al., 2014).

As nanopartículas preparadas com Miglyol ou óleo de coco apresentaram diâmetro reduzido (menor que 173 nm), Pdl abaixo de 0,2 (Tabela 9) e perfil de distribuição de diâmetro monomodal (Figura 21).

Apesar do fator tipo de óleo ter influenciado de forma significativa ($p = 0,0319$, $p < 0,05$, Tabela 11) a variável resposta de índice de polidispersão, os valores de Pdl para as dispersões preparadas com Miglyol e com Óleo de coco foram próximos (Tabela 6). Desta forma, ambos os óleos podem ser utilizados para o preparo dos CLN. Entretanto, o óleo de coco possui em sua composição compostos fenólicos que apresentam propriedade antioxidante o que resulta na redução de radicais livres (DEBMANDAL et al., 2011; MARINA et al., 2009). Esta propriedade é interessante para o presente estudo, visto que células tumorais produzem muitos radicais livres como EROs que agem como carcinógenos efetivos podendo participar da iniciação, progressão e metástase das neoplasias (SABHARWAL et al., 2014). Diante disso, optou-se pelo óleo de coco para compor os carreadores deste trabalho.

É relevante mencionar que o óleo é adicionado ao carreador com intuito de deixá-lo com uma estrutura cristalina mais desorganizada. Estudos demonstraram que a introdução e o aumento da quantidade óleo diminuem a cristalinidade ou desorganizam a estrutura cristalina de CLN (KAWADKAR et al., 2013; ÜNER et al., 2014). Ademais, a desorganização na estrutura pode permitir ao carreador abrigar mais ativo e impedir a expulsão do mesmo durante o período de estocagem (MARCATO, 2009; TAMJIDI et al., 2013), visto que o fármaco se acomoda nas imperfeições da estrutura cristalina, entre as cadeias de lipídeo (WISSING and MÜLLER, 2003 and MÜLLER et al., 2007). Portanto, a adição de óleo permite obter um carreador mais eficiente no encapsulamento da quercetina e mais estável ao longo do tempo quando comparado ao escolhido no planejamento fatorial anterior. Por isso a importância deste segundo planejamento fatorial.

Figura 21- Perfil de distribuição de tamanho das partículas preparadas com o lipídeo SS, com 1% de Pluronic F68 com: Miglyol 810 (experimento 1, Tabela 9) (curva em vermelho) e com óleo de coco (experimento 2, Tabela 9) (curva em verde).

5.2.2.2 Avaliação do fator: tempo de sonicação

Os tempos de sonicação utilizados na preparação das partículas neste planejamento foram: 10 e 15 minutos. O tempo de sonicação é um fator que pode influenciar o diâmetro (SIDDIQUI et al., 2014) e o índice de polidispersão (Pdl) de nanopartículas. O aumento do tempo de sonicação tende a diminuir o diâmetro das partículas, todavia tempos mais altos de sonicação fornecem maior energia cinética ao sistema, o que pode levar a aglomerações e consequente, aumento do tamanho (KHATTAR et al., 2012). Desta forma, há um tempo ideal que deve ser avaliado no desenvolvimento de CLN. Os resultados da análise estatística de variância indicam que não houve alteração significativa de diâmetro e Pdl ($p > 0,05$ - Tabela 11) nos dois tempos avaliados, portanto, ambos seriam adequados para a preparação dos CLN. Além disso, não houve alteração no perfil de tamanho das partículas preparadas com 10 e 15 minutos (Figura 22). Porém, tempos maiores de sonicação levam a uma maior liberação de metal pela ponta do sonicador, o que contamina as dispersões de nanopartículas (WISSING et al., 2004). Desta forma, o tempo de sonicação de 10 minutos foi escolhido para a preparação dos demais CLN deste projeto.

Figura 22- Perfil de distribuição de tamanho das partículas preparadas com o lipídeo SS, com 1% de Pluronic F68 e com óleo de coco e pelo período de 10 minutos de sonicação (experimento 2, Tabela 9) (curva em verde) e 15 minutos de sonicação (experimento 4, Tabela 9) (curva em vermelho).

5.3 Avaliação da quantidade de quercetina encapsulada

Foi realizado um estudo da quantidade de quercetina a ser utilizada na preparação dos CLN com o intuito de encapsular a quantidade máxima do fármaco nos carreadores. A quantidade de QT adicionada nas preparações foi de 5, 8, 10 e 12 mg. As dispersões foram avaliadas quanto ao diâmetro, Pdl, potencial zeta e eficiência de encapsulamento e quanto sua homogeneidade no período de 15 dias.

As tabelas 12 e 13 mostram os resultados da variação da quantidade de QT. Na tabela 12 observa-se que para todas as concentrações de QT os valores de diâmetro, Pdl e potencial zeta não foram afetados significativamente pelo encapsulamento das diferentes quantidades de quercetina. Além disso, as eficiências de encapsulamento foram altas, independente da quantidade de QT adicionada, mostrando, desta forma, que o método é eficiente para encapsular QT nos CLN desenvolvidos.

Com relação à estabilidade macroscópica das dispersões (Tabela 13), apenas as CLN preparadas com 5 mg de QT apresentaram homogeneidade no período avaliado. As demais formulações apresentaram um precipitado amarelo que pode ser atribuído a quercetina não encapsulada ou liberada e ou a uma separação de fase. Desta forma estas formulações foram consideradas não homogêneas. Portanto, a quantidade máxima de QT que pode ser encapsulada nos CLN é de 5 mg.

Tabela 12- Valores de diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulamento (EE) de CLN preparados com diferentes quantidades de quercetina (QT).

Quantidade de QT (mg) no CLN	Diâmetro (nm)	Desvio padrão do diâmetro (nm)	Pdl	Desvio padrão de Pdl	Potencial zeta (mv)	Desvio padrão de pz (mv)	EE%
5	181,0	0,28	0,17	0,01	-7,7	4,2	98,4
8	231,6	0,83	0,17	0,03	-9,9	1,6	97,8
10	192,3	4,53	0,16	0,04	-15	1,41	99,6
12	190,3	6,72	0,18	0,01	-9,2	0,02	-----

Tabela 13- Aspecto macroscópico das dispersões de CLN preparadas com diferentes quantidades de quercetina (QT).

ASPECTO MACROSCÓPIO

Quantidade de QT (mg) no CLN	0 DIAS	7 DIAS	15 DIAS
5	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
8	Homogêneo	Não Homogêneo	Não Homogêneo
10	Homogêneo	Não Homogêneo	Não homogêneo
12	Não homogêneo	Não homogêneo	Não homogêneo

5.4 Funcionalização do Pluronic F68 com folato (PF68F)

Como descrito anteriormente, o folato é uma moléculas utilizadas para a funcionalização da superfície de nanoestruturas com o intuito de direcioná-las para o interior de tecidos tumorais via receptores de folato. A entrega sítio específica via receptores de folato é possível devido à expressão ou superexpressão destes receptores em células tumorais e à não expressão ou rara expressão em células normais. Aliado a isso, a interação folato-receptor resulta em uma resposta de endocitose mediada, promovendo, assim, a internalização das nanopartículas funcionalizadas, o que aumenta a entrega do fármaco no interior do tecido alvo (SAMADIAN et al., 2016; LI et al. 2015; NAKAMURA te al., 2014; PIKTEL et al, 2016).

O Pluronic F68 é o tensoativo escolhido para estabilização das dispersões dos carreadores lipídicos nanoestruturados preparados neste trabalho. Como o

estabilizante de dispersões de CLN se dispõe na superfície das partículas, a funcionalização do mesmo seria uma escolha ideal, visto que poderia promover uma exposição do folato favorável à interação do mesmo com receptores presentes nas superfícies de células tumorais.

A metodologia utilizada para a funcionalização do Pluronic se baseia na conjugação de grupamentos de ácidos carboxílicos presentes na molécula de ácido fólico com grupos hidroxila pertencentes no estabilizante. A reação de funcionalização está descrita na figura 23.

Figura 23- Reação de funcionalização do Pluronic F68 com folato. (A) Etapa de ativação do ácido fólico com 1,1' carbonildiimidazol. (B) Etapa de esterificação.

A reação de conjugação de Pluronic com folato foi confirmada pelos dados gerados pela espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensional de ^1H , em comparação com estudos relatados por Lin et al. (2009).

A estrutura de PF68F (Figura 24) foi identificada devido à presença do sinal em δ 1,1 ppm (A) característico do grupo metila atribuído ao PPO (polioxipropileno) do Pluronic; os sinais em δ 6,6 ppm (B) e δ 7,6 ppm (C) sinais característicos de um anel aromático di-substituído na posição para e do sinal em δ 8,5 ppm (D) característico do próton pteridínico atribuídos ao ácido fólico (Tabela 14).

Figura 24- Estrutura química de Pluronic F68 funcionalizado com ácido fólico (PL68F)

Tabela 14- Dados dos espectros de RMN de ^1H obtidos para o Pluronic funcionalizado com folato (PF68F) em DMSO- d_6 e dados da literatura

Sinais	$^1\text{H}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade	$^{13}\text{C}\delta(\text{ppm});$ multiplicidade
1	1,1 (duplete)	1,1
2	6,58 (duplete)	6,6
3	7,57 (duplete)	7,6
4	8,58 (simpleto)	8,5

*Dados da estrutura do PF68F em DMSO- d_6 , 500 MHz da análise realizada pelo autor.

**Dados da estrutura do PF68F em DMSO- d_6 , 500 MHz da análise realizada por Lin et al. (2009)

Aliado aos resultados da técnica de RMN a técnica de espectrofotometria também foi utilizada para a caracterização do produto da reação de funcionalização. Na figura 25 a linha em preto é relativa à análise do Pluronic F68 não funcionalizado e a linha em vermelho relativa à análise do produto da reação de conjugação. A banda intensa de absorção observada em 280 nm com ombro em 370 nm que aparece na amostra do produto pode ser atribuída aos anéis aromáticos presentes no ácido fólico. Este mesmo espectro foi observado em análises realizadas pela

técnica de espectrofotometria de Pluronic F127 funcionalizados com folato por Lin et al. (2009).

Figura 25- Espectro de absorção UV-vis de Pluronic não funcionalizado (linha preta) e funcionalizado (linha vermelha).

5.5 Caracterização físico-química dos CLN e CLN-F otimizados

5.5.1 Avaliação das propriedades física e estabilidade de CLN e CLN-F com e sem QT

5.5.1.1 Determinação de diâmetro e potencial zeta

A análise dos dois planejamentos experimentais resultou na escolha do carreador preparado com 1% de lipídeo SS, 1% de Pluronic F68, 0,20% de óleo de coco preparado com béquer de menor diâmetro e sonicado por 10 minutos. Este CLN foi utilizado para o encapsulamento de quercetina e foi submetido à caracterização físico-química.

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), utilizada na caracterização das nanopartículas, determina o diâmetro hidrodinâmico das partículas por meio da relação entre as flutuações de intensidades de luz espalhadas pelas partículas com o seu diâmetro através da relação de Stokes-Einstein, quando submetidas à incidência de um laser. As flutuações de luz são decorrentes do movimento browniano das partículas presentes nas dispersões coloidais e ao diâmetro das

nanopartículas, em que partículas menores se movimentam mais rapidamente que partículas maiores (MALVERN, 2016).

O potencial zeta foi determinado por espalhamento de luz eletroforético. Para tanto, as dispersões de nanopartículas são colocadas em uma célula com dois eletrodos e quando inserida no equipamento um campo elétrico é aplicado sobre ela o que resulta na mobilidade das partículas (mobilidade eletroforética) em direção ao o eletrodo de carga oposta a elas. A velocidade do movimento é proporcional à força do campo aplicada e de seu potencial zeta (MALVERN, 2016).

A tabela 15 mostra que o encapsulamento da quercetina, assim como a funcionalização das partículas não afetou as propriedades físico-químicas dos carreadores. Além disso, as partículas contendo quercetina apresentaram alta eficiência de encapsulamento (98%), o que mostra que o método de sonicação aliado à composição dos carreadores foi eficiente em encapsular quercetina nos CLN.

Tabela 15- Valores de diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ), e eficiência de encapsulamento (EE%) de CLN, CLN-QT e CLN-F-QT e seus desvios padrão (DP)

Partícula	Diâmetro (nm)	DP Diâmetro (nm)	Pdl	DP de Pdl	Potencial Zeta (Mv)	DP de PZ	EE %	DP EE %
NLC	176,5	2,3	0,124	0,02	-11,4	1,3	-----	
NLC-QT	183,6	2,5	0,145	0,02	-6,2	1,3	99,8	0,3
NLC-F	197,9	0,5	0,160	0,04	-17,5	3,2	-----	
NLC-F- QT	184,8	4,54	0,160	0,03	-11,8	3,2	98,1	-----

A estabilidade dos CLN vazios, CLN-QT e CLN-F-QT preparados foi avaliada pelo período de 330 dias. Durante este período os valores de diâmetro e Pdl destes carreadores apresentaram-se praticamente inalterados. A Figura 26 mostra que o diâmetro e o Pdl dos CLN vazios variaram entre 197 e 195,05 nm e entre 0,151 e 0,165, respectivamente, no período de 330 dias. Os resultados indicam, portanto, que as preparações de CLN são estáveis quando armazenada a 4° C. O mesmo comportamento foi notado para as CLN contendo QT que exibiram variação de tamanho entre 185 e 182,7 nm e Pdl entre 0,138 a 0,182 no mesmo período. A

Figura 26 mostra, ainda, que a funcionalização das partículas não afetou a estabilidade das partículas, visto que para o CLN-F-QT os valores de diâmetro oscilaram entre 182 e 190,4 nm e de Pdl entre 0,142 e 0,189 durante o período analisado. Além disso, as partículas apresentaram baixo índice de polidispersão durante o período avaliado, pois o Pdl manteve-se abaixo de 0,3. A alta estabilidade de um outro carreador lipídico contendo quercetina quando armazenados a 4°C também foi descrita por Sun et al. (2014).

Diferente do diâmetro e do Pdl, a carga superficial dos CLN, CLN-QT e CLN-F-QT oscilaram muito ao longo do tempo (Figura 27). Ademais, os valores encontrados para potencial zeta foram inferiores a -30 mV.

A carga superficial ou potencial zeta de uma partícula indica a magnitude de interações de repulsão e atração eletrostática entre as partículas de dispersões aquosas de CLN. Portanto, o potencial zeta pode ser considerado um parâmetro chave para prever a estabilidade de dispersões coloidais (THATIPAMULA et al., 2010). Dentro deste contexto, acredita-se que valores de carga superficial igual ou maior que 30 mV em módulo são necessários para promover estabilidade eletrostática de dispersões coloidais (FREITAS AND MÜLLER, 1999). No entanto, segundo Thatipamula et al. (THATIPAMULA et al., 2010) muitos estudos demonstram que a estabilidade de nanopartículas não depende somente de repulsões eletrostáticas quando se faz uso de estabilizantes estéricos. Estes estabilizantes também podem promover a formação de dispersões estáveis mesmo com potencial zeta menor que 30 mV em módulo. Por isso, a oscilação do potencial zeta observadas na figura 27, não é indicativo de instabilidade das partículas e não prejudicou a estabilidade das mesmas. A estabilidade das dispersões preparadas neste estudo é resultado das estabilizações eletroestática e estérica promovidas pelo Pluronic.

Figura 26- Valores de diâmetro e índice de polidispersão (Pdl) de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) vazios (barra preta, linha azul), carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) (barra branca, linha vermelha) e CLN funcionalizados com folato contendo quercetina (CLN-F-QT) (barra preta e linha roxa) em função do tempo.

Figura 27- Valores de potencial zeta de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) vazios, carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) e CLN funcionalizados com folato contendo quercetina (CLN-F-QT) em função do tempo.

5.5.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

Diferentemente da técnica de DLS, a análise de rastreamento de nanopartículas permite identificar e rastrear partículas individualmente e correlacionar o movimento browniano de cada partícula com seu diâmetro hidrodinâmico por meio da equação bidimensional de Stokes-Einstein (FILIPE et al., 2010). Entretanto, ambas as técnicas, DLS e NTA, apresentam alta precisão para o dimensionamento do tamanho de partículas de dispersões com distribuições de

tamanho relativamente estreitas (FILIPE et al., 2010), como as dispersões preparadas neste estudo. A Figura 28 mostra as distribuições de tamanho 3D para as partículas preparadas.

Os diâmetros médios mensurados por análise de rastreamento de nanopartículas foram semelhantes aos valores determinados por espalhamento de luz dinâmico (Tabela 16). Ademais os resultados sugerem que o encapsulamento da quercetina e a funcionalização das partículas não alterou o tamanho das mesmas. Essa técnica permitiu, ainda, a visualização das nanopartículas e seu movimento browniano por meio de vídeos, assim como a determinação da concentração de nanopartículas por mL de dispersão. As concentrações obtidas para CLN, CLN-QT, CLN-F e CLN-F-QT foram indicadas na tabela 16. Estas concentrações são importantes para determinar as concentrações de nanopartículas vazias que são usadas no tratamento das células nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

Tabela 16- Valores de diâmetro (nm) e concentração de partículas por mL (CLN/mL)

Partícula	Diâmetro médio (nm)	Desvio Padrão do Diâmetro (nm)	Concentração (CLN/mL)
CLN	194,1	3,5	$1,33 \times 10^{12}$
CLN-QT	174,0	1,2	$1,77 \times 10^{12}$
CLN-F	191,3	2,5	$1,89 \times 10^{11}$
CLN-F-QT	183,9	2,5	$3,04 \times 10^{11}$

Figura 28- Distribuição de tamanho de partículas em 3D por análise de rastreamento de nanopartículas. (A) Carreadores lipídicos nanoestruturados vazios (CLN), (B) carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT), (C) carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato (CLN-F), (D) carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato contendo quercetina (CLN-F-QT).

5.5.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica mostra que a maioria dos carreadores lipídicos nanoestruturados preparados neste estudo apresentam morfologia esférica (Figura 29 e 30) e diâmetro médio de 152 nm (DP: 7,4 nm). A morfologia esférica para os carreadores lipídicos caracterizados por AFM foi descrita em outros trabalhos (TARATULA et al., 2013; XIA et al., 2016; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2008). O diâmetro médio encontrado para as partículas analisadas por AFM é inferior aos valores de diâmetro determinados por DLS e NTA. Isso ocorre, pois as técnicas de DLS e NTA, baseadas na lei de Stokes-Einstein, determinam o diâmetro hidrodinâmico das partículas que compreende o diâmetro da partícula com sua capa de estabilização formada pela presença do tensoativo utilizado (MALVERN, 2016).

Figura 29- Morfologia 2D de carreadores lipídicos nanoestruturados por Microscopia de Força Atômica.

Figura 30- Morfologia 3D de carreadores lipídicos nanoestruturados por Microscopia de Força Atômica.

5.5.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O comportamento térmico de CLN (CLN preparado 1% de SS, 1% de Pluronic F68 e 0,2% de óleo de coco) com e sem QT e CLN-F (CLN funcionalizado com folato) com e sem QT, assim como QT livre, Pluronic F68 e lipídeo SS, foram avaliados por DSC. A técnica de DSC caracteriza as partículas quanto a sua

cristalinidade, característica relacionada com a eficiência de encapsulamento, com a velocidade de liberação do ativo pelo carreador durante o tempo de estocagem e com a sua estabilidade (SVILENOV et al., 2014; SOUTO et al., 2016). Muitos trabalhos têm empregado esta técnica para determinação da cristalinidade de nanoestruturas (NAIR et al., 2015; KAWADKAR et al., 2013; YAN et al., 2010).

A figura 31 mostra que o lipídeo SS apresenta um único pico endotérmico em 48,23° C e que todos os carreadores preparados apresentam comportamento térmico diferente do lipídeo SS. Nas curvas de aquecimento dos CLN e CLN-F com e sem QT (Figura 31) é possível observar que a fusão do lipídeo puro (primeiro pico) ocorre em aproximadamente 45° C. Esta redução na temperatura de fusão do lipídio ocorre devido ao reduzido tamanho destas nanopartículas, sua alta área superficial e pela presença de estabilizantes na dispersão. Kelvin verificou que pequenas partículas isoladas apresentam uma redução da temperatura de fusão em relação ao material puro. Este evento é conhecido como pré-fusão ou efeito Kelvin (MARCATO, 2009; SURESH et al., 2007; JESSER et al., 2004). O segundo pico dos termogramas (Figura 32) está relacionado à fusão do estabilizante Pluronic F68, em aproximadamente 50°C. O pico referente ao estabilizante aparece devido a sua alta concentração na dispersão (1%). Não foi observado o pico endotérmico da QT (Figura 32), o que sugere que a mesma está molecularmente dispersa na matriz do CLN (Sun et al., 2014).

Figura 31- Termogramas de Pluronic F68, Lipídeo de ésteres cetílicos (SS) e quercetina (QT).

Figura 32- Termogramas de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) vazio (linha preta), carreadores lipídicos nanoestruturados com quercetina (CLN-QT) (linha azul), carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato (CLN-F) (linha vermelha) e carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato com quercetina (CLN-FQT) (linha verde).

Quanto maior a organização do retículo cristalino de um material, maior será a energia necessária para superar as forças de coesão da estrutura e, portanto, maior será a entalpia de fusão (MARCATO, 2009). Além disso, o comportamento de cristalização das partículas pode ser determinante na expulsão ou não do ativo durante o tempo de estocagem (TAMJIDI et al., 2013). No período de estocagem o lipídeo que compõe as nanopartículas pode sofrer uma transformação em sua estrutura cristalina, caracterizada pela transição da forma cristalina α (menos organizada) para a forma cristalina β (mais organizada) (ÜNER et al., 2014). Esta mudança ocorre, pois a forma β é energeticamente mais estável. Com o tempo, o aumento da transição para a forma β , resulta na formação de uma estrutura mais cristalina e, consequentemente, ocorre à expulsão do ativo (ATTAMA, 2008; YUAN, 2007; MULLER et al., 2000). Os valores baixos de entalpia (ΔH) e índice de recristalização (IR) dos CLN preparados (Tabela 17) demonstram o caráter pouco cristalino das partículas preparadas pela mistura de ésteres cetílicos acrescidas de óleo. Partículas com baixo IR tendem a encapsular uma maior quantidade de ativo, que se acomodam nos defeitos de sua estrutura cristalina ou nos espaços entre as cadeias lipídicas do lipídeo que a compõe. Desta forma, o baixo IR dos CLN justificam a alta eficiência de encapsulamento que, neste estudo, variou de 98,1 a 98,4% para todas as partículas preparadas.

A figura 32 mostra que a funcionalização das partículas com folato não alterou o perfil das curvas de aquecimento dos carreadores lipídicos. Além disso, a tabela 17 mostra que a cristalinidade destas partículas funcionalizadas (CLN-F) não foi afetada de forma significativa pela funcionalização, pois o IR dos CLN não funcionalizados (CLN) foram próximo ao valor do IR dos CLN funcionalizados (CLN-F) (IR~ 27).

Tabela 17- Valores de entalpia, ponto de fusão e índice de recristalização (IR) do lipídeo ésteres cetílicos (SS), CLN preparadas com 1% de SS, 1% de Pluronic F68 e 0,25% de óleo de coco) com e sem QT e CLN-F (CLN funcionalizado com folato) com e sem quercetina (QT).

Material	Entalpia (J/g)	Ponto de fusão (°C)	IR (%)
SS	156,329	48,23	100
CLN	43,287	44,64	28
CLN-QT	39,040	44,29	25
CLN-F	42,082	44,34	27
CLN-F-QT	46,851	44,44	30

5.6 Ensaio do perfil de liberação *in vitro*

5.6.1 Determinação do coeficiente de solubilidade de quercetina em meio receptor de ensaio de liberação *in vitro*.

A solubilidade máxima de quercetina em meio receptor foi determinada com o intuito de estabelecer as condições *sink* do ensaio de liberação *in vitro* de quercetina em células de difusão do tipo Franz. Para manter as condições *sink* durante o ensaio a concentração do fármaco liberado no compartimento receptor não deve exceder 10% da concentração de saturação determinada (AULTON, 2005), pois a saturação do meio receptor poderia cessar a difusão do fármaco pela membrana, prejudicando, assim, o delineamento do perfil de liberação da forma farmacêutica utilizada.

A princípio o meio receptor foi composto de tampão fofato pH 7,4 puro, no entanto, como a concentração de quercetina não foi quantificada e nem detectada por CLAE ([QT]<0,01), foi necessária a adição de um tensoativo para aumentar a solubilidade da QT. Este resultado era esperado, pois a quercetina apresenta baixa solubilidade em água, sendo ela de 0,00215 µg/mL a 25,6°C (SRINIVAS et al., 2010). A tabela 18 mostra as concentrações de saturação encontradas para as

soluções de quercetina nos meios receptores: tampão fosfato pH 7,4 puro, tampão fosfato pH 7,4 acrescido de 0,5% de Tween 80, tampão fosfato pH 7,4 acrescido de 2% de Tween 80 e tampão fosfato pH 7,4 acrescido de 5% de Tween 80. Visando utilizar o meio com menor quantidade de tensoativo, porém que aumentasse a solubilidade de quercetina em relação ao tampão puro, o meio escolhido foi o composto por tampão fosfato pH 7,4, acrescido de 0,5% de Tween 80. A concentração de quercetina nesta amostra foi de 110,7 µg/mL, portanto, 6,6% da quantidade de fármaco adicionado foi solubilizado no meio de dissolução no período de 24 h.

Tabela 18- Solubilidade da quercetina (QT) em tampão fosfato (pH 7,4) acrescido ou não do tensoativo Tween 80.

Tampão	Concentração de Tween 80 (% m/v)	Solubilidade em 24h (µg/mL)	% QT solubilizada *
Tampão fosfato pH 7,4 puro	0%	<0,01 (Não quantificável)	0
Tampão fosfato pH 7,4	0,5%	110,7	6,6
Tampão fosfato pH 7,4	2%	511,2	30,7
Tampão fosfato pH 7,4	5%	889,4	53,4

*Porcentagem de QT solubilizada em relação a quantidade total adicionada.

5.6.2 Ensaio de perfil de liberação *in vitro* em células de difusão do tipo Franz de quercetina por carreadores lipídicos nanoestruturados

O perfil de liberação da quercetina pelos carreadores lipídicos nanoestruturados foi determinado através do estudo realizados em células de difusão de Franz, utilizando modo automatizado de coleta e meio receptor composto de tampão fosfato pH 7,4 acrescido de 0,5% de Tween 80. A quantidade de quercetina foi mensurada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência descrito na seção 4.11.1.

A Figura 33 mostra que os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina liberaram aproximadamente 30% do fármaco de forma sustentada em condições *sink* durante o período de 72h. As primeiras 10 horas de ensaio foram

caracterizadas pelo efeito *burst* de liberação do fármaco adsorvido na superfície dos CLN e não encapsulado (Figura 33).

Para avaliar o mecanismo de liberação da QT pelos CLNs, diferentes modelos matemáticos foram utilizados. O modelo que apresentou maior coeficiente de correlação foi o modelo de Weibull ($R^2=0,7002$) (Tabela 19). Neste modelo, valores de $b < 1$ caracterizam mecanismo de difusão fickiana. Valores de b no intervalo de 0,75 e 1 estão relacionados com a difusão fickiana aliada ao mecanismo de erosão e/ou intumescimento. Enquanto que para valores de b acima de 1, tem-se mecanismos mais complexos caracterizados por muitos mecanismos associados.

O valor de b para o perfil de liberação de QT pelos carreadores em estudo foi de 0,4 ($b < 1$). Portanto, trata-se de um mecanismo de liberação por difusão fickiana que segue o modelo de weibul, com distribuição parabólica. Para a distribuição parabólica o coeficiente de correlação foi de 0,95719.

Tabela 19- Coeficientes de correlação (R^2) calculados pelos modelos matemáticos cinéticos de Ordem zero, Primeira Ordem, Korsmeyer- Peppas, Higuchi e Hixson-Crowell.

Partícula	Ordem Zero	Primeira Ordem	Korsmeyer- Pepas	Weibull	Higuchi	Hixson-Crowell
CLN-QT	0,5066	0,4205	0,557	0,702	0,6452	0,5395

Figura 33- Perfil de liberação de quecetina (QT) a partir de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).

5.7 Ensaio de captura do corante vermelho neutro (análise da integridade lisossomal)

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* da QT livre e encapsulada em carreadores funcionalizados ou não foi realizada por ensaio de captura de vermelho neutro. Apesar de não existirem trabalhos com avaliação da viabilidade com este método em células de câncer de bexiga da linhagem RT4, este ensaio foi escolhido, pois é mais sensível e mais barato em relação aos que utilizam sais de tetrazólio, enzimas e proteína. Além disso, o ensaio de captura de vermelho neutro proporciona estimativa quantitativa do número de células viáveis.

A absorção do vermelho neutro depende da habilidade da célula em manter os gradientes de pH através da produção de ATP. Em pH fisiológico o corante fica com carga igual a zero o que lhe permite permear membranas, dentro dos lisossomos o existe um gradiente de pH que mantem o pH inferior ao do citoplasma o que faz com que o corante fique fracamente catiônico e se ligue a tensoativos aniônicos ou grupos fosfatos presentes na matriz lisossomal (REPETTO et al., 2008).

O ensaio de vermelho neutro foi conduzido segundo o protocolo descrito na seção 4.12.2 da metodologia.

A Figura 34 mostra a viabilidade das células RT4 quando tratadas com diferentes concentrações de carreadores vazios funcionalizados ou não. Os CLN vazios apresentaram baixa citotoxicidade, sendo que a citotoxicidade para a maior concentração analisada ($6,65 \times 10^{12}$ CLN/mL) foi de 8,5%. Enquanto para os CLN-F a viabilidade para a maior concentração de partículas analisada ($9,45 \times 10^{11}$ CLN-F/mL) foi de 60% (Figura 34B).

A Figura 35 mostra o perfil de citotoxicidade de quercetina (QT) livre e encapsulada em carreadores não funcionalizados (CLN-QT) e funcionalizados (CLN-F-QT) para a faixa de concentração de 20-113 μ g/mL. A quercetina livre diminui a viabilidade das células RT4 em até 91% ([QT]= 113 μ g/ mL) mostrando seu potencial citotóxico para concentração de célula analisada. Quando encapsulada em carreadores não funcionalizados foi citotóxica em até 66% ([QT]= 113 μ g/ mL). Enquanto encapsulada em CLN-F apresentou citotoxicidade de até 70% ([QT]= 113 μ g/ mL). A QT livre apresentou IC_{50} de 55,4 μ g/mL, enquanto o IC_{50} para CLN-QT foi 94,9 μ g/mL e para CLN-F-QT foi de 83,4 μ g/mL. A quercetina livre apresenta, portanto, maior citotoxicidade que a quercetina encapsulada. Este resultado se deve,

provavelmente, à liberação lenta da quercetina pelos carreadores. Dessa forma a quercetina encapsulada não se torna totalmente disponível para a ação nas células no período de tratamento analisado (24 h). Resultados similares foram obtidos por Huerta et al. (2015) no estudo da utilização de nimesulida encapsulado em nanopartículas poliméricas revestidas com quitosana como adjuvante no tratamento de câncer de próstata. Neste estudo foi verificado que o fármaco livre foi mais efetivo em ensaios *in vitro* de citotoxicidade em relação ao fármaco encapsulado.

O IC₅₀ para CLN-F-QT (83,7 µg/mL) foi inferior ao IC₅₀ para o CLN-QT (90,3 µg/mL), provavelmente devido ao aumento da internalização causado pela funcionalização das partículas. O aumento da internalização é caracterizado pela resposta de endocitose mediada causada pela interação entre os receptores de ácido fólico presente na superfície das células com o folato presente na superfície dos carreadores. Ademais, esta entrega do fármaco é dita sítio-específica, pois os receptores de folato estão superexpressos em células tumorais e são pouco expressos ou não expressos em células normais (SAMADIAN et al., 2016, PIKTEL et al, 2016). Ademais, o CLN-F aumentou em até 25% da citotoxicidade da quercetina na concentração de 113 µg/ mL quando comparada com a quercetina encapsulada no CLN não funcionalizado.

Apesar da quercetina encapsulada em CLN-F apresentar citotoxicidade inferior a quercetina encapsulada, o sistema de entrega de fármacos desenvolvido, além de apresentar-se mais eficiente que o sistema não funcionalizado poderia apresentar vantagens em relação a administração do fármaco livre. Dentre estas vantagens está a possibilidade de entrega seletiva do fármaco, proteger a quercetina da degradação, aumentar a sua fotoestabilidade, aumentar a sua permeação pelo urotélio e aumentar a internalização do fármaco pelo tecido tumoral. Esta última vantagem foi descrita acima para as células RT4.

Figura 34- Viabilidade de células de câncer de bexiga superficial (RT4) tratadas carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (A) não funcionalizados e funcionalizados (CLN-F) (B) por 24h. Os experimentos foram conduzidos em triplicata

Figura 35- Viabilidade de células de câncer de bexiga superficial (RT4) tratadas com quercetina (QT) livre e quercetina encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) não funcionalizados e funcionalizados (CLN-F) por 24h. Os experimentos foram conduzidos em triplicata. ***p < 0,001 para CLN-F-QT em relação a CLN-QT e QT em todas as concentrações estudadas, ***p < 0,001 para CLN- QT em relação a QT e QT e **p < 0,05 para CLN-QT em relação a QT.

5.8 Avaliação da atividade antioxidante da quercetina livre e encapsulada *in vitro* pelo método de auto-oxidação do pirogallol e sequestro de radicais superóxidos

O pirogallol sofre auto-oxidação em meio levemente alcalino e os produtos desta oxidação, radicais superóxidos, apresentam absorção na região do comprimento de onda de 325 nm (CHEN-YU et al., 2012) (Figura 35). Na presença de compostos antioxidantes a reação de auto-oxidação diminui ou cessa. A vitamina

C é um poderoso agente antioxidante, devido a isso, foi usada como controle positivo neste método. Chen-Yu et al. (2012) usou como controle positivo uma massa de 200 µg de vitamina C, no entanto, esta quantidade não foi suficiente para inibir 100% da reação de auto-oxidação do pirogalol em nossos testes. Devido a isso, estudou-se a quantidade mínima de Vitamina C necessária para inibir 100% da reação do pirogalol (25 mM) e a quantidade obtida foi de 640 µg. A figura 36 mostra a reação de auto-oxidação do pirogalol. Conforme os radicais Purpurogalloquinose vão sendo formados a absorvância da amostra analisada por espectrofotometria vai crescendo. O aumento da absorvância com o tempo é descrito na figura 37 (Controle negativo ou cinética de auto-oxidação do pirogalol). Quando a Vitamina C é adicionada no meio reacional, sequestra os radicais que vão sendo formados ao longo do tempo, inibindo em 100% a reação.

Figura 36- Reação de auto-oxidação do pirogalol

Figura 37- Cinética da reação de auto-oxidação do Pirogalol (curva em preto) e da misturada com Vitamina C (curva em azul).

A quercetina livre e encapsulada foi avaliada quanto a sua atividade antioxidante baseada no sequestro dos produtos da auto-oxidação do pirogalol quando colocada no meio reacional com mesma massa que a Vitamina C. A Figura 37 indica que 640 μg de quercetina livre e encapsulada em nanocarreadores, funcionalizados ou não, apresentaram alto potencial antioxidante, chegando a inibir 100% da reação de oxidação do pirogalol. Portanto, não houve diferença significativa no potencial antioxidante entre a Vitamina C e as amostras de quercetina encapsulada ou não. Entretanto, a figura 38 sugere que mesmo apresentando absorvância muito próxima a zero, a vitamina C apresentou atividade antioxidante levemente inferior a quercetina livre e encapsulada nos últimos minutos da cinética. Isso se deve, provavelmente, a maior quantidade de grupos hidroxila e ou doadores de elétrons na molécula de quercetina em relação à molécula de vitamina C. Catherine et al. (1997) mostraram que os polifenóis podem apresentar atividade antioxidante superior a Vitamina C e a Vitamina E e que a quercetina apresenta atividade antioxidante quatro vezes maior que a vitamina C quando avaliadas em ensaio de TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox). No entanto uma diferença significativa não pode ser observada, pois a Vitamina C foi usada como controle positivo.

Heo e Lee (2004) descreveram que a quercetina é um flavonóide que apresenta atividades antioxidante e anticarcinogênica muito superior a vitamina C. Além disso, demonstraram que a quercetina apresentou efeito protetor superior quando usada no tratamento de células neurais submetidas ao estresse oxidativo com maior redução de danos e diminuição de radicais livres quando comparada com a vitamina C. Além disso, a Figura 38 mostra que mesmo quando se adiciona metade da quantidade de QT usada no protocolo do ensaio, 320 μg de quercetina, tem-se uma alta inibição da reação de auto-oxidação do pirogalol, chegando a 67,6% (DP: 0,57) após 20 minutos.

Figura 38- Cinética da reação de auto-oxidação do Pirogalol do controle positivo com Vitamina C (curva em vermelho), da quercetina livre à 640 μg (curva em roxo), da quercetina livre à 320 μg (curva em cinza), quercetina encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN-Q) (curva azul) e quercetina encapsulada em carreadores lipídicos funcionalizados com folato (CLN-F-Q) (curva em magenta).

É relevante mencionar que a propriedade antioxidante de compostos utilizados na terapia do câncer é interessante para a captura de EROs e inibição da progressão do tumor, visto que as mesmas podem ativar vias de transdução de sinais que regulam eventos como: iniciação, inflamação, invasão, migração e apoptose (SABHARWAL et al., 2014; WU, 2006) em tecidos tumorais. Desta forma, os resultados de atividade antioxidante da quercetina livre e encapsulada reafirmam, portanto, o potencial biológico da quercetina para a futura terapia do câncer de bexiga e indicam que o encapsulamento da QT não afetou sua atividade.

6 Conclusão

O planejamento fatorial foi uma ferramenta interessante para a avaliação da influência de fatores no processo de produção das nanopartículas e nas propriedades físicas das mesmas e permitiu a escolha de carreadores estáveis e com composição interessante para o encapsulamento da quercetina e para futura terapia do câncer de bexiga.

Os carreadores preparados neste estudo, pelo método de emulsão e sonicação, apresentaram tamanho inferior a 200 nm, baixo índice de polidispersão ($<0,3$) e potencial zeta negativo e foram estáveis pelo período de 330 dias quando armazenados a 4°C. Ademais apresentaram morfologia esférica e perfil de liberação sustentada da QT.

Os baixos valores de índice de recristalização (IR) das formulações favoreceram alta eficiência de encapsulamento da quercetina que variou entre 98,1 e 98,4% para os carreadores preparados.

A quercetina livre e encapsulada apresentou potencial citotóxico reduzindo a viabilidade das células de câncer de bexiga RT4. Os CLN-FQT apresentaram IC_{50} menor que o IC_{50} dos CLN-QT, o que pode ser explicado pelo aumento da internalização causada pela funcionalização das partículas com folato. Estes dados aliados aos dados dos espectros de RMN de PF68F sugerem o sucesso da funcionalização das partículas. Além disso, os carreadores contendo quercetina apresentaram alta atividade antioxidante que é uma propriedade interessante para a terapia do câncer.

Portanto, o sistema de entrega de quercetina (CLN-F-QT) desenvolvido tem potencial para futuro tratamento do câncer de bexiga.

7 Referências Bibliográficas

ADİYAT K.T., KATKOORI D., SOLOWA M.S. Intravesical Chemotherapy. Em: Bladder Tumors: Molecular Aspect and Clinical Management. Editores: Lokeshwar, V.B., Merseburger, A.S., Hautmann, S.H., Editora: Human Press, p. 253- 270, 2010.

ALI, H. S. M; YORK, P.; ALI, A. M. A.; BLAGDENA, N. Hydrocortisone nanosuspensions for ophthalmic delivery: A comparative study between microfluidic nanoprecipitation and wet milling. *J. Control. Release*; v. 149, p. 175–181, 2011.

ALRAWAIQ, N.S.; ABDULLAH, A. A review of flavonoid quercetin: metabolism: bioactivity and antioxidant properties, *Int.J. PharmTech Res.* v. 6, p. 933– 941, 2014.

ANDREAS, B.O.; BRANDAU, S. Immune mechanisms in bacillus Calmette Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol.*; v.170, p.964–969, 2003.

ANG, L.F.; YAM, M.F.; FUNG, Y.T.; KIANG, P.K.; DARWIN Y. HPLC method for simultaneous quantitative detection of quercetin and curcuminoids in traditional chinese medicines. *J. Pharmacopuncture.*; v. 17, p. 36-49, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Bladder Cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/index>> . Acesso em: 25 de out. 2016.

ATTAMA, A. A; MOMOH, M. A.; BUILDERS, P. F. Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development. **Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems**, p. 107–140, 2012.

AZUMA, K.; IPPOUSHI, K.; ITO, H.; HIGASHIO, H.; TERAOKA, J. Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.1706–1712, 2002.

BABJUK, M. European Association of Urology. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. **European Association of Urology**, p.639–53, 2013.

BABJUK, M. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. **European Association of Urology**, p.1-45, 2016.

BAHARI, L. A. S.; HAMISHEHKAR, H. The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers; A comparative literature

review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 2, p. 143–151, 2016.

BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. Nanocosmetics and Nanomedicines; New approaches for Skin Care. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2011.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays. **J. Tissue Cult. Meth.**, v. 9, p. 7–9.

BROWN-BORG, H. M.; BODE, A. M.; BARTKE, A. Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone Levels: Potencial relationship in the aging process. **Endocrine.**, v.11, p.41-48, 1999.

CHEN-YU, G.; CHUN-FEN, Y.; QI-LU, L. Development of a Quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery. **Int. J. Pharm.**; v. 430, p. 292-298, 2012.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–133, 2001.

DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (Cocos nucifera L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. **Asian Pac. J. Trop. Med.**; v. 4, p. 241-247, 2011.

DENG, X.H.; SONG, H.Y.; ZHOU, Y.F.; YUAN, G.Y.; ZENG, F.J. Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin in vitro. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 6, p. 1155-1158, 2013.

DIAS, Q.; NUNES, I. DA S.; GARCIA, V.P.; FAVARO, W.J. Potential therapeutic strategies for non - muscle invasive bladder cancer based on association of intravesical immunotherapy with P-MAPA and systemic administration of cisplatin and doxorubicin. **Int. Braz. J. Urol.** v. 42, n. 5, p. 942-954.

DURÁN, N.; GUTERRES, S.S.; ALVES, O.L. Nanotoxicology; Materials, Methodologies, and Assessments. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. Ed. 2013.

EBLIN, K. E.; HAU, A. M.; JENSEN, T. J. The role of reactive oxygen species in arsenite and monomethylarsonous acidinduced signal transduction in human bladder cells: acute studies. **Toxicology**, v. 250, p.47-54, 2008.

FILIPPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein

aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, 2010.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLNTM) and crystallinity of the lipid phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 47, n. 2, p. 125–132, 1999.

GAMBHIRE, M.; BHALEKAR, M.; GAMBHIRE, V. Statistical optimization of dithranol-loaded solid lipid nanoparticles using factorial design. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 503–511, 2011.

GAO, W.; XIANG, B.; MENG, T.T.; LIU, F.; QI, X.R. Chemotherapeutic drug delivery to cancer cells using a combination of folate targeting and tumor microenvironment-sensitive polypeptides. **Biomaterials**, v. 34, n. 16, p. 4137–49, 2013.

GIBELLINI, L.; PINTI, M.; NASI, M.; MONTAGNA, J.P.; BIASI, S.D.; ROAT, E.; BERTONCELLI, L.; COOPER, E.L. & COSSARIZZA, A. Quercetin and Cancer Chemoprevention. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2011.

GOPPERT, T.M.; MÜLLER, R.H. Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns. **J. Drug Target.**, v. 13, p. 179–187, 2005.

GUHASARKAR, S.; BANERJEE, R. Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 147–159, 2010.

GUPTA, S.C.; TYAGI, A.K.; Deshmukh-Taskar, P.; Hinojosa, M.; Prasad, S.; Aggarwal, B.B. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. **Arch. Biochem. Biophys.**, 2014, 559, 91-99.

GHAZNAVI, H.; SOHEILI, Z.; SAMIEI, S., SOLTANPOUR, M.S. Association study of methylenetetrahydro folate reductase C677T mutation with cerebral venous thrombosis in an Iranian population. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 26, n. 8, p. 869–873, 2015.

HARIVARDHAN REDDY, L.; SHARMA, R.K.; CHUTTANI, K., MISHRA, A.K.; MURTHY, R.S. Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of topoisomerase II inhibitor loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice. **J. Control. Release**, v. 105, p. 185–198, 2005.

HEO, H.J.; LEE, C.Y. Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 25, p. 7514–7517, 2004.

HSU, C. C.; CHUANG, Y. C.; CHANCELLOR, M. B. Intravesical drug delivery for dysfunctional bladder. **International Journal of Urology**, v. 20, n. 6, p. 552–562, 2013.

HUERTA, C.; ABERTURAS, M. D. R.; MOLPECERES, J. Nimesulide-loaded nanoparticles for the coadjuvant treatment of prostate cancer. **International journal of pharmaceutics**, v. 493, n. 1, p. 152–160, 2015.

INTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ DE ALENCAR. Câncer de bexiga. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/bexiga>>. Acesso em 25 de out. de 2016.

ISLAN, G.A.; TORNELLO, P.C.; ABRAHAM, G.A.; DURAN, N.; CASTRO, G.R. Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143 p. 168–176, 2016.

JACKSON, L.W.; SCHISTERMAN, E.F.; DEY-RAO, R.; BROWNE, R.; ARMSTRONG, D. Oxidative stress and endometriosis. *Human Reproduction* (Oxford, England), v. 20, n. 7, p. 2014-2020, 2005.

JESSER, W. A.; SHNECK, R. Z.; GILE, W. W. Solid-liquid equilibria in nanoparticles of Pb-Bi alloys. **Phys. Rev.**; B 69, 144121-1-14121-13, 2004.

KAWADKAR, J.; PATHAK, A.; KISHORE, R.; CHAUHAN, M.K. Formulation, characterization and in vitro-in vivo evaluation of flurbiprofen-loaded nanostructured lipid carriers for transdermal delivery. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 39, n. 4, p. 569–78, 2013.

KIM, E.; GIESE, A.; DEPPERT, W. Wild-type p53 in cancer cells: when a guardian turns into a blackguard. **Biochem. Pharm.**, v. 77, p. 11-20, 2009.

KIM, Y.; KIM, W.-J.; CHA, E.-J. Quercetin-induced Growth Inhibition in Human Bladder Cancer Cells Is Associated with an Increase in Ca-activated K Channels.

The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology, v. 15, n. 5, p. 279–83, 2011.

KUO, P.C. ; LIU, H. F.; CHAO, J. I. Survivin and p53 Modulate Quercetin-induced Cell Growth Inhibition and Apoptosis in Human Lung Carcinoma Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 53, p. 55875–55885, 2004.

LI, W.; LIU, Z.; LI, C.; LI, N.; FANG, L.; CHANG, J.; TAN, J. Radionuclide therapy using ¹³¹I-labeled anti-epidermal growth factor Receptor-targeted nanoparticles suppresses cancer cell growth caused by EGFR overexpression. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 42, n.3, p.619–632, 2015.

LIN, J. J.; CHEN, J. S., HUANG, S. J.; KO, J. H.; WANG, Y. M.; CHEN, T. L.; WANG, L. F. Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. **Biomaterials**, v. 30, n. 28, p. 5114–5124, 2009.

MA, L; FEUGANG, J. M.; KONARSKI P.; WANG , J.; LU, J; FU, S.; MA, B.; TIAN, B.; ZOU, C.; WANG, Z. Growth inhibitory effects of quercetin on bladder cancer cell. **Frontiers in Bioscience**, v.11, p. 2275-2285, 2006.

MAIANI S., HODGSON H. L., KROL E. S. The UVA and aqueous stability of flavonoids is dependent on B-ring substitution. **J. Agricultural Food Chem.** v. 60, p. 6966-6976, 2012.

MALVERN STRUMENTS. Disponível em:
<<http://www.malvern.com/en/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis/>>
Acessado em 19 de agost. 2016.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica De Farmácia**, v. 6, p. 1-37, 2009.

MARINA, A.M.; MAN, Y.B.; NAZIMAH, S. A.; AMIN, I.; Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil Int. **J. Food Sci. Nutr.**, v. 60, p. 114-123, 2009.
MASTER, A. M.; SEN GUPTA, A. EGF receptor-targeted nanocarriers for enhanced cancer treatment. **Nanomedicine**, v. 7, p. 1895-1906, 2012.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 10, p. 412–420, 2000.

MORALES, A.; EIDINGER, D.; BRUCE, A. W. Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of adenocarcinoma of the kidney. **J Urol.**, v.115, p.377-380, 1976.

MUGABE, C.; RAVEN, P. A.; FAZLI, L.; BAKER, J. H. E.; JACKSON, J. K.; LIGGINS, R. T.; SO, A. I.; GLEAVE, M. E; BROOKS, D. E.; BURT, H. M. Tissue uptake of docetaxel loaded hydrophobically derivatized hyperbranched polyglycerols and their effects on the morphology of the bladder urothelium. **Biomaterials**, v. 33, p. 692-703, 2012.

MULLER, R.H.; RUNGER,S.A.;THUNEMANN,A.F.;MEHNERT,W.,SOUTO,E.B. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 2007.

MURALIDHARAN, R.; BABU, A.; AMREDDY, N.; BASALINGAPPA, K.; MEHTA, M.; CHEN, A.; ZHAO, Y.D.; KOMPELLA, U.B.; MUNSHI, A.; RAMESH, R. Folate receptor-targeted nanoparticle delivery of HuR-RNAi suppresses lung cancer cell proliferation and migration. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 47, 2016.

NAIR, H. A. AND SONI, D. M. Optimization of formulation parameters for preparation of docetaxel loaded nanostructured lipid carriers. **IJPSR**, v. 6, n.7 p. 2846-2857, 2015.

NAKAMURA, T.; KAWANO, K.; SHIRAISHI, K.; YOKOYAMA, M.; MAITANI, Y. Folate-targeted gadolinium-lipid-based nanoparticles as a bimodal contrast agent for tumor fluorescent and magnetic resonance imaging. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 37, n. 4, p. 521–7, 2014.

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. **Adv. Pharm. Bull.**, v. 5, n. 3, p. 305-13, 2015.

NETO, B.; DE SCARMINIO, B.; BRUNS, I. S.; EDWARD, R. Como Fazer Experimentos. 4a Edição. Editora Bookman Companhia Ed.2010.

NISHIMURO, H.; OHNISHI, H.; SATO, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; MATSUNAGA, I.; NAITO, S.; IPPOUSHI, K.; OIKE, H.; NAGATA, T.; AKASAKA, H.; SAITOH, S.; SHIMAMOTO, K.; KOBORI, M. Estimated daily intake and seasonal food sources of quercetin in Japan. **Nutrients**, v. 7, p. 2345–2358, 2015.

ORŠOLIĆ, N.; KARAČ, I.; SIROVINA, D.; KUKOLJ, M.; KUNŠTIĆ, M.; GAJSKI,

G.; GARAJ-VRHOVAC, V.; ŠTAJCAR, D. Chemotherapeutic potential of quercetin on human bladder cancer cells. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 51, n. 9, p. 776–781, 2016.

PIKTEL, E.; NIEMIROWICZ, K.; WĄTEK, M.; WOLLNY, T.; DEPTUŁA P.; BUCKI, R. Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. **Journal of nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 39, 2016.

POOK, S. H.; ESUVARANATHAN, K.; MAHENDRAN, R. N-acetylcysteine augments the cellular redox changes and cytotoxic activity of internalized Mycobacterium bovis in human bladder cancer cells. **J Urol.**; v.168, p.780–785, 2002.

Re 899 Da Anvisa 2003, [Http://Portal.Anvisa.Gov.Br/](http://Portal.Anvisa.Gov.Br/). Acesso Em 20 De Dezembro De 2015

REN, M.X.; DENG, X.H.; AI, F.; YUAN, G.Y.; SONG, H.Y. Effect of quercetin on the proliferation of the human ovarian cancer cell line SKOV-3 in vitro. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 10, n. 2, p. 579–583, 2015.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–31, 2008.

RIDOLFI, D.M.; MARCATO, P.D.; JUSTO, G.Z.; CORDI, L.; MACHADO, D.; DURÁN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 36–40, 2012.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Elsevier Science**. v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

ROCKENBACH, L.; BAVARESCO, L.; FERNANDES, F. P.; CAPPELLARI, A.R.; BARRIOS, C.H.; BUENO, M. F.; OLIVEIRA, B. A. M. Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. **Urol. Oncol.**, v. 3, p.1204–12, 2013.

SABHARWAL, S. S.; SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? **HHS Public Access**, v. 14, n. 11, p. 709–721, 2015.
SAK, K. Site-Specific Anticancer Effects of Dietary Flavonoid Quercetin. **Nutrition and cancer**, v. 66, n. January 2014, p. 37–41, 2013.

SAMADIAN, H.; HOSSEINI-NAMI, S.; KAMRAVA, S.K.; GHAZNAVI, H.; SHAKERI-ZADEH, A. Folate-conjugated gold nanoparticle as a new nanoplatform for targeted cancer therapy. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 11, p. 1–13, 2016.

SCHAMHART, D.H.; BOER, E.C.; REIJKE, T.M. Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use. **Eur Urol.**, v.37, p.16, 2000.

SCHWARZ, J. C., WEIXELBAUM, A., PAGITSCH, E. Nanocarriers for dermal drug delivery: Influence of preparation method, carrier type and rheological properties. **Int. J. Pharm.**, v. 437, p. 83–88, 2012.

SIDDIQUI, A.; ALAYOUBI, A.; EL-MALAH, Y.; NAZZAL, S. Modeling the effect of sonication parameters on size and dispersion temperature of solid lipid nanoparticles (SLNs) by response surface methodology (RSM). **Pharm Dev Technol.**, v. 19, p. 342–346, 2014.

SEN, C. K. Oxygen toxicity and antioxidants: state of the art". **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, v. 39, p. 177–196, 1995.

SHAH, M.; PATHAK, K. Development and statistical optimization of solid lipid nanoparticles of simvastatin by using 2(3) full-factorial design. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 489–496, 2010.

SHIBUYA, M.; CLAEISSON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Exp. Cell Res.**, v.312, p.549–560, 2006.

SHIMADA, K.; FUJII, T.; ANAI, S.; FUJIMOTO, K.; KONISHI, N. ROS generation via NOX4 and its utility in the cytological diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder. **BMC Urol.**, v.11, p.22, 2011.

SOUTO, E. B.; WISSING, S.A.; BARBOSAB, C.M.; MÜLLER, R.H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 71–77, 2004.

SRINIVAS, K.; KING, J.W.; HOWARD, L. R.; MONRAD, J. K.. Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 2, p. 208–218, 2010.

SRIVASTAVA, S.; SOMASAGARA, R.R.; HEGDE, M.; NISHANA, M.; TADI, S.K.; SRIVASTAVA, M.; CHOUDHARY, B.; RAGHAVAN, S.C. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24049, 2016.

SUTARIYA, V.B.; PATHAK, Y. Biointeractions of nanomaterials. Taylor& Francis Goup,LLC, 2015.

STEPANIC, V.; GASPAROVIC, A.C.; TROSELJ, K.G.; AMIC, D.; ZARKOVIC, N. Selected attributes of polyphenols in targeting oxidative stress in cancer. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 5, p. 496–509, 2015.

SU, Q.; PENG, M.; ZHANG, Y.; XU, W.; DARKO, K.O.; TAO, T.; HUANG, Y.; TAO, X., YANG, X. Quercetin induces bladder cancer cells apoptosis by activation of AMPK signaling pathway. **Am. J. Cancer Res.**, v. 6, n. 2, p. 498–508, 2016.

SUGANTHY, N.; DEVI, K.P.; NABAVI, S.F.; BRAIDY, N.; NABAVI, S.M. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 892–908, 2016.

SUBEDI, R.K.; KANG, K.W.; CHOI, H.K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.37, p. 508–513, 2009.

SUN, M.; NIE, S.; PAN, X.; ZHANG, R.; FAN, Z.; WANG, S. Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 15–24, 2014.

SURESH, G.; MANJUNATH, K.; VENKATESWARLU, V.; SATYANARAYANA V. Preparation, Characterization, and In Vitro and In Vivo Evaluation of Lovastatin Solid Lipid Nanoparticles. **AAPS Pharm.Sci.Tech.**, v. 8, p. E1-E9, 2007.

SVILENOV, H.; TZACHEV, C. Solid Lipid Nanoparticles – A Promising Drug Delivery System. **Nanomedicine**, p. 187–237, 2014.

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J.; NASIRPOUR, A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 29–43, 2013.

TARATULA, O.; KUZMOV, A.; SHAH, M.; GARBUZENKO, O.B.; MINKO, T. Nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine platform for pulmonary co-delivery of anticancer drugs and siRNA. **Journal of Controlled Release**, v. 171, n. 3, p. 349–357, 2013.

TAUROZZI, J. S.; HACKLEY, V. A; WIESNER, M. R. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment--issues and recommendations. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 711–29, 2011.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Physicochemical characterization and in vitro release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels). **J Microencapsul**, v. 25, n. 2, p. 111–120, 2008.

TOMASINA, J.; POULAIN, L.; ABEILARD, E.; GIFFARD, F.; BROTON, E.; CARDUNER, L., CARREIRAS, F., GAUDUCHON, P.; RAULT, S.; MALZERT-FRÉON, A. Rapid and soft formulation of folate-functionalized nanoparticles for the targeted delivery of triptentone in ovarian carcinoma. **Int. J. Pharm.**, v. 458, p.197-207, 2013.

TOMLINSON, B.; LIN, T. Y.; DALL'ERA, M.; PAN, C.X. Nanotechnology in bladder cancer: current state of development and clinical practice. **Nanomedicine (Lond)**, v. 10, n.7, p. 1189–1201, 2015.

TSALLAS, A.; JACKSON, J.; BURT, H. The uptake of paclitaxel and docetaxel into ex vivo porcine bladder tissue from polymeric micelle formulations. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.68, p.431–444, 2011.

ÜNER, M.; WISSING, S.A.; YENER, G.; MÜLLER, R.H. Influence of surfactants on the physical stability of solid lipid nanoparticle (SLN) formulations. **Pharmazie**, v. 59, p. 331–332, 2004.

ÜNER, M.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles and nanostruture lipid carriers. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, American Scientific Publishers; v. 10, p. 43-56, 2007.

Üner, M.; Yener, G.; Erguven, M.; Karaman, E.F.; Utku, E.G. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of Celecoxib for Topical Application - Preparation, Characterization and Drug Penetration Through Rat Skin. **Current Nanoscience**, v. 10, n. May, p. 532–542, 2014.

UNITED States Pharmacopeia, U., In: ed (ed), Rockville: United States Pharmacopeial Convention; p. 2118, 2007.

VARSHOSAZ, J.; HASSANZADEH, F.; SADEGHI, H.; SHAKERY, M. Folate targeted solid lipid nanoparticles of simvastatin for enhanced cytotoxic effects of doxorubicin in chronic myeloid leukemia. **Current Nanoscience**, v. 8, n. 2, p. 249–258, 2012.

VARSHOSAZ, J.; HASSANZADEH, F.; SADEGHI, H.; SHAKERY, M. Comparing different sterol containing solid lipid nanoparticles for targeted delivery of quercetin in hepatocellular carcinoma. **Journal of Liposome Research**, v. 24, n. 3, p. 191–203, 2014.

VICENTINI, F.T.; HE, T.; SHAO, Y.; FONSECA, M.J.; VERRI, W.A.; JR, FISHER, G.J. Quercetin inhibits uv irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing nf-kappab pathway. **J Dermatol Sci.**, v. 61, p.162–168, 2011.

XIA, D.; SHRESTHA, N.; VAN DE STREEK, J.; MU, H.; YANG, M. Spray drying of fenofibrate loaded nanostructured lipid carriers. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 507–515, 2016.

ZAMIRI, R.; AZMI, B.Z.; SADROLHOSSEINI, A. R.; AHANGAR, H. A. ; ZAIDAN, A.W.; MAHDI, M.A. Preparation of silver nanoparticles in virgin coconut oil using laser ablation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 71–75, 2011.

ZHAO, P.; WANG, H.; YU, M.; CAO, S.; ZHANG, F.; CHANG, J.; NIU, R. Paclitaxel-loaded, folic-acid-targeted and TAT-peptide-conjugated polymeric liposomes: in vitro and in vivo evaluation. **Pharm. Research.**, v. 27, p. 1914-1926, 2010.

ZHAO, Y.; SHEN, Y. Biomedical Nanomaterials. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2016.

Yan, F.; Zhang, C.; Zheng, Y.; Mei, L.; Tang, L.; Song, C.; Sun, H.; Huang, L. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 170–178, 2010.

YANG, L.; LIU, Y.; WANG, M.; HISAMITSU, T. Quercetin-induced apoptosis of HT-29 $\frac{1}{2}$ colon cancer cells via inhibition of the Akt-CSN6-Myc signaling axis. **Molecular Medicine Reports**, p. 4559–4566, 2016.

YU, Q.; ZHANG, J.; ZHANG, G.; GAN, Z. Synthesis and functions of well-defined polymer-drug conjugates as efficient nanocarriers for intravesical chemotherapy of bladder cancer. **Macromolecular Bioscience**, v. 15, n. 4, p. 509–520, 2015.

WALTENBERGER, J. VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. **Biochem Soc. Trans.**, v.37, p.1167-1170, 2009.

WEINTRAUB, M. D.; LI, Q. Q.; AGARWAL, P. K. Advances in intravesical therapy for the treatment of non-muscle invasive bladder cancer (Review). **Molecular and clinical oncology**, v. 2, n. 5, p. 656–660, 2014.

WISSING, S.A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p.1257-1272, 2004.

WISSING, S.A.; MULLER, R.H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles(SLN). **Int. J. Pharm.** v. 254, n.1, p. 65-68, 2003.

WU, L.; TANG, C.; YIN, C. Folate-mediated solid-liquid lipid nanoparticles for paclitaxel-coated poly(ethylene glycol). **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 36, p. 439-48, 2010.

WU, W. S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 4, p. 695–705, 2006.

APÊNDICES

Apêndice 1- Espectro de RMN de ^1H do Pluronic F68 funcionalizado com ácido fólico em DMSO- d_6 (500 MHz)